

Contribution à l'étude de la résistancede Plasmodium falciparum à l'atovaquone-proguanil

Lise Musset

▶ **To cite this version:**

Lise Musset. Contribution à l'étude de la résistancede Plasmodium falciparum à l'atovaquone-proguanil. Médicaments. Université René Descartes - Paris V, 2006. Français. NNT : . tel-00130030

HAL Id: tel-00130030
https://theses.hal.science/tel-00130030

Submitted on 8 Feb 2007

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.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

UNIVERSITÉ PARIS V - RENÉ DESCARTES
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ECOLE DOCTORALE DU MÉDICAMENT

ANNÉE 2006 n° …….

THÈSE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS V

Spécialité : Parasitologie

Contribution à l'étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* à l'atovaquone-proguanil

Présentée et soutenue publiquement par

Lise MUSSET

Le 14 juin 2006

JURY

Pr. Jacques LE BRAS	**Directeur de thèse**
Dr. Christophe ROGIER	Rapporteur
Pr. Stéphane PICOT	Rapporteur
Dr. Odile MERCEREAU-PUIJALON	Examinateur
Pr. Arnaud DUCRUIX	Examinateur
Dr. Anne LOMBES	Examinateur

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Sans l'amour de la recherche, le savoir et l'intelligence ne peuvent vraiment faire un savant.

Irène Joliot-Curie
(1897-1956)

A Monsieur Jacques LE BRAS,

Professeur de la Faculté de Pharmacie de Paris V.

Pour m'avoir confié ce projet,

Pour m'avoir fait partager votre expérience scientifique,

Pour avoir encadré ce travail avec autant de confiance, de respect et d'humanité,

Pour m'avoir supporté durant toutes ces années…

Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance,
et de mon plus profond respect.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

A Monsieur Jérôme CLAIN,

Maître de Conférence de la Faculté de Pharmacie de Paris V.

Pour ta précieuse contribution à ce travail,

Pour ta rigueur scientifique, ta pertinence et ta disponibilité,

Pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ta décontraction,

Travailler avec toi a été un réel plaisir,

Trouve ici l'expression de ma reconnaissance.
Ce travail est aussi le tien.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Aux Membres du Jury,

Monsieur **Christophe ROGIER**,

Directeur de recherche
à l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées, Marseille.

Monsieur **Stéphane PICOT**,

Professeur à la Faculté de Médecine de l'Université Lyon 2.

Pour avoir consacré une partie de votre temps à la critique de ce travail,

Madame **Odile MERCEREAU-PUIJALON**,

Directeur de recherche à l'Institut Pasteur de Paris.

Monsieur **Arnaud DUCRUIX**,

Professeur de la Faculté de Pharmacie de Paris V.

Madame **Anne LOMBES**,

Directeur de recherche au CNRS.

Pour m'avoir fait l'honneur de partager vos expériences et vos connaissances,

Trouvez ici l'expression de ma gratitude,
et de mon plus profond respect.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

A **Philippe DELORON**,

Pour son soutien, son écoute et ses précieux conseils.

A toutes les personnes qui ont collaboré à ce projet de recherche,

Olivier BOUCHAUD, pour sa gentillesse et la pertinence de ses remarques,

Béatrice PARFAIT, pour sa participation à ce travail,

Gilles COTRELL, pour ses compétences et sa sympathie,

Christophe DELAUNAY, **Florence DAMOND**, **Gilles COLLIN** et toute l'équipe du Laboratoire de Virologie pour leur soutien technique,

Guylaine BERTRAND, **Aurélie BRICE** et toute l'équipe du Laboratoire de Biochimie B pour leur disponibilité, leur conseil et leur gentillesse.

Et sans oublier toute l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'Hôpital Bichat et du laboratoire EA 209 - IRD 010,

Véronique pour son soutien technique, son organisation et sa spontanéité,

Halima pour sa disponibilité et sa gentillesse,

Lydia pour sa rigueur, son écoute et son amitié,

mais aussi **François**, **Sylvie**, **Sandrine H**, **Sayeh**, **Nicaise**, **Sandrine C** et tous les autres pour leur soutien au quotidien, leur bienveillance et leur sympathie.

Vous allez beaucoup me manquer…….

Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance,

Et de toute mon amitié.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

A toute ma famille,

A ma Mère,

Pour son amour, sa confiance et son soutien,

Pour son sens des valeurs,

Pour m'avoir laissé libre de mes choix,

A mon Père, *Corinne*, mes sœurs,

Pour leur confiance et leur amour,

Pour la chaleur de leur foyer,

Pour la tendresse et la complicité partagée avec *Mathilde* et *Manon*,

A mes Grands-Parents, *Geneviève*, *Sabine*, *Robert* et *Jacques,*

Pour votre amour attentionné,

Pour votre dévouement exemplaire et votre présence constante à mes côtés,

Pour tous les principes que vous m'avez transmis,

A la Famille *Rayé*,

Pour votre générosité, votre disponibilité et votre amour,

A *Carine*,

Pour ta force de caractère exemplaire et ta joie de vivre communative,

Trouvez en ce travail l'accomplissement de ma plus profonde reconnaissance,
Merci du fond du cœur d'être là.

A *Charly*,

Ton soutien, ton discernement et ton amour qui me sont si précieux,

Merci de respecter mes choix et de me ramener si souvent à l'essentiel.

A *Warinah*, *Patrick*, *Caroline*, *Sophie*, *Malika*, *Véronique*, *Florence*, et tous les autres,

Des amis qui écoutent, comprennent et conseillent sans juger…

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Liste des abréviations utilisées dans la thèse :

ACT	Artemisinin-based Combination Therapy
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ADNpl	Acide DesoxyriboNucléique de l'apicoplaste
ADNmt	Acide DesoxyriboNucléique mitochondrial
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AOX	Oxydase Alternative
AP	Atovaquone-Proguanil
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messager
$ARNr_{lsu}$	Acide RiboNucléique des grandes sous-unités ribosomiques
$ARNr_{ssu}$	Acide RiboNucléique des petites sous-unités ribosomiques
ATP	Adénosine TriPhosphate
AUC	Area Under the Curve
CI_{50}	Concentration Inhibitrice à 50%
CLHP	Chromotographie Liquide Haute Pression
C_{max}	Concentration plasmatique maximale
CNRP	Centre National de Référence pour le Paludisme
CQ	ChloroQuine
CQR	ChloroQuino-Résistant
CQS	ChloroQuino-Sensible
Cyt*b*	Cytochrome *b*
DDT	Dichloro-Diphényl-Trichloréthane
DHFR	DiHydroFolate Réductase
DHOD	DiHydroOrotate Déshydrogénase
dNTP	déoxyriboNucléotide TriPhosphate
ECT	Echec Clinique Tardif
EDTA	Ethylene Diamine Tracyclique Acid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPT	Echec Parasitologique Tardif
ETP	Echec Thérapeutique Précoce
Fam	6-carboxy-fluorescéine
Glurp	Protéine riche en glutamine
GR	Globule Rouge
Hex	Hexachloro-6-carboxy-fluorescéine
HRP2	Protéine Riche en Histidine 2
LDH	Lactate DésHydrogénase
MQ	MéfloQuine
Msp	Protéine de surface des mérozoïtes
NADH/ NAD+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide sous forme réduite ou oxydée
Ned	Trichloro-6-carboxy-fluorescéine
NsiI	Enzyme de digestion provenant de *Neisseria sicca*
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONG	Organisation Non Gouvernementale
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne (Polymerase Chain Reaction)
P. falciparum	*Plasmodium falciparum*
pfcoxI	Gène de *P. falciparum* codant la sous-unité I de la cytochrome oxydase

pfcoxIII	Gène de *P. falciparum* codant la sous-unité III de la cytochrome oxydase
pfcrt	Gène de *P. falciparum* codant le transporteur de chloroquino-résistance
pfcytb	Gène de *P. falciparum* codant le cytochrome *b*
pfdhfr	Gène de *P. falciparum* codant la dihydrofolate réductase
pfdhod	Gène de *P. falciparum* codant la dihydroorotate déshydrogénase
pfmdr1	Gène multidrug resistance 1 de *P. falciparum* codant la protéine pgh1
pgh1	Protéine plasmodiale analogue des P-glycoprotéines
PNUD	Programme des Nations Unies pour le Développement
PPI	Pour Préparations Injectables
Q	Quinone
QU	QUinine
RCPA	Réponse Clinique et Parasitologique Adéquate
RFLP	Restriction Fragment Lenght Polymorphism
RPMI	Roswell Park Medical Institute
RPSH	RPMI + 10% de sérum humain
ROX	6-carboxy-rhodamine
SF	Solution Fille
SHAM	Acide SalicylHydroxylAmique
SM	Solution Mère
SP	Sulfadoxine Pyriméthamine
SPF_1 et SPF_2	Solution Petite Fille 1 ou 2
TBE	Tris Borate EDTA
t_{max}	Durée pour atteindre la concentration maximale
UNICEF	Fond des Nations Unies pour l'Enfance
WHO	World and Health Organisation (organisation mondiale de la santé)

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Table des matières

TABLE DES ILLUSTRATIONS....13

SITUATION DU SUJET....15

1. Les antipaludiques et l'évaluation de leur efficacité....19

1.1 - Les principales familles d'antipaludiques....19

1.2 - Evaluation de l'efficacité d'un antipaludique....22

1.2.1 - Les tests *in vivo*....22
1.2.2 - Les tests de sensibilité *in vitro*....24
1.2.3 - Les marqueurs génomiques de résistance....25

2. La résistance aux antipaludiques....26

2.1 - Les mécanismes de résistance....27

2.1.1 - La résistance aux lysosomotropes....27
2.1.2 - La résistance aux antimétabolites....29

2.2 - La dynamique des résistances....29

3. L'association atovaquone-proguanil (AP)....32

3.1 - Les origines de l'association....32

3.2 - Propriétés pharmacocinétiques....35

3.3 - Mécanisme d'action....37

3.3.1 - La mitochondrie de *P. falciparum*....38
3.3.1.1 - Ultrastructure....38
3.3.1.2 - Les fonctions mitochondriales....40
3.3.1.3 - Le génome mitochondrial....44
3.3.2 - Mécanisme d'action de l'atovaquone-proguanil....46

3.4 - Activité sur les différents stades parasitaires....48

3.5 - Efficacité de l'atovaquone-proguanil....50

3.5.1 - *In vivo* dans le traitement des accès palustres simples à *P. falciparum*....50
3.5.2 - *In vivo* en prophylaxie du paludisme à *P. falciparum*....52
3.5.3 - *In vitro* en culture d'hématies humaines....54

3.6 - La résistance à l'atovaquone-proguanil....55

3.6.1 - Les pressions médicamenteuses *in vitro* et *in vivo*....56
3.6.2 - Les échecs thérapeutiques chez l'Homme....57
3.6.3 - Bases moléculaires et conséquences de la résistance....58

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS....62

RESULTATS **65**

1. Chimiosensibilité naturelle de *P. falciparum* à l'atovaquone en Afrique. **65**

1.1 - Article 1 66

- Apparent absence of atovaquone/proguanil resistance in 477 *Plasmodium falciparum* isolates from untreated French travellers.

1.2 - Discussion 72

2. Etude des résistants générés *in vitro* **74**

3. Etude de la résistance observée *in vivo* **78**

3.1 - Article 2 (soumis) 78

- *In vivo* emergence of *cytochrome b* codon 268 mutations conferring *Plasmodium falciparum* resistance to atovaquone-proguanil during treatment.

3.2 - Discussion 84

4. Evaluation du nombre de copies du gène cytochrome *b* de *P. falciparum* **88**

4.1 - Article 3 (en préparation) 88

- Absence of increase *pfcytb* gene copy number in *Plasmodium falciparum* resistant to atovaquone-proguanil.

4.2 - Discussion 91

5. Mécanisme d'émergence de la résistance à l'atovaquone-proguanil **93**

5.1 - Article 4 (soumis) 94

- Within-host selection of *de novo Plasmodium falciparum* cytochrome *b* mutations during atovaquone-proguanil treatment.

5.2 - Discussion 98

DISCUSSION GENERALE - PERSPECTIVES **100**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **110**

ANNEXES **123**

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Table des illustrations

Table des figures

Figure 1 : Distribution des zones de transmission du paludisme dans le monde en 2003. 16

Figure 2 : Proportion de traitement par la chloroquine ou un autre antipaludique chez les enfants de moins de 5 ans présentant une fièvre en Afrique Sub-Saharienne entre 2001 et 2004. 17

Figure 3 : Cycle de développement de *Plasmodium falciparum* et cibles des principaux antipaludiques. 21

Figure 4 : Situation de la résistance de *P. falciparum* aux différentes molécules utilisées en 2004. 27

Figure 5 : Position des différentes mutations de PfCRT identifiées à ce jour. 28

Figure 6 : Evolution de la structure des hydroxynaphtoquinones. 33

Figure 7: Structure de la mitochondrie de *Plasmodium*. 38

Figure 8 : Evolution de la structure mitochondriale de *P. falciparum* en fonction du stade de développement parasitaire visualisée à l'aide de protéines fluorescentes. 39

Figure 9 : Chaîne de phosphorylation oxydative de *P. falciparum*. 41

Figure 10 : Rôle de l'ubiquinone parmi les différentes voies métaboliques de *P. falciparum*. 42

Figure 11 : Représentation schématique du génome mitochondrial de *P. falciparum* (6kb). 45

Figure 12 : Schéma de la réplication de l'ADN mitochondrial chez *P. falciparum*. 46

Figure 13 : Structures chimiques de l'atovaquone, du proguanil, de l'ubiquinone et du cycloguanil. 47

Figure 14 : Isobologrammes montrant l'interaction entre l'atovaquone et le proguanil. 55

Figure 15 : Cycle Q au niveau du complexe III mitochondrial. 59

Figure 16 : Structure secondaire du cytochrome *b*. 61

Figure 17 : Pourcentage de mutants du gène du cytochrome *b* associée au phénotype à différents paliers de sélection par l'atovaquone *in vitro*. 74

Figure 18 : Principe de détection d'une mutation minoritaire par "enrichissement". 128

Figure 19 : Photo de gel montrant la limite de détection de la mutation Y268S du cytochrome *b* par la méthode "d'enrichissement". 130

Figure 20 : Profils microsatellites de souches isolées avant (TM90C2a, *pfcytb* sauvage) et après (TM90C2*b*, PfCYT*b* Y268S) échec thérapeutique par atovaquone-proguanil. 133

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification des différents types de résistance parasitaire et des réponses thérapeutiques en zone de faible transmission. 23

Tableau 2 : Principales caractéristiques de l'atovaquone-proguanil. 34

Tableau 3 : Données pharmacocinétiques de l'atovaquone et du proguanil. 36

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des études cliniques comparant l'atovaquone-proguanil à d'autres thérapeutiques dans le traitement des accès palustres à *P. falciparum*. 51

Tableau 5 : Etudes cliniques d'efficacité et de tolérance, comparatives ou non, de l'atovaquone-proguanil en prophylaxie. 53

Tableau 6 : Caractéristiques des clones résistant à l'atovaquone générés par pression médicamenteuse. 57

Tableau 7 : Caractérisation phénotypique et génotypique des clones observés durant la pression médicamenteuse par l'atovaquone. 75

Tableau 8 : Données sur les échecs thérapeutiques à l'atovaquone-proguanil publiés avant mai 2006. 86

Tableau 9 : Fond génétique de la population parasitaire hébergée par un patient traité par atovaquone-proguanil à différents temps après l'inititation du traitement. 98

Table des annexes

Annexe 1 124
Tests isotopiques de chimiosensibilité *in vitro* à l'atovaquone.

Annexe 2 126
Méthode de génotypage du gène de la dihydroorotate déshydrogénase, *pfdhod*.

Annexe 3 128
Méthode génotypique de détection des mutants PfCYT*b* Y268S et Y268C de *P. falciparum* par "enrichissement".

Annexe 4 131
Etude de cinq marqueurs microsatellites de *P. falciparum* par une méthode multiplexée.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

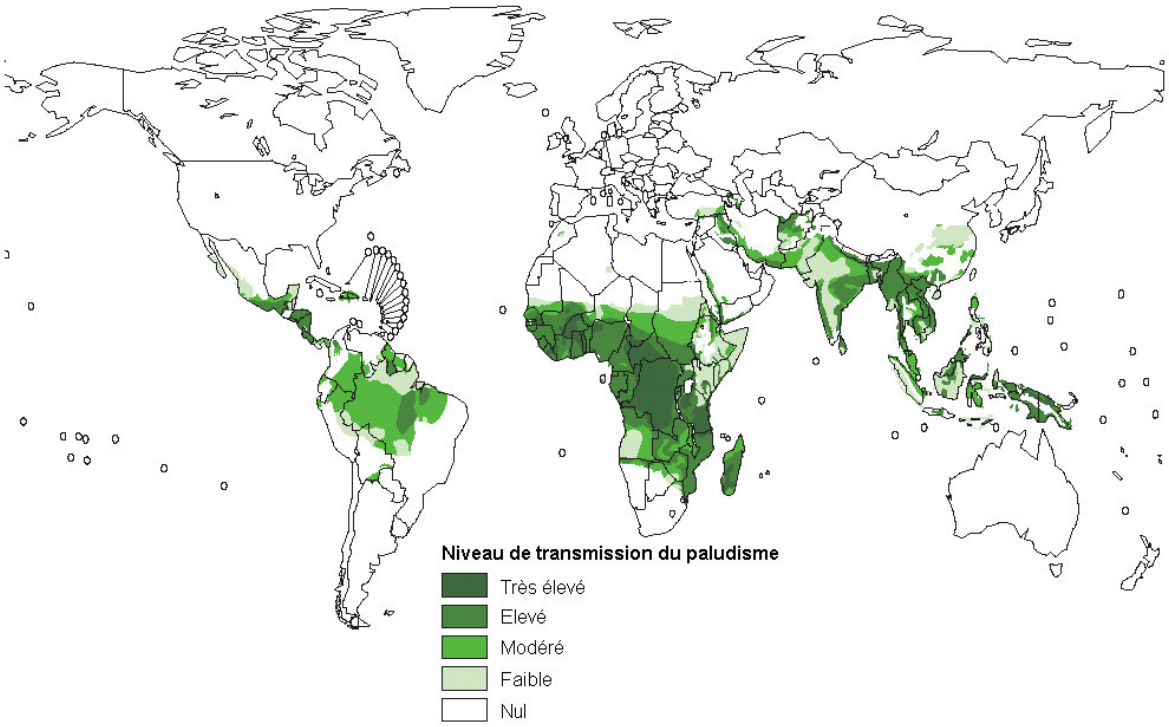
tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Situation du sujet

L'endémie palustre représente un problème de santé publique mondial majeur qui touche les plus faibles et menace le développement économique des pays les plus pauvres (réduction estimée de 1,3% par an du développement socio-économique ; Sachs, 2001). Causée par un parasite du genre *Plasmodium*, cette parasitose a entraîné en 2002, plus de 2,5 millions de morts parmi les 500 millions d'accès palustres recensés (Snow, 2005). En vivant en zone d'endémie, l'Homme acquiert lentement une immunité, non stérilisante, qui lui permet d'éviter les accès graves de la maladie (Hviid, 2005). Les principales victimes de *P. falciparum*, unique espèce mortelle pour l'Homme, sont donc les personnes non immunes comme les enfants de moins de 5 ans (18% des décès), les populations déplacées, les voyageurs, sans oublier les femmes enceintes et leur fœtus du fait de l'immuno-modulation observée durant la grossesse.

Depuis plusieurs années, l'endémie est en constante augmentation. Pourtant, depuis le milieu du XX^{ème} siècle, les stratégies globales de lutte contre le paludisme n'ont pas manqué.

- Entre 1957 et 1972, l'OMS met en place un projet d'éradication du paludisme dans le monde en s'appuyant sur l'usage d'un insecticide, le DDT, et d'un antipaludique, la chloroquine (Pampana, 1963). Ce projet était structuré en quatre étapes : (***i***) la préparation de l'éradication, (***ii***) l'attaque par pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticide pour interrompre la transmission, (***iii***) la consolidation de l'éradication en neutralisant tous les parasites grâce aux traitements individuels par la chloroquine ou la pyriméthamine, puis (***iv***) le maintien de cette éradication par pulvérisation d'insecticide dans les foyers de transmission résiduelle. A la fin des années 70, des facteurs humains (mise en place des politiques d'éradication insuffisamment suivies, infrastructures sanitaires locales absentes ou rudimentaires, augmentation des coûts de la lutte…), parasitaires (apparition des premières résistances à la chloroquine) et vectoriels (résistance au DDT, interrogation sur l'inocuité des pulvérisations de masse des insecticides…) ont conduit à revoir les objectifs à la baisse. Ainsi, l'éradication a été abondonnée dans les régions où elle était trop ambitieuse au vu des données épidémiologiques et socio-économiques mais elle a été poursuivie là où elle était possible (ex: régions méditéranéennes ; OMS, 1979).



Adaptée de Hay, 2004.

Figure 1 : Distribution des zones de transmission du paludisme dans le monde en 2003.

Le paludisme à *P. falciparum* sévit dans près d'une centaine de pays situés principalement en zone intertropicale où vivent plus de 3 milliards d'individus. C'est l'Afrique, en totalisant plus de 70% des décès, qui paye le plus lourd tribut à la maladie du fait du faible niveau socio-économique de la plupart des pays africains et du haut niveau de transmission de la maladie favorisé par la présence de conditions de vie optimales pour le développement des vecteurs, notamment *Anopheles gambiae*.

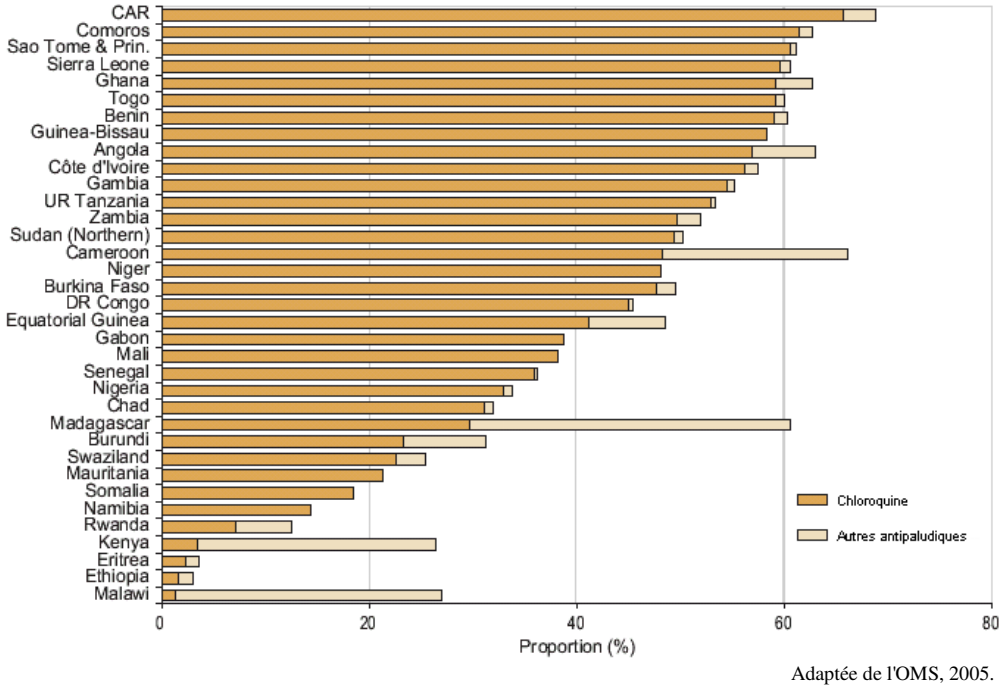
◆ Un deuxième projet, à la fin des années 70, était de contrôler la pandémie grâce (***i***) à une détection précoce suivie d'un traitement approprié des cas de paludisme, (***ii***) à une prophylaxie systématique des femmes enceintes et des nourrissons, (***iii***) à une pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticide pour réduire, voire stopper la transmission, (***iv***) à une collaboration au processus de développement économique et social des régions touchées. A la fin des années 90, le constat est dramatique, le paludisme est réapparu en Asie Centrale et en Europe Orientale et l'endémie progresse. La proportion de sujets exposés, la sévérité des accès, la mortalité infantile ainsi que la durée des saisons de transmission ont augmenté. Les facteurs à l'origine de ce nouvel échec sont comparables aux précédents si ce n'est que la résistance à la chloroquine, l'antipaludique majeur de première ligne, est désormais généralisée à l'ensemble des zones d'endémies, excepté quelques pays d'Amérique Centrale et Haïti.

◆ Face à cette situation, l'OMS s'associe en 1998 au Fond des Nations Unies pour l'Enfance (UNICEF), au Programme des Nations Unies pour le Développement (PNUD) et à la Banque

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Mondiale pour faire reculer le paludisme : "Roll Back Malaria". Le nouvel objectif est alors de diminuer de moitié le nombre de décès liés au paludisme d'ici 2010 en s'appuyant sur les trois principes de base actualisés : (***i***) détection et traitement précoce des cas en utilisant des associations d'antipaludiques à base de dérivés de l'artémisinine (ACT : artemisine combination therapy) ; (***ii***) traitement prophylactique des femmes enceintes et (***iii***) lutte anti-vectorielle individuelle à l'aide de moustiquaires imprégnées d'un insecticide, la perméthrine. Enfin, l'accent est mis sur la nécessité d'impliquer les différents partenaires dans cette lutte (gouvernements des pays concernés et des pays donateurs, industrie pharmaceutique, ONG et organismes de recherche ; Nabarro & Tayler, 1998). En 2004, la mortalité imputable au paludisme a augmenté de 10% comparée à l'année 1998. A quatre ans de l'échéance fixée, "Roll Back Malaria" est donc un échec qui selon l'OMS s'explique par la difficulté à mettre en place les recommandations. Alors même que l'utilisation de la chloroquine est proscrite du fait du très haut niveau de résistance dans l'ensemble des zones d'endémie, cette molécule est encore utilisée en Afrique Sub-Saharienne pour traiter la grande majorité des enfants âgés de moins de 5 ans présentant une fièvre (Figure 2) puisque ces populations n'ont pas accès aux molécules recommandées (OMS, 2003a). L'application des décisions gouvernementales ratifiant l'utilisation des ACT reste donc virtuelle.



Adaptée de l'OMS, 2005.

Figure 2 : Proportion de traitement par la chloroquine ou un autre antipaludique chez les enfants de moins de 5 ans présentant une fièvre en Afrique Sub-Saharienne entre 2001 et 2004.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Ce retard dans la mise en place des recommandations est, selon l'OMS, lié au manque de moyens puisque l'aide internationale n'a débuté qu'en 2003 et qu'aujourd'hui encore, les gouvernements nationaux des pays touchés restent, à plus de 70%, les principaux commanditaires de ces programmes. La lutte contre le paludisme est aujourd'hui très coûteuse (environ 3,2 milliards de dollars par an) compte tenu de l'étendue de l'endémie et des moyens de lutte de plus en plus onéreux (moustiquaires imprégnées, ACT 10 à 20 fois plus chers que la chloroquine…). L'efficacité de "Roll Back Malaria" est cependant sévèrement critiquée (Attaran, 2004) et la contribution de chacun des partenaires est jugée très insuffisante. En effet, la majorité de l'aide fournie par les pays industrialisés retourne dans ces mêmes pays qui commercialisent à prix élevé la plupart des moyens de lutte. Mais la lutte antipaludique dépend aussi des volontés politiques, de l'état de stabilité d'un pays et du niveau d'organisation de ses systèmes de soins puisque l'expérience montre que le niveau d'endémicité palustre fluctue dans le temps en fonction des évènements géopolitiques des pays impaludés. Une lutte efficace ne passera donc que par une volonté politique forte permettant "un développement économique et social durable des régions concernées" (OMS, 1979).

Sur le plan biologique, le *Plasmodium* possède un cycle de multiplication rapide ainsi que de nombreux mécanismes de recombinaison qui lui permettent une adaptation rapide au milieu dans lequel il évolue. Les recommandations thérapeutiques concernant le paludisme (usage des médicaments essentiels à des posologies adaptées) sont particulièrement depuis toujours mal suivies, tant par les prescripteurs, les usagers (tradition, méconnaissance, coût, tolérance médiocre) que par l'industrie pharmaceutique qui continue à répondre à la forte demande de monothérapies alors qu'elles sélectionnent de nombreuses résistances. Cependant, en ce début d'année, 13 des 23 industries pharmaceutiques commercialisant des dérivés de l'artémisinine ont répondu à l'appel de l'OMS en s'engageant à stopper la commercialisation des monothérapies à base de dérivés de l'artémisinine d'ici la fin de l'année (OMS, 2006). Les pressions médicamenteuses massives et non contrôlées appliquées depuis plus de cinquante ans ont malgré tout entraîné la sélection puis le maintien de nombreux parasites résistants. L'émergence de la résistance s'accompagnant d'une augmentation de la mortalité (Trape, 2001), la recrudescence mondiale du paludisme en zone tropicale est donc aussi liée à la généralisation de la chimiorésistance de *P. falciparum* aux différentes molécules. Ainsi, l'étude des mécanismes de résistance de *Plasmodium* est un sujet de recherche majeur, plus que jamais prioritaire pour permettre d'optimiser l'utilisation des différentes molécules et de limiter la sélection de parasites résistants.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

1. Les antipaludiques et l'évaluation de leur efficacité

1.1 - Les principales familles d'antipaludiques

Ce paragraphe liste de façon succincte les principales familles de principes actifs utilisés à ce jour pour le traitement et la prévention du paludisme à *P. falciparum*, par ordre chronologique de leur découverte. Tout comme les premiers insecticides, les premiers antipaludiques à avoir été utilisés sont d'origine naturelle. Les pénuries liées aux conflits armés mondiaux et la sélection de parasites résistants ont cenpendant imposé la recherche de molécules de synthèse.

- Depuis plus de 2000 ans, une armoise, *Artemisia annua*, est utilisée en médecine traditionnelle chinoise comme fébrifuge et anti-hémorroïdaire. Sa propriété antipaludique est liée à l'activité d'un principe actif de la famille des endoperoxides, le quinghaosu ou artémisinine (Lusha, 1979). Son mode d'action n'est pas encore entièrement élucidé mais ils interagiraient avec l'hème des parasites et certaines protéines parasitaires dont une pompe à calcium ATP-dépendante (Eckstein-Ludwig, 2003). Aujourd'hui, cette famille de molécules est la seule pour laquelle aucune résistance n'a encore été recensée, elle inclut l'artésunate, la dihydroartémisinine et l'artéméther. Ces composés ont une action très rapide sur les stades érythrocytaires du parasite, du trophozoïte jeune au schizonte mâture (Figure 3). Cette rapidité d'action combinée à une demi-vie très courte permet de limiter l'exposition des parasites à des doses subthérapeutiques de principe actif ce qui devrait réduire la fréquence d'émergence de parasites résistants (Hastings, 2002 ; White & Pongtavornpinyo, 2003). L'usage des antipaludiques en association étant maintenant largement préconisé par l'OMS (OMS, 2005), les dérivés de l'artémisinine sont donc à la base de toutes les associations recommandées (ACT : artemisinin combination therapy) pour le traitement des accès palustres simples à *P. falciparum*. Différentes associations sont utilisées : artéméther-luméfantrine (Riamet®, Coartem®), artésunate-amodiaquine (Arsucam® dans les zones où le taux de succès thérapeutique de l'amodiaquine en monothérapie est supérieur à 80%), artésunate plus sulfadoxine-pyriméthamine (dans les zones où le taux de succès thérapeutique de la sulfadoxine-pyriméthamine en monothérapie est supérieur à 80%), artésunate plus méfloquine (Artéquin®).

- L'écorce de quinquina est aussi utilisée comme fébrifuge depuis de nombreux siècles par les indigènes d'Amérique du Sud. Isolée au début du XIX^{ème} siècle (Pelletier & Caventou, 1820), la

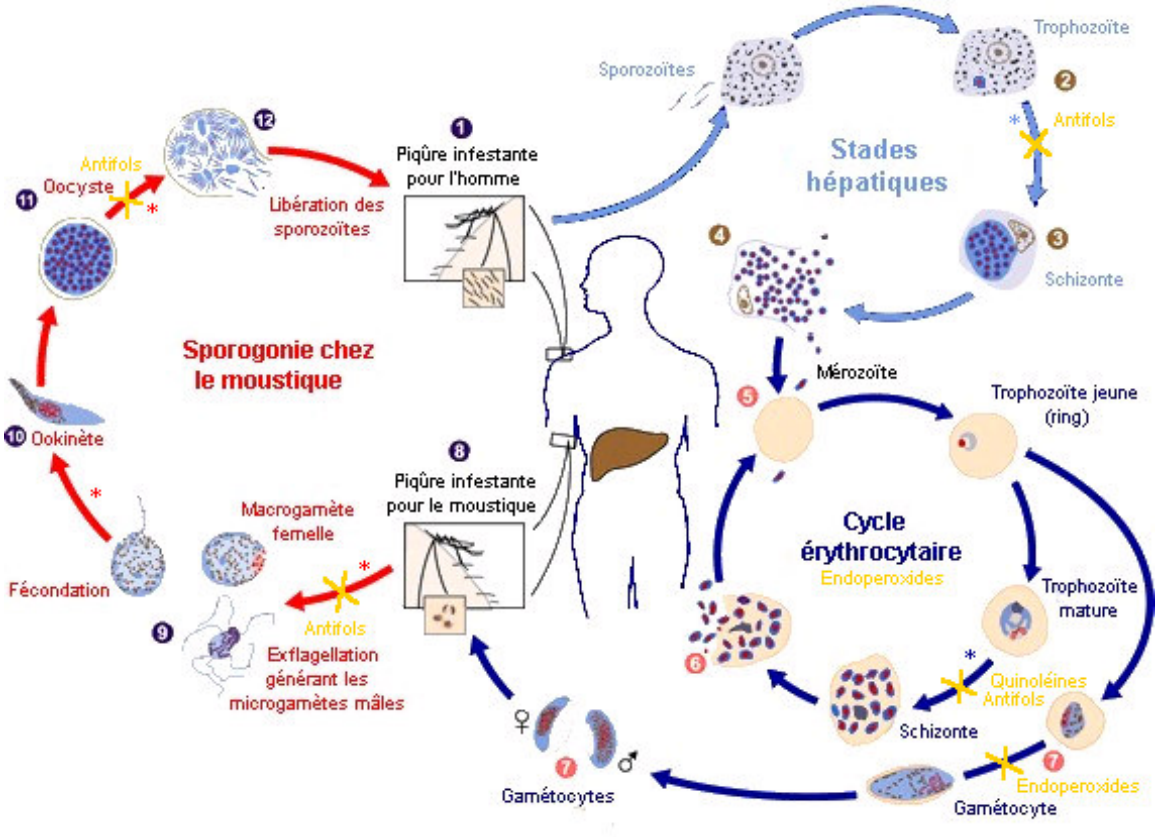
quinine reste aujourd'hui encore, le traitement de référence des accès graves à *P. falciparum* dans le monde entier. Dans cette famille des 2-amino-alcools, d'autres composés majeurs sont à considérer, la méfloquine et deux molécules apparentées, l'halofantrine et la luméfantrine.

- Le premier composé de la grande famille des amino-4-quinoléines est identifié en 1934 suite à une pénurie de quinine durant la première guerre mondiale (Andersag, 1934). Produite et découverte par l'entreprise Bayer, la resorchin, rebaptisée "chloroquine", est le premier antipaludique de synthèse. A partir de 1944, ce principe actif sera utilisé en prophylaxie et pour le traitement des accès palustres non compliqués. Peu coûteuse, elle deviendra rapidement l'antipaludique le plus utilisé au cours du XX^{ème} siècle. Cette famille comprend également l'amodiaquine, découverte en 1948. Les amino-4-quinoléines, les 2-amino-alcools et les dérivés de l'artémisinine (Kannan, 2005), se concentrent plus de 100 fois dans la vacuole digestive des parasites, ce sont des lysosomotropes. Ce nom vient de l'analogie de pH observée dans la vacuole digestive des parasites et dans les lysosomes des cellules de mammifères. Une fois dans la vacuole digestive, la chloroquine inhibe la détoxification de l'hème en hémozoïne (Uhlemann, 2005) selon un mécanisme moléculaire encore débattu (Sullivan, 1998 ; Dorn, 1998).

- Les deux dernières classes d'antipaludiques, les antifoliniques et les antifoliques, font partie de la grande famille des antimétabolites. Les premiers ont été développés après la seconde guerre mondiale, le proguanil en 1945 et la pyriméthamine en 1952. Les antifoliques, la sulfadoxine et les sulfones, sont le plus souvent utilisés en association avec la pyriméthamine. Ces deux classes de composés agissent au niveau de la synthèse des acides nucléiques des parasites, les antifoliniques au niveau de la dihydrofolate réductase-thymidylate synthase (PfDHFR-TS ; Ferone, 1969) et les antifoliques au niveau de la dihydroptéroate synthase (PfDHPS ; Triglia, 1997). Ils agissent donc sur tous les stades du développement parasitaire nécessitant une synthèse d'acide nucléique (Figure 3).

Les lysosomotropes et les antimétaboliques sont des schizonticides qui agissent uniquement sur les formes intra-érythrocytaires asexuées du parasite. Un seul gamétocytocide est utilisable, une amino-8-quinoléine : la primaquine (Cooper, 1953). Elle est majoritairement indiquée pour prévenir les rechutes à *P. vivax* ou *P. ovale* deux autres espèces plasmodiales pouvant générer des accès palustres à distance de l'accès initial du fait de l'existence de stades parasitaires dormants au niveau hépatique, les hypnozoïtes. La primaquine permet d'éliminer ses formes hépatiques dormantes.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007



Adaptée de http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm

Figure 3 : Cycle de développement de *Plasmodium falciparum* et cibles des principaux antipaludiques.

C'est lors nécessaire à la maturation de ses œufs qu'un moustique femelle, du genre *Anopheles*, infecté par *P. falciparum* inocule des sporozoïtes dans le derme de l'hôte intermédiaire, l'Homme. Après une rapide migration tissulaire et sanguine, ces sporozoïtes pénètrent activement dans les hépatocytes grâce aux différents organites du complexe apical spécifique de l'embranchement des *Apicomplexa* (conoïde, granules denses, rhoptries et micronèmes). Dans le foie, les parasites se multiplient pour libérer, au bout de cinq jours et demi environ, quelques dizaines de milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine. Transformé en trophozoïte après pénétration active dans l'hématie, le parasite mature pour former un schizonte puis, après plusieurs divisions, un corps en rosace composé de 36 mérozoïtes. Au bout de 48 heures environ, la libération des parasites s'effectue de façon active par destruction de l'hématie. Les nouveaux mérozoïtes vont alors coloniser d'autres globules rouges sains. C'est la phase érythrocytaire de reproduction asexuée ou schizogonie. Les trophozoïtes peuvent également, si les conditions de développement se dégradent (présence de principes actifs dans le sang, pression immunitaire forte…), se transformer en gamétocytes mâles ou femelles. La reproduction sexuée du parasite ou sporogonie se déroule chez l'hôte définitif, l'Anophèle, qui est aussi le vecteur de cette pathologie. Après absorption des gamètes par une nouvelle Anophèle femelle lors d'un repas sanguin, la fécondation a lieu au niveau gastrique pour former un ookinète, puis un oocyste contenant des milliers de sporozoïtes haploïdes. Ces sporozoïtes seront ensuite libérés dans la cavité générale de l'insecte pour rejoindre plus particulièrement les glandes salivaires dans l'attente de leur inoculation à un nouvel hôte lors d'un deuxième repas sanguin.
Pour les espèces plasmodiales, *P. vivax* et *P. ovale*, certains parasites peuvent rester dans le foie sous forme d'hypnozoïtes et générer des accès palustres plusieurs mois voir plusieurs années après l'accès initial.

*phases de développement nécessitant une synthèse d'acide nucléique.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

1.2 - Evaluation de l'efficacité d'un antipaludique

Le contrôle de l'endémie palustre reposant essentiellement sur les médicaments antipaludiques, l'évaluation permanente de leurs niveaux d'efficacité est indispensable pour optimiser les recommandations thérapeutiques et prophylactiques nationales en fonction des résistances parasitaires observées. Pour pouvoir comparer les résultats dans le temps et permettre un suivi épiémiologique mondial des résistances, une standardisation des méthodes est nécessaire. Cette standardisation est coordonnée par l'OMS qui recommande régulièrement des protocoles à mettre en œuvre. Pour évaluer l'efficacité d'un antipaludique, trois approches sont aujourd'hui à notre disposition : les tests *in vivo*, les tests de sensibilité *in vitro* et l'étude des marqueurs génomiques de résistance.

1.2.1 - Les tests *in vivo*

Entre 1963 et 1996, un test standard mesurant la réponse parasitologique, sensible (S) ou résistant (RI, RII, RIII), a été recommandé par l'OMS (Peters, 1987). Depuis 1996, un test unique est recommandé comme méthode de référence pour évaluer l'efficacité des antipaludiques. C'est en fonction de ses résultats que seront définies les recommandations thérapeutiques et prophylactiques nationales. Il a l'avantage de refléter la réponse biologique au traitement du patient et du parasite puisqu'il évalue simultanément l'implication des facteurs humains (immunité et variations inter-individuelles des pharmacocinétiques) et parasitaire (résistance au principe actif).

Il consiste en un suivi biologique et parasitologique régulier du patient ayant été traité (OMS, 2003b). En fonction de la zone concernée (forte ou faible transmission), la chronologie des contrôles diffère. En zone de faible transmission, le suivi comprend des contrôles à J0, 1, 2, 3, 7, 14 et 28 (J0 est le jour de la première prise du traitement). En zone de forte transmission, le suivi s'arrête à J14 en raison du risque important de réinfestation et du rôle de l'immunité partielle des patients dans la réponse thérapeutique. En fonction des résultats, différents types de réponses thérapeutique et parasitaire sont définis (Tableau 1).

Bien qu'il puisse être réalisé sur le terrain, ce test nécessite beaucoup de moyens et présente quelques limites :

- Les sujets à l'inclusion doivent être âgés de moins de 5 ans pour limiter le rôle de l'immunité dans l'efficacité thérapeutique en zone de transmission élevée. Ce critère n'est

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

cependant pas requis dans les zones de faible transmission ou lors d'études portant sur des principes actifs contre-indiqués ou dont l'autorisation de mise sur le marché (AMM) ne permet pas une utilisation chez les enfants (doxycycline…).

Tableau 1 : Classification des différents types de résistance parasitaire et des réponses thérapeutiques en zone de faible transmission.

Résistance parasitaire	Réponse thérapeutique
Résistance de type RIII Clairance parasitaire incomplète ou absente à J2 : réduction de moins de 75% de la parasitémie de départ.	**Echec thérapeutique précoce : J0 à J3 (ETP)** Signes de danger ou d'accès palustre à J1, J2 ou J3 : Fièvre + parasitémie augmentée à J2, ou fièvre + parasitémie à J3, ou parasitémie à J3 ≥ 25% de la parasitémie à J0.
Résistance de type RII Clairance parasitaire incomplète à J2 : réduction de plus de 75% de la parasitémie de départ.	**Echec parasitologique tardif (EPT) : J7 à J14 ou J28** Présence de parasites sans fièvre.
Résistance de type RI Clairance parasitaire initiale totale suivie d'une recrudescence parasitaire dans les 7 jours.	**Echec clinique tardif (ECT) : J4 à J14 ou J28** Signes de danger ou d'accès palustre après J3, fièvre + parasitémie positive entre J4 et J28.
Sensible Clairance parasitaire totale à J2 sans recrudescence parasitaire.	**Réponse clinique et parasitologique adéquate à J28** Absence de parasites détectables entre J2 et J28, et absence de fièvre entre J2 et J28.

La fièvre est définie par une température axillaire supérieure à 37,5°C ou une température rectale ou auriculaire supérieure à 38°C (OMS, 2003b).

- La parasitémie doit être comprise entre 2 000 et 100 000 parasites/µl. Une valeur minimale est imposée pour éviter d'inclure des porteurs sains dans l'étude mais le seuil supérieur peut entraîner une sous-estimation des échecs thérapeutiques par résistance parasitaire puisque ce type de rechutes est souvent associé à une charge parasitaire élevée au début du traitement (White, 2004).

- Un contrôle trop précoce à J3 peut entaîner une surestimation du nombre d'échecs thérapeutiques précoces pour les principes actifs ayant un délai d'action, et donc une clairance parasitaire, longs (ex: atovaquone-proguanil).

- La durée du suivi de 14 jours en zone de forte transmission peut s'avérer trop courte et entraîner une sous-estimation du nombre d'échecs, en particulier pour les principes actifs générant des échecs tardifs (ex.: atovaquone, méfloquine, sulfadoxine/pyriméthamine). De plus, il ne permet pas d'exclure totalement une réinfestation du sujet puisque dès le sixième jour suivant une piqûre infectante, des parasites peuvent être libérés par le foie dans la circulation sanguine. Une réinfestation doit donc être systématiquement éliminée grâce à l'étude de marqueurs de polymorphisme comme : les antigènes de surface du mérozoïte 1 et 2 (*msp1* et

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

msp2), la protéine riche en glutamine (*glurp*) ou encore les microsatellites (Leclerc, 2002). Mais ces techniques ont aussi leurs limites puisqu'elles ne permettent pas d'identifier les populations représentant moins de 2% de la population totale (Jafari, 2004). De plus, une réinfestation avec un clone identique au premier ne peut pas être exclue (Greenwood, 2002).

1.2.2 - Les tests de sensibilité *in vitro*

Ces tests permettent un suivi épidémiologique mondial des résistances en déterminant (***i***) le niveau de sensibilité de base de *P. falciparum* à une molécule dans une région donnée avant son usage et de suivre son évolution au fil du temps sous la pression médicamenteuse, (***ii***) les profils de résistance croisée entre les molécules ou (***iii***) en validant des marqueurs moléculaires de résistance.

Ils évaluent la réponse parasitaire au traitement par contact direct parasite-principe actif *in vitro* ce qui permet d'éliminer deux cofacteurs majeurs de l'efficacité d'un antipaludique, l'immunité du patient et les variations pharmacocinétiques inter-individuelles. Des trophozoïtes jeunes étant mis au contact de concentrations croissantes de principe actif, il est alors possible de déterminer la concentration d'antipaludique inhibant de 50% (CI_{50}) la croissance parasitaire (maturation en forme schizonte). Lorsque l'isolat est polyclonal, la CI_{50} est le reflet de la sensibilité moyenne des différents parasites composant l'isolat. Pour déterminer si un isolat est chimiosensible ou chimiorésistant, on compare alors sa valeur de CI_{50} à une valeur seuil définie pour chaque molécule.

Différentes types de tests se distinguent par le marqueur de croissance parasitaire qu'ils utilisent. (***i***) La méthode de référence est le test isotopique qui utilise l'hypoxanthine radiomarquée au tritium (Desjardins, 1979). L'hypoxanthine étant un précurseur de la synthèse des acides nucléiques, l'intensité de la radioactivité émise par l'échantillon en fin de test sera proportionnelle à la croissance parasitaire ayant eu lieu en présence de principe actif. Différentes variantes de ce test existent mais en général le comptage s'effectue après 42 heures de culture (Druilhe, 1983 ; Le Bras & Deloron, 1983). Cette méthode a l'inconvénient d'être très coûteuse en matériel et en retraitement des déchets radioactifs. (***ii***) Le test de l'OMS III utilise le comptage microscopique des formes ayant atteint le stade schizonte après 24 heures de culture mais cette technique est très dépendante de l'opérateur. Enfin, (***iii***) les tests colorimétriques dosent par une technique immuno-enzymatique ELISA différents marqueurs de la croissance parasitaire comme la lactate déshydrogénase (LDH) ou la protéine riche en histidine 2 (HRP_2) (Makler, 1993 ;

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Noedl, 2002). Ils ont pour objectif de diminuer le coût lié à l'utilisation d'isotopes mais trop peu de tests ont été réalisés pour juger de leurs performances.

L'étude de la sensibilité de *Plasmodium* à une association de principe actif est possible avec ces techniques mais limitée par la difficulté de déterminer la proportion de chacune des molécules à mettre en contact. Ces méthodes sont coûteuses et nécessitent des méthodes standardisées. Elles sont généralement réalisées dans des laboratoires de référence, localisés dans quelques régions sentinelles du monde pourvues de laboratoires de biologie aux standards des pays industrialisés (procédure de contrôle qualité, biologistes expérimentés…). De plus, la détermination des seuils de résistance est délicate et nécessite, en parallèle, des tests *in vivo* pour corréler au maximum les valeurs de chimiosensibilité aux réponses thérapeutiques. Bien que ces études soient généralement menées chez des voyageurs pour minimiser l'action de l'immunité antiplasmodiale, compte tenu des nombeux cofacteurs intervenant *in vivo* (immunité, pharmacocinétique…), les seuils de résistances sont rarement prédictifs de la réponse thérapeutique.

1.2.3 - Les marqueurs génomiques de résistance

Avec le développement des techniques de biologie moléculaire, de nombreuses connaissances ont été acquises ces quinze dernières années sur les mécanismes de résistance aux antipaludiques et les déterminants moléculaires associés. Les génotypes de résistance étant déterminés après amplification de l'ADN par PCR, ces méthodes sont très sensibles et ne nécessitent que très peu de sang. Elles requièrent cependant beaucoup de matériel et de grandes précautions afin d'éviter les amplifications non-spécifiques liées à des contaminations par des acides nucléiques d'autres isolats. De plus, excepté les méthodes utilisant des digestions enzymatiques, elles sont également très coûteuses. La présence de ces marqueurs est également peu prédictive de la réponse thérapeutique. Pour de nombreux principes actifs ayant un mécanisme de résistance complexe, le génotype est rarement corrélée avec les résultats des tests *in vitro*. Cepedant, pour les antimétabolites qui ont généralement un mécanisme de résistance simple, les marqueurs génomiques de résistance peuvent remplacer les tests *in vitro* pour les études épidémiologiques. Actuellement, seuls les marqueurs moléculaires de résistance à la pyriméthamine et au cycloguanil peuvent se substituer aux tests de chimiosensibilité.

Les marqueurs génomiques associés à la résistance aux différents principes actifs sont détaillés dans le paragraphe 2.1.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

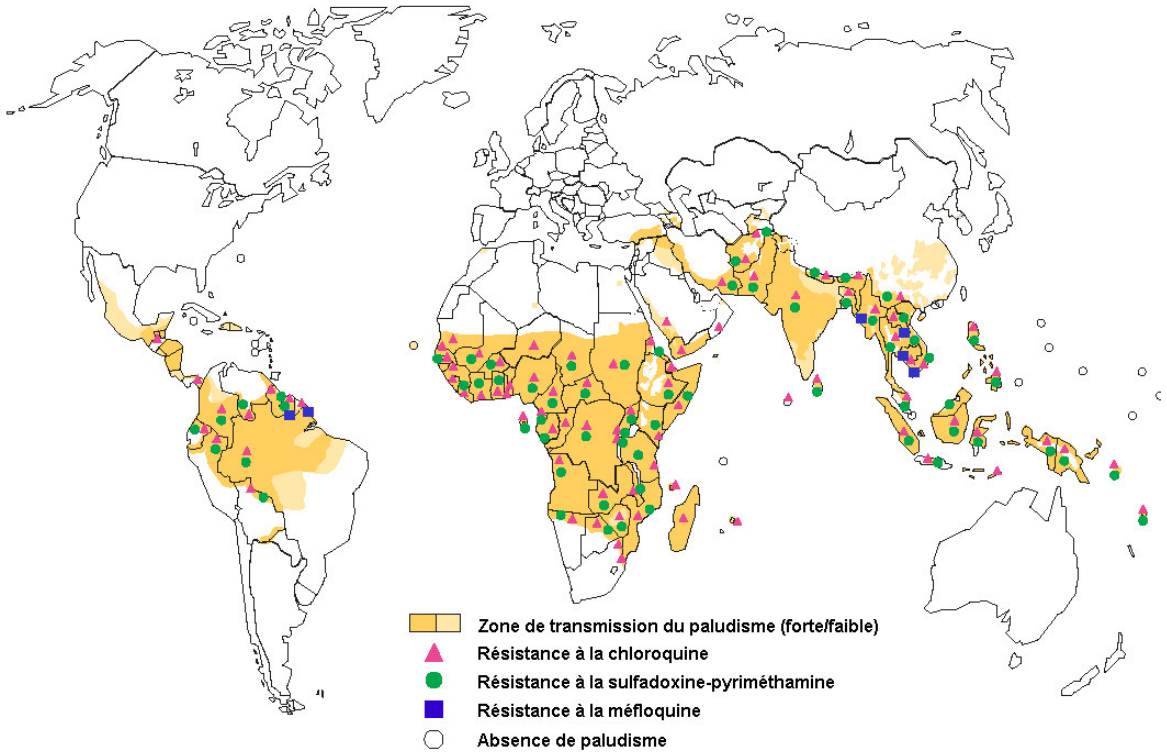
2. La résistance aux antipaludiques

La résistance à un antipaludique est définie comme "la capacité des parasites à se multiplier et à survivre malgré l'administration et l'absorption d'un principe actif à dose égale ou supérieure à celle usuellement recommandée, dans la limite de tolérance du sujet. La forme active du principe actif doit pouvoir accéder au parasite pendant la durée nécessaire à son action." (Black, 1981). Un échec thérapeutique n'est donc lié à une résistance parasitaire qu'après vérification des dosages plasmatiques des principes actifs permettant d'évaluer l'observance du patient et l'absorption des principes actifs.

La résistance aux antipaludiques a un réel impact en santé publique. Sur le plan individuel, les échecs thérapeutiques qu'elle génère augmentent la mortalité liée au paludisme (Trape, 2001). De plus, la persistance des parasites dans le sang accroît le risque d'anémie sévère et par voie de conséquence la fréquence des transfusions sanguines avec tous les risques que cela comporte. Sur le plan collectif, les résistances augmentent le niveau de transmission du paludisme, ce qui élève le nombre d'accès et donc le coût des consultations par patient. Avec le développement de la médecine humaine ces cinquante dernières années, la pression médicamenteuse engendrée par l'utilisation massive des antipaludiques de synthèse a sélectionné des parasites résistant à la plupart des molécules en circulation. Le premier antipaludique utilisé massivement est la pyriméthamine en Indochine mais la sélection rapide de parasites résistants a conduit à l'utilisation de la chloroquine (Verdrager, 1986). L'emploi substantiel de ce principe actif pendant plusieurs dizaines d'années a simultanément sélectionné, à la fin des années 50, des parasites résistants à la frontière Thaïlande/Cambodge et en Colombie puis au Venezuela, en Papouasie-Nouvelle Guinée et aux Philippines (Wellems & Plowe, 2001). C'est à partir de ces foyers d'émergence asiatiques que la chloroquino-résistance s'est lentement mais graduellement disséminée pour atteindre l'Afrique de l'Est à la fin des années 1970. A ce jour, seuls quelques pays comme le Panama, Haïti ou la République Dominicaine sont indemnes de chloroquino-résistance (Figure 4). C'est alors que tardivement, dans les années 80, les antifoliniques, associés à la sulfadoxine, ont pris le relai de la chloroquine comme première ligne thérapeutique des accès palustres non compliqués dans de nombreux pays. Même si la sélection a été plus lente que pour la pyriméthamine seule, des résistances sont apparues en Asie du Sud Est (Hurwitz, 1981) pour se disséminer ensuite à l'ensemble des zones d'endémies. Compte tenu de son utilisation limitée, la résistance à la méfloquine n'est massivement présente qu'en Asie du Sud Est (Thaïlande,

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Myanmar, Cambodge ; Fontanet, 1993). Quelques cas de méfloquino-résistance ont été décrits au Brésil (Cerutti, 1999). Dans ces zones, des résistances à la quinine sont présentes du fait de l'existence de résistances croisées avec la méfloquine (Giboda & Denis, 1988). En Afrique, la méfloquine et la quinine font preuve d'une efficacité élevée.



Adaptée de l'OMS, 2005.

Figure 4 : Situation de la résistance de *P. falciparum* aux différentes molécules utilisées en 2004.

2.1 - Les mécanismes de résistance

Deux grands types de mécanismes de résistance ont été identifiés : (***i***) pour les lysosomotropes, une perte du mécanisme d'accumulation dans la vacuole digestive (***ii***) pour les antimétabolites, une modification de la cible par acquisition de mutations ponctuelles.

2.1.1 - La résistance aux lysosomotropes

Les premières études sur la résistance à la chloroquine ont montré qu'elle était réversible sous l'action de modulateurs des pompes membranaires comme le vérapamil et qu'elle était liée à un

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

défaut d'accumulation de la chloroquine dans la vacuole digestive. En partant de ce constat, l'hypothèse de l'implication d'un transporteur spécifique de la chloroquine dans la vacuole a été évoquée (Bray, 1998). Pour étudier le mécanisme de résistance à cet antipaludique majeur, un croisement de souche chloroquino-sensible (CQS) et chloroquino-résistante a été effectué (Wellems, 1991 ; Su, 1997). L'étude du génome des parasites issus de ce croisement a permis l'identification d'un gène lié à la résistance à la chloroquine : *pfcrt* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter). Ce gène code pour une protéine de 49 kD localisée dans la membrane de la vacuole digestive du parasite. Chez les progénies de phénotype CQR, ce gène contient huit mutations ponctuelles, situées dans ou à proximité des régions transmembranaires prédites (Figure 5). Des études de transfection ont ensuite précisé l'importance de la mutation K76T du gène *pfcrt* dans la résistance à la chloroquine (Fidock, 2000). Les études épidémiologiques ont révélé la présence de plusieurs mutations supplémentaires à K76T dans le gène *pfcrt*, définissant plusieurs haplotypes mutants. Leur rôle n'est actuellement pas bien défini. Elles pourraient compenser les pertes de fitness liées à la mutation K76T ou moduleraient le niveau de chloroquino-sensibilité des parasites *in vivo* et *in vitro* (Wootton, 2002).

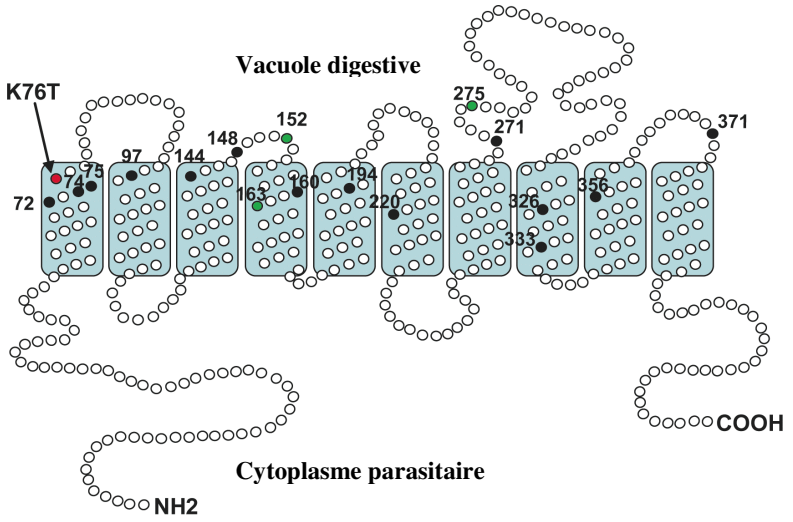


Figure 5 : Position des différentes mutations de PfCRT identifiées à ce jour.

En rouge la position 76, clé de la résistance à la chloroquine ; en noir les mutations associées (Bray, 2005). En vert sont représentées les mutations liées à la résistance à l'halofantrine et l'amantadine (Johnson, 2004).

Il a également été montré que l'expression de certains de ces haplotypes modifie le niveau de sensibilité à d'autres lysosomotropes utilisés seuls ou en association, dans le traitement des accès palustres simples ou graves, comme la quinine, la méfloquine, l'halofantrine, l'amodiaquine ou l'artémisinine (Sidhu, 2002). De plus, la présence de mutations ponctuelles (N86Y

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

principalement) au niveau du gène *pfmdr1* (*P. falciparum* multidrug resistance) module le niveau de résistance à la chloroquine, la quinine, la méfloquine, l'halofantrine et même à l'artémisinine (Duraisingh, 2000 ; Reed, 2000 ; Babiker, 2001). Ce gène code une glycoprotéine (Pgh1), localisée dans la membrane de la vacuole digestive, dont la protéine homologue chez l'Homme est impliquée dans l'efflux de nombreuses molécules anticancéreuses. Une amplification génique de *pfmdr1* a également été évoquée dans la résistance à la méfloquine mais celle-ci reste controversée (Price, 1999 ; Chaiyaroj, 1999). Le mécanisme de résistance aux lysosomotropes est donc complexe et fait intervenir de nombreuses mutations et parfois des amplifications de différents gènes. Cette complexité explique la sélection lente (une cinquantaine d'années) de la résistance à la chloroquine malgré son utilisation massive.

2.1.2 - La résistance aux antimétabolites

La résistance aux antimétabolites implique des mécanismes beaucoup plus simples avec la présence de mutations ponctuelles au niveau des gènes codant les protéines cibles. Ces mutations diminuent les interactions enzyme/ligand, généralement des inhibiteurs compétitifs, en modifiant la conformation des protéines enzymatiques. Ainsi, la résistance aux antifoliques et aux antifoliniques est déterminée par des mutations de gènes impliqués dans la synthèse des folates du parasite. Les mutations ponctuelles au niveau du gène codant la dihydroptéroate synthétase (*pfdhps* A437G, K540E et A581G ; Triglia, 1998) sont responsables de la résistance à la sulfadoxine et aux sulfones. Les mutations au niveau du gène codant la dihydrofolate réductase (*pfdhfr-ts*) sont responsables de la résistance à la pyriméthamine et au cycloguanil, le métabolite actif du proguanil. Ce gène est appelé *pfdhfr-ts* puisqu'il code également la thymidylate synthase. La substitution S108N de PfDHFR-TS est la mutation clé de la résistance de *P. falciparum* aux antifoliniques (Peterson, 1988 ; Cowman, 1988 ; Wu, 1996). Elle peut être associée à d'autres mutations de PfDHFR-TS (N51I, C59R et I164L). Plus le nombre de mutations est élevé, plus le niveau de résistance des parasites est important (Nzila-Mounda, 1998).

2.2 - La dynamique des résistances

Avec l'identification des déterminants génotypiques de la résistance, de nombreuses études rétrospectives sur l'évolution de la résistance à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine ont été réalisées. Des marqueurs microsatellites et des mutations ponctuelles neutres se trouvant

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

dans les régions adjacentes (autour de 5 kb) à ces déterminants de résistance ont été analysés. Les mutations ponctuelles neutres sont peu polymorphes et ont un taux de mutation faible (10^{-9} par position et par génération ; Drake, 1998). *A contrario*, les microsatellites sont très polymorphes et évoluent plus rapidement (Ferdig & Su, 2000). L'étude des microsatellites proches de *pfcrt* sur le chromosome 7 montre que parmi tous les haplotypes chloroquino-résistants qui ont émergé au fil du temps, seuls quatre ont survécu et sont encore identifiés 50 ans plus tard. Ces quatre haplotypes sont origianaires : de Papouasie, d'Amérique du Sud pour deux d'entre eux et d'Asie. Certaines données suggèrent deux origines supplémentaires de la résistance à la chloroquine au Cambodge (Lim, 2003) et aux Philippines (Chen, 2003). La résistance à la chloroquine en Afrique résulte donc de la conquête de 90% des zones impaludées par un mutant ayant émergé en Indochine dans les années 50 (Wotton, 2002). Le mécanisme de résistance aux antimétabolites étant plus simple et l'apparition des mutations du gène *pfdhfr-ts in vivo* (Clyde & Shute, 1957) et *in vitro* (Paget-McNicol & Saul, 2001) ayant été rapide, l'origine de la résistance à la sulfadoxine-pyrimethamine a d'abord été supposée multiple. Les études récentes ont confirmé cette hypothèse pour les simples mutants *pfdhfr-ts*. Cependant, concercant les parasites doubles et surtout triples mutants (*pfdhfr-ts* 108, 51, 59), le nombre d'évènements mutationnels à l'origine du haut niveau de résistance est limité (< 10 ; Cortese, 2002 ; Roper, 2003 ; Nair, 2003). Là encore, la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine en Afrique résulte d'une migration intercontinentale de parasites originaires d'Asie (Roper, 2004).

L'état actuel des connaissances montre que les émergences *de novo* des mutations de résistance qui se sont dispersées dans les zones d'endémie ont eu lieu généralement en Asie. Ces données suggèrent que les résistances émergent plus facilement dans les zones de faible transmission du paludisme du fait d'une polyclonalité et d'une immunité réduites. La polyclonalité étant limitée dans ces régions, la compétition des clones résistants avec les clones sensibles, qui ont généralement un meilleur fitness, est donc réduite tout comme les phénomènes de recombinaison à l'origine de la transmission des allèles. De plus, l'absence d'immunité entraîne un contact plus fréquent des antipaludiques avec un nombre important de parasites puisque presque toutes les infections sont symptomatiques (White, 2004). Dans les zones de forte transmission, les compétitions et les recombinaisons entre parasites sont nombreuses et les résistances disparaissent plus facilement. Il est donc important de prendre en compte le fitness des parasites résistants (Walliker, 2005). Le fitness est défini comme la probabilité que les descendants d'une souche présentant un caractère spécial ont de survivre et de se multiplier. Dans les différents modèles utilisés pour prédire la dispersion de la résistance, une perte de 10% du fitness des

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

parasites résistants est généralement admise. Ainsi, lors de l'arrêt de la pression médicamenteuse, la proportion de parasites sensibles augmente et les parasites résistants circulent à bas bruit (Kublin, 2003). L'élimination du parasite dépend alors presque exclusivement de l'action du principe actif. La dynamique de la résistance est également fortement influencée par la demi-vie du principe actif et sa rapidité d'action. Les principes actifs à demi-vie longue (ex: atovaquone, méfloquine…) permettent de limiter le nombre de prises médicamenteuses, par conséquent d'améliorer l'observance, mais ont le désavantage de persister longtemps dans le sang à des doses sub-thérapeutiques. En zone de transmission, cette persistance augmente la pression médicamenteuse sur la population parasitaire puisque des inoculations de parasites peuvent survenir durant la phase d'élimination d'un principe actif utilisé lors d'un premier accès palustre.

La rapidité de dissémination des résistances à travers le monde ces dernières années ainsi que leur impact sur les populations humaines exposées imposent une surveillance attentive du niveau d'efficacité des différents antipaludiques.

Ce travail de thèse a pour objectif d'approfondir les connaissances actuelles sur la résistance à une association d'antipaludiques récemment commercialisée, l'atovaquone/proguanil pour permettre d'optimiser son usage et de prolonger sa durée d'efficacité.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

3. L'association atovaquone-proguanil (AP)

3.1 - Les origines de l'association

C'est lors d'un large criblage moléculaire à la fin des années 30 que la première hydroxynaphtoquinone, l'**hydrolapachol**, a été identifiée pour ses propriétés antipaludiques. Son activité et celle de la **lapinone** sont ensuite confirmées sur les plasmodies aviaires *P. lophurae* et *P. gallinaceum* et chez quelques patients (Fieser, 1948 ; Hooker & Richardson, 1948). Les premiers essais cliniques rapporteront cependant une action moins marquée sur les plasmodies humaines à cause d'une métabolisation et d'une oxydation des quinones (Fawaz & Haddad, 1951). Quelques années plus tard, la mitochondrie plasmodiale est identifiée et l'existence de voies métaboliques impliquant la vitamine K et le coenzyme Q est évoquée (Rudzinska & Trager, 1957). Les années 48-60 sont marquées par la description des premières résistances de *P. falciparum* au proguanil et à la chloroquine (Field & Edeson, 1949 ; Chaudhuri, 1948 ; Harinasuta, 1965). De ce fait, le besoin de nouveaux antipaludiques se fait plus pressante et les hydroxynaphtoquinones sont alors mises en perspective. La publication de l'inhibition de la succinate déshydrogénase par les hydroxynaphtoquinones, réversible par l'addition de coenzyme Q_{10} (Hendlin & Cook, 1960 ; Takemori & King, 1964), confirme l'activité antagoniste de cette classe de principes actifs sur les coenzymes Q_8 et Q_9 de *Plasmodium* (Rietz, 1967). L'étude approfondie des relations structure/activité des quinones est alors menée par Fieser. Basée sur une recherche d'analogie avec le coenzyme Q, elle a pour objectif de trouver de nouveaux composés moins rapidement métabolisés en modifiant les chaînes latérales de l'hétérocycle naphtoquinone (Figure 6 ; Fieser, 1967).

Le composé le plus prometteur est la **menoctone**, un inhibiteur du système NADH déshydrogénase/coenzyme Q (Skelton, 1968) qui possède une activité antipaludique préventive et curative sur une plasmodie murine, *P. berghei* (Berberian, 1968 ; Skelton, 1970). Cependant, les conclusions des travaux sur cette molécule montrent que son activité reste insuffisante sur les plasmodies simienne et humaine du fait de sa faible absorption (Porter & Folkers, 1974). Viendra ensuite un composé actif sur un autre apicomplexe parasite des bovins, *Theileria parva*, la **parvaquone** (encore utilisée en médecine vétérinaire), qui possède également une action sur *Plasmodium* (Boehm, 1981). Cette propriété de la parvaquone laisse augurer une activité antiprotozoaire large de la famille des hydroxynaphtoquinones.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

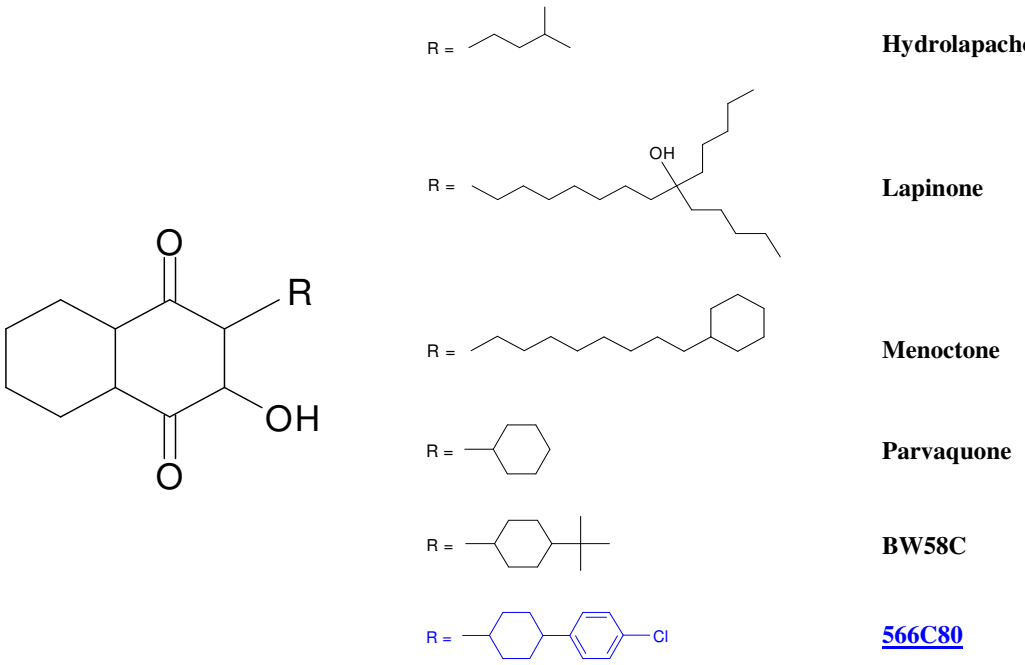


Figure 6 : Evolution de la structure des hydroxynaphtoquinones.

C'est alors que les laboratoires Wellcome [aujourd'hui GlaxoSmithKline (GSK)] prennent le relais des recherches. En 1985, ils présentent le **BW58C** actif sur une plasmodie murine, *P. yoelii*, mais très instable et rapidement dégradé (Hudson, 1985). Alors que le mode d'action des hydroxynaphtoquinones vient d'être élucidé, la substitution de la position 4 du cycle cyclohexane par un groupement hydrophobe augmente considérablement l'activité du BW58C et aboutit au début des années 80 à la synthèse d'un composé très actif le **566C80** ou 3-[trans-4-(4-chlorophényl)cyclohexyl]-2-hydroxyl-1,4-naphtoquinone baptisé **atovaquone**. Cette molécule possède une activité antiprotozoaire large spectre puisqu'elle agit sur *Plasmodium sp.*, (Pudney, 1988 ; Davies, 1989), sur *Leishmania donovani* (Croft, 1992), sur *Pneumocystis carinii* (Hughes, 1990) et sur *Toxoplasma gondii* (Kovacs, 1992). Contrairement aux autres molécules de cette famille, l'atovaquone n'est ni métabolisée ni oxydée chez l'homme. Au début des années 1990, le besoin urgent de traitement contre les infections opportunistes chez le sidéen assure son développement rapide (Hudson, 1991 ; Gutteridge, 1991). Elle sera commercialisée en 1994 sous les noms de Mepron® (USA) et Wellvone® (UE). Dans le paludisme, il faut attendre 1995 pour que soient menés les premiers essais cliniques chez l'homme dans le traitement des accès palustres simples à *Plasmodium falciparum* (Chiodini, 1995 ; Looareesuwan, 1996). Des échecs

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

thérapeutiques apparaissent immédiatement chez un tiers des sujets traités, certains liés à l'émergence de parasites résistants (cf §3.5.1). Pour contrer ces résistances, les synergies d'action identifiées entre l'atovaquone et les tétracyclines, le clopidol ou le proguanil lors des études précliniques (Latter 1984) sont rapidement confirmées chez l'homme (Looareesuwan, 1996). C'est le proguanil, grâce à sa très bonne tolérance, qui est choisi pour être associé à l'atovaquone (Canfield, 1995). L'association **atovaquone-proguanil** (AP) montre alors une grande efficacité, y compris chez les patients infectés par des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes au proguanil (Looareesuwan, 1999 ; Blanchard 1994). En 1996, l'association est commercialisée aux Etats Unis sous le nom déposé de Malarone®. En Europe, elle obtient l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour le traitement curatif des accès palustres simples à *P. falciparum* chez l'adulte et l'enfant de plus de 40 kg en août 1998 (Tableau 2). Il faut attendre juillet 1999 pour qu'elle soit mise sur le marché en France pour un coût d'environ 40€ le traitement d'un accès palustre (12 comprimés). En 2001, l'AMM est étendue au traitement prophylactique de *P. falciparum* chez l'adulte et l'enfant de plus de 40 kg. Depuis juin 2003, dans cette indication, une forme pédiatrique pour les enfants de 11 à 40 kg est également autorisée et disponible. En France, la durée maximale d'administration de l'atovaquone-proguanil en prophylaxie est fixée à trois mois.

Tableau 2 : Principales caractéristiques de l'atovaquone-proguanil.

<table>
<tr><td></td><td></td><td>Traitement</td><td>Prophylaxie</td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="4">Posologie journalière</td><td>11-20kg</td><td rowspan="3">Hors AMM</td><td>1 cp 62,5/25mg</td><td rowspan="3">de la veille du départ jusqu'à 7 jours suivant le départ de la zone d'endémie</td></tr>
<tr><td>21-30kg</td><td>2 cp 62,5/25mg</td></tr>
<tr><td>31-40kg</td><td>3 cp 62,5/25mg</td></tr>
<tr><td>+ 40kg</td><td>4 cp 250/100mg pendant 3 jours</td><td>1 cp 250/100mg</td><td></td></tr>
<tr><td>Administration</td><td colspan="4">En une seule prise, à heure fixe, au cours d'un repas riche en graisse</td></tr>
<tr><td>Contre-indication</td><td colspan="4">Insuffisants rénaux</td></tr>
<tr><td>Précautions d'emploi</td><td colspan="4">Personnes de plus de 65 ans, femme enceinte et allaitante
Patients présentant des diarrhées et des vomissements importants</td></tr>
<tr><td>Interactions médicamenteuses</td><td colspan="4">Métoclopramide (diminution de la biodisponibilité de l'atovaquone)
Rifampicin, rifabutine, tétracyclines (diminution des concentrations d'atovaquone)</td></tr>
</table>

L'atovaquone-proguanil est une association très bien tolérée dont les principaux effets secondaires rapportés, maux de tête et troubles gastro-intestinaux, se confondent avec les symptômes causés par la maladie (Osei-Akoto, 2005) ou se rencontrent en prophylaxie, qu'elle soit longue ou courte, en proportion égale au placebo (McKeage & Scott, 2003).

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Chez l'animal (rat et lapin), aucun effet tératogène n'a été mis en évidence mais une augmentation de l'incidence des résorptions embryonnaires ainsi qu'une diminution de la taille et du poids du fœtus ont été observées suite à la prise d'atovaquone. A ce jour, plus de 200 femmes ont été exposées à l'atovaquone-proguanil durant leur grossesse, quelques cas d'avortements spontanés ont été rapportés mais les données sont incomplètes pour les associer à la prise d'atovaquone-proguanil. Deux études ont parallèlement montré que, combinée à l'artésunate ou non, l'association était efficace et bien tolérée pour le traitement de *P. falciparum* durant le deuxième et le troisième trimestre de grossesse (n = 65 ; Na-Bangchang, 2005 ; McGready, 2005). Par précaution, il est préférable de ne pas administrer cette association au cours de la conception et pendant le premier trimestre de grossesse et de ne l'utiliser par la suite qu'en cas de nécessité. L'association est également déconseillée durant l'allaitement puisque 30% des concentrations plasmatiques d'atovaquone sont retrouvés dans le lait maternel chez la Rate. Chez la Femme, aucune donnée n'est disponible.

3.2 - Propriétés pharmacocinétiques

L'atovaquone est une molécule très lipophile ayant une solubilité dans l'eau inférieure à 2.10^{-4} $mg.ml^{-1}$. Elle est lentement absorbée *per os* puisqu'il faut 2,63 heures pour que 50% de la dose soit absorbée. La présence de diarrhées chez le patient peut entraîner une diminution de l'absorption du principe actif. Sa biodisponibilité est faible avec un maximum de 23% si le principe actif est administré en présence de corps gras (Rolan, 1994). Ces derniers favorisent en effet la dissolution puis l'absorption de l'atovaquone au niveau intestinal et augmentent jusqu'à 3,3 fois l'aire sous la courbe de la concentration plasmatique (AUC) et 5,3 fois la concentration maximale (C_{max}). Inversement, le contenu et le pH stomacal n'influencent pas les concentrations sanguines d'atovaquone (Vertzoni, 2005). L'AUC est proportionnelle à la dose, pour des doses comprises entre 450 et 750 mg. Au-delà, les paramètres pharmacocinétiques ne sont plus influencés par la dose (Hussein, 1997). La C_{max} est atteinte au bout de 4 à 5 heures. La pharmacocinétique de l'atovaquone présente une très grande variabilité interindividuelle avec des coefficients de variation de 107% de la C_{max}, de 90% de l'absorption, de 55% du volume de distribution ou encore de 65% de la clairance (Hussein, 1997). L'atovaquone est fortement liée aux protéines plasmatiques (> 99%) sans déplacement possible et ne s'accumule pas dans les globules rouges puisque les concentrations plasmatiques sont deux fois plus élevées que les concentrations sanguines (Beerahee, 1999). L'atovaquone n'est pas métabolisée, elle est excrétée

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

dans les fèces par la bile sous forme inchangée pendant plus de 21 jours. Un pour cent seulement du principe actif est éliminé dans les urines (Rolan, 1997). Sa demi-vie est comprise entre 41 et 93 heures, généralement de l'ordre de 59 heures (Gillotin, 1999).

Le proguanil a une absorption importante avec une biodisponibilité de l'ordre de 60% (Beerahee, 1999). Sa C_{max} (1,8 µM) est atteinte en 2 à 6 heures (Gillotin, 1999). Il s'accumule dans les globules rouges puisque les concentrations sanguines sont cinq fois supérieures aux concentrations plasmatiques et sa liaison aux protéines plasmatiques est de l'ordre de 75% (Wattanagoon, 1987). Le proguanil est métabolisé en cycloguanil, métabolite actif, par les isoenzymes 2C19 et 3A4 du cytochrome P450. Deux populations d'individus se distinguent alors sans influencer l'efficacité de l'association atovaquone-proguanil (Edstein, 1996), les métaboliseurs lents et rapides. Le proguanil est excrété pour 40 à 60% dans les urines, le reste dans les fécès et sa demi-vie est de l'ordre de 14 heures.

Les principales données concernant les paramètres pharmacocinétiques de l'atovaquone et du proguanil sont résumées sont le tableau ci-dessous (Tableau 3).

Tableau 3 : Données pharmacocinétiques de l'atovaquone et du proguanil.

Paramètres pharmacocinétiques			Atovaquone	Proguanil
Biodisponibilité			23%	60%
t_{max} (heures)			4 - 5	2 - 6
Volume de distribution (l/70kg)[a]			559	1399
Liaison aux protéines plasmatiques			99%	75%
Rapport [GR]/[plasmatique]			0,25	5
Métabolisation			Aucune	Cyt P450 3A4 et 2C19
Demi-vie d'élimination (heure)[b]			41 - 93	12 - 15
Elimination			Hépatique	Urinaire
C_{max} (µM)	Prophylaxie	Enfant	ND	ND
		Adulte[1]	8,39-26,3	0,26-0,74[MR] ; 0,53-0,83[ML]
	Traitement	Enfant[2]	8,2-19,6	0,68-1,43
		Adulte[3]	21,43-44,05	1,21-2,83
AUC ($h.\mu M^{-1}$)	Prophylaxie	Enfant	ND	ND
		Adulte[1]	165-562	3,29-9,10[MR] ; 3,88-11[ML]
	Traitement	Enfant[2]	95-787	11,78-20,23
		Adulte[3]	673-2505	12,24-28,81

[a]variable en fonction du poids (=l'âge) de l'individu ; [b]variable en fonction de l'origine éthnique ; [1]n=13 volontaires sains, prise en mangeant (Thapar, 2002) ; [2]n=30 patients impaludés, prise 30 minutes après une boisson nutritive (Sabchareon, 1998) ; [3]n=18 volontaires sains, prise en mangeant (Gillotin, 1999) ; [MR]métaboliseurs rapides ; [ML]métaboliseurs lents ; ND = non déterminé ; t_{max} : durée pour atteindre la concentration maximale (C_{max}) ; AUC : aire sous la courbe.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

L'administration simultanée d'atovaquone et de proguanil influence peu les paramètres pharmacocinétiques propres à chacun des principes actifs (Gillotin, 1999). Les données décrites ci-dessus seront également applicables aux enfants, à l'exception de la demi-vie de l'atovaquone qui est réduite à 32 heures. Les variations inter-individuelles sont également moins marquées dans cette population (Sabchareon, 1998). Chez la femme enceinte, la C_{max} et l'AUC de l'atovaquone sont diminuées de moitié (Na-Bangchang, 2005).

Deux facteurs majeurs influencent la pharmacocinétique de l'atovaquone-proguanil, le poids et l'origine ethnique (Hussein, 1997). Le poids joue un rôle majeur puisqu'il influence à la fois la clairance mais aussi le volume de distribution des principes actifs. Selon les auteurs, lorsque le poids double de 40 à 80 kg, les clairances de l'atovaquone et du proguanil sont augmentées respectivement de 31% et 72% et leurs volumes de distribution de 91% et 84%. Ces résultats sont cependant à analyser avec précaution, surtout concernant la clairance de l'atovaquone puisque aucune tendance ne se dessine vraiment entre 40 et 80 kg mais plutôt entre 10-30 kg et 40-70 kg donc principalement entre les enfants et les adultes. L'origine ethnique influence la clairance de l'atovaquone avec une augmentation de 165% (13% pour le proguanil) chez les sujets d'origine asiatique comparée aux sujets d'origine africaine ou caucasienne. Deux hypothèses sont alors évoquées par les auteurs : (*i*) un transport hépatocytaire et une excrétion biliaire de l'atovaquone plus importants dans les populations asiatiques, et (*ii*) une fraction libre d'atovaquone plus importante dans ces populations du fait d'une concentration plasmatique d'α 1-glycoprotéine, une protéine fixant l'atovaquone, plus faible (Johnson, 2000). Au final, la demi-vie moyenne de l'atovaquone est de 84 heures chez les Africains, de 50 heures chez les Caucasiens et de 32 heures chez les Asiatiques.

3.3 - Mécanisme d'action

La famille des hydroxynaphtoquinones est une famille de composés connue initialement pour inhiber la respiration des globules rouges parasités (Wendell, 1946) en agissant au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale du *Plasmodium* entre le cytochrome *b* et le cytochrome *c* (Ball, 1947 ; Hendlin & Cook, 1960). Ces composés agissent en fait sur de nombreuses enzymes mitochondriales (NADH oxidase, succinate déshydrogénase, dihydroorotate déshydrogénase, etc…) toutes donneuses d'électrons au coenzyme Q_8 (Fieser, 1967 ; Roberts, 1978). Le rôle de la mitochondrie et le fonctionnement de la chaîne de phosphorylation oxydative chez *Plasmodium* sont donc à considérer pour préciser le mode d'action.

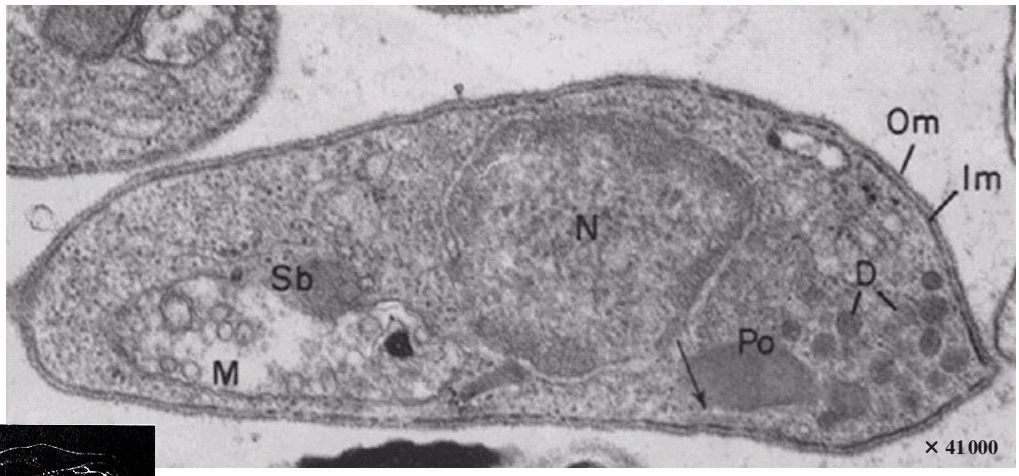
tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

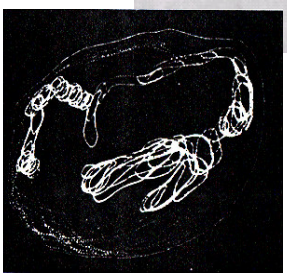
3.3.1 - La mitochondrie de *P. falciparum*

3.3.1.1 - Ultrastructure

L'origine des mitochondries est unique puisqu'elles sont le fruit d'une endosymbiose entre une archée et une α-protéobactérie (Margulis, 1975). Cependant au cours de l'évolution, des adaptations ont eu lieu créant de nombreuses particularités propres aux différents embranchements, genres voire même espèces. La mitochondrie plasmodiale est transmise par le macrogamète femelle (Creasey, 1994). Elle est localisée du côté postérieur du noyau, proche de l'apicoplaste (Figure 7 ; Aikawa, 1971). De façon assez atypique, les formes asexuées de *P. falciparum* ne contiennent qu'une seule mitochondrie (Slomianny & Prensier, 1986). Elle est classiquement constituée d'une double membrane, de granules denses, d'un génome et de crêtes (Fry & Beesley, 1991). Les crêtes mitochondriales sont des invaginations de la membrane interne où siège la respiration. Plus l'organisme a besoin d'énergie, plus il respire et consomme de l'oxygène et plus ses mitochondries possèdent un nombre important de crêtes. Les plasmodies étant microaérophiles (Scheibel, 1979), leur mitochondrie a généralement peu de crêtes mais au cours de la maturation parasitaire, le nombre de crêtes augmente proportionnellement à l'activité métabolique des parasites. Les besoins énergétiques et la consommation d'oxygène étant plus importants chez les schizontes et les stades sexués (4 à 8 mitochondries par gamétocytes), à ces stades, les mitochondries ont davantage de crêtes (Krungkrai, 1999).



D'après Hepler, 1966.



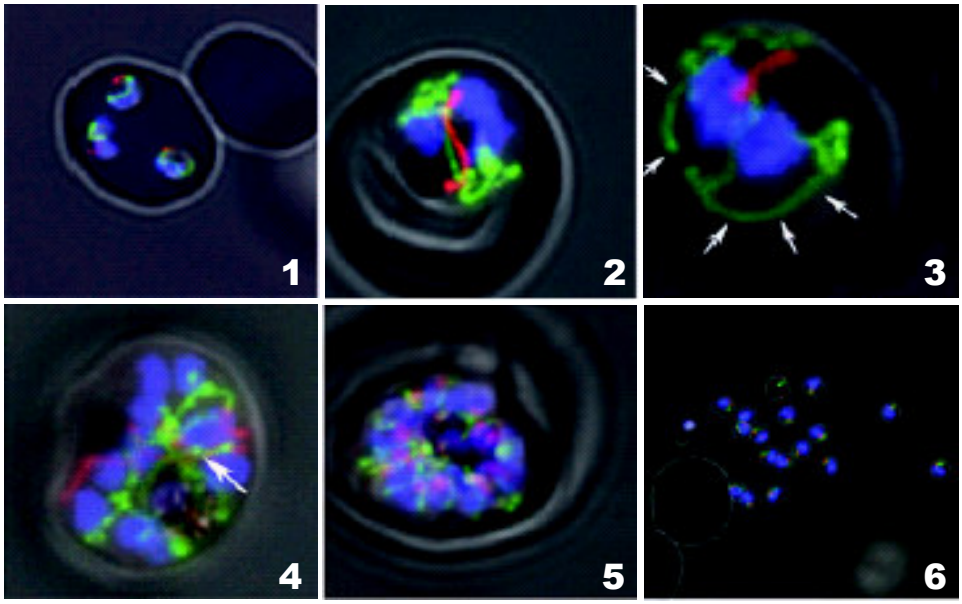
D'après Slomianny & Prensier, 1986.

Figure 7: Structure de la mitochondrie de *Plasmodium*.

a) Mérozoïte de *P. fallaz* en microscopie électronique. La mitochondrie (M) est du côté postérieur du noyau (N). Sont également indiqués les membranes externe (Om) et interne (Im), les organelles et granules denses du complexe apical (Po et D) et l'apicoplaste (Sb).

b) Reconstituée en trois dimensions.

Au cours du cycle parasitaire, la structure mitochondriale est en constante évolution et est en étroite relation avec l'apicoplaste (Figure 8 ; Divo, 1985). Dans les trophozoïtes âgés, chaque apicoplaste fils est associé à une évagination mitochondriale. Pour certains auteurs ce rapprochement serait nécessaire à la bonne répartition des organites durant la division parasitaire (van Dooren, 2005).



Adaptée de van Dooren, 2005.

Figure 8 : Evolution de la structure mitochondriale de *P. falciparum* en fonction du stade de développement parasitaire visualisée à l'aide de protéines fluorescentes.

Le noyau est visualisé en bleu, la mitochondrie en vert grâce à la citrate synthase fluorescente et l'apicolaste en rouge par l'intermédiaire d'une protéine transportrice d'acyl fluorescente. Très fine (0,1µM), généralement allongée et dense aux électrons au stade mérozoïte (Fig. 1), la mitochondrie grossit (0,4µM au stade trophozoïte) puis s'allonge au cours de la maturation parasitaire (Fig. 2) pour devenir très irrégulière puis ramifiée chez les trophozoïtes âgés (Fig. 3). Elle finit par entourer les différents organites destinés à chaque cellule fille, et plus particulièrement les noyaux (Fig. 4). La segmentation des schizontes s'accompagne tout d'abord d'une division de l'apicoplaste puis d'une fragmentation mitochondriale aléatoire (Fig. 5) pour former les nouveaux mérozoïtes (Fig. 6). Au cours du cycle parasitaire la mitochondrie est en contact étroit avec la membrane plasmique parasitaire (flèches Fig. 3) ainsi qu'avec l'apicoplaste (flèches Fig. 4).

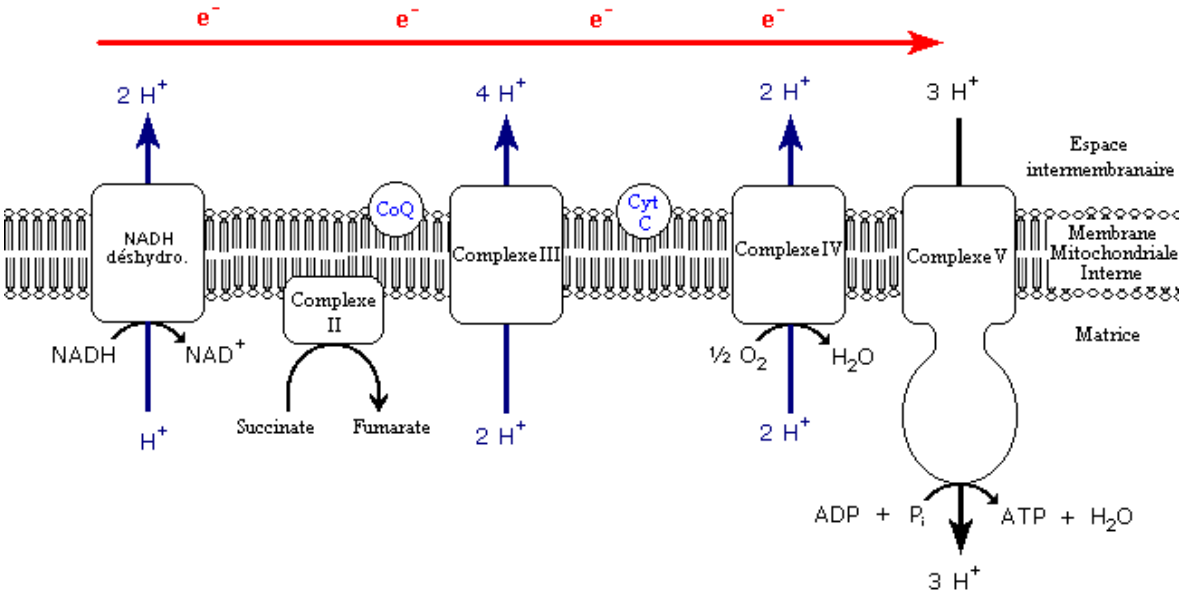
tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

3.3.1.2 - Les fonctions mitochondriales

Chez les organismes aérobies, le rôle de la mitochondrie est d'assurer la synthèse et le stockage d'énergie sous forme d'ATP grâce à l'oxydation des nutriments de l'organisme. Deux voies métaboliques interviennent dans cette synthèse : la glycolyse aérobie localisée au niveau du cytoplasme cellulaire, et le couplage cycle de Krebs / phosphorylation oxydative localisés respectivement, au niveau de la matrice et des crêtes mitochondriales. Ce système a un rendement énergétique élevé puisque la glycolyse d'une mole de glucose entraîne la production de 36 moles d'ATP. Le *Plasmodium* est un organisme microaérophile qui ne peut vivre qu'en présence d'une faible concentration d'oxygène (optimum 0,5 à 3% ; Scheibel, 1979). Sa principale source d'ATP provient donc de la glycolyse anaérobie (Sherman, 1979). Lors de cette réaction, une mole de glucose consommée entraîne la formation de deux moles d'ATP et d'acide lactique. Malgré l'absence de glycolyse aérobie, tous les gènes codant pour les enzymes du cycle de Krebs ont été identifiés et une chaîne de phosphorylation oxydative fonctionnelle existe chez *Plasmodium* (Gardner, 2002).

Cette chaîne est située dans la membrane interne mitochondriale. Elle fait intervenir une série de **complexes mitochondriaux protéiques** composés de cytochromes ou de coenzymes et d'une protéine fer-soufre. Les **cytochromes** sont des métallo-porphyrines composées d'un coenzyme, d'un atome de fer et d'une protoporphyrine transporteur d'électrons. Les **coenzymes** sont des transporteurs non protéiques d'électrons et de protons (ex: ubiquinone, NAD^+…) alors que les protéines fer-soufre sont des transporteurs protéiques contenant des atomes de fer. Chaque complexe possède un potentiel d'oxydoréduction standard particulier (E'_0) permettant de caractériser son pouvoir oxydant. Leur nomenclature est définie par leur position dans la chaîne (le complexe III est le troisième complexe), par leur composition (le complexe III est aussi appelé bc_1 car composé du cytochrome *b* et du cytochrome c_1), ou enfin par les molécules donneuses et accepteuses d'électrons de part et d'autre du complexe (le complexe III est encore appelé ubiquinone-cytochrome *c* réductase car l'électron est donné par l'ubiquinone puis transporté jusqu'au cytochrome *c*). La chaîne de phosphorylation oxydative plasmodiale est composée : d'un complexe I non conventionnel semblable à celui des trypanosomes et des levures, insensible à la roténone, se limitant à une NADH déshydrogénase alternative (Biagini, 2006), d'un complexe II ou succinate-ubiquinone oxydoréductase (Suraveratum, 2000), d'un complexe III ou ubiquinone-cytochrome *c* oxydoréductase (Krungkrai, 1997), d'un complexe IV ou cytochrome *c* oxydase (Krungkrai, 1997) et d'un complexe V ou ATP synthase (Figure 9).



Adaptée de http://www.gwu.edu/~mpb/oxidativephos.htm

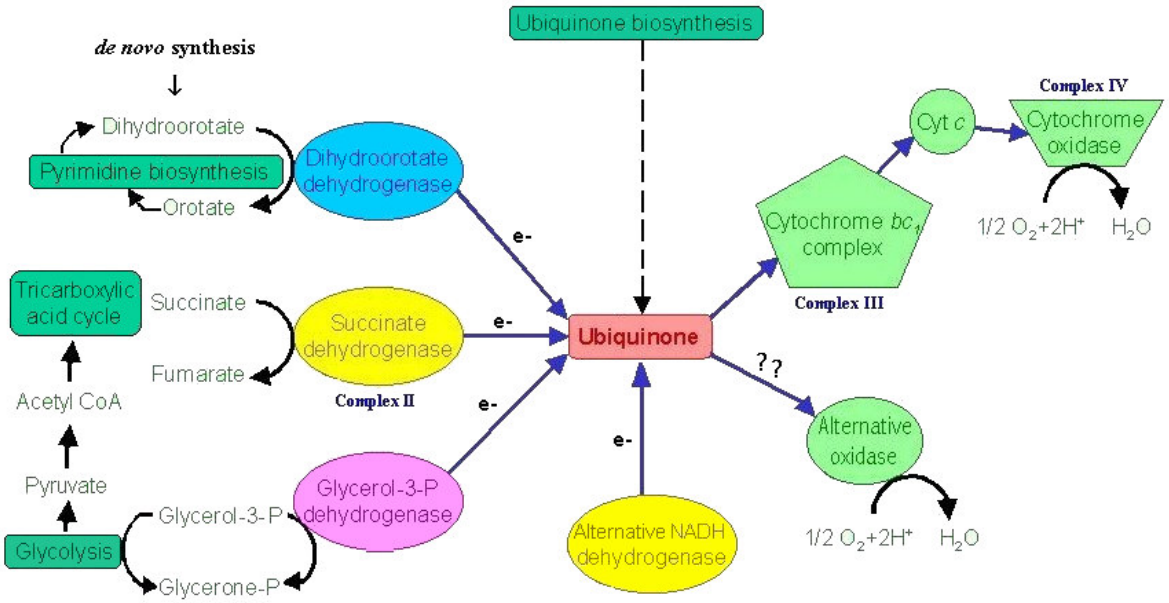
Figure 9 : Chaîne de phosphorylation oxydative de *P. falciparum*.

La phosphorylation oxydative consiste en un transfert d'électrons unidirectionnel grâce à l'oxydation et la réduction des différentes molécules des complexes selon un potentiel redox standard (E'_0) croissant. Au niveau des complexes I, III et IV, ce mouvement d'électrons s'accompagne d'une expulsion de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire ce qui génère un gradient électrochimique ou potentiel de membrane nécessaire à l'importation/exportation cytoplasme/mitochondrie de nombreuses molécules (Mitchell, 1979). L'importation de molécules dans la mitochondrie est essentielle à la survie du parasite puisque de nombreuses protéines assurant les fonctions mitochondriales sont synthétisées au niveau nucléaire (Schwarz & Neupert, 1994). L'intensité du fonctionnement de cette chaîne est donc dépendante des besoins métaboliques du parasite.

Au milieu de la chaîne, deux petites molécules liposolubles interviennent le long de la face externe de la membrane interne comme transporteurs mobiles d'électrons, le coenzyme Q ou ubiquinone et le cytochrome *c*. Ces deux éléments permettent le transfert d'électrons entre les différents complexes et ce par "collision". Dans les années 60, Rietz et *al.* montrent que l'isoforme majoritaire du coenzyme Q synthétisée par *P. falciparum* est l'isoforme Q_8 (Rietz, 1967). En position centrale dans la chaîne, cette benzoquinone mono-insaturée à 8 isoprènes

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

réoxyde les enzymes des différentes voies métaboliques en acceptant les électrons avant de les transférer au cytochrome *b* du complexe III (Figure 10 ; Krungkrai, 2004). Sans cette réoxydation, ces voies métaboliques sont totalement inhibées. Chez *Plasmodium*, deux voies sont totalement dépendantes du fonctionnement de l'ubiquinone : la respiration aérobie par l'intermédiaire de l'alpha glycérophosphate déshydrogénase, de la succinate déshydrogénase et de la NADH déshydrogénase, et la voie de synthèse des pyrimidines par l'intermédiaire de la dihydroorotate déshydrogénase (DHOD). Alors que la respiration aérobie n'est que secondaire chez les plasmodies, la voie de synthèse des pyrimidines est essentielle à leur survie puisqu'elles sont incapables d'utiliser les pyrimidines de l'hôte (Gutteridge & Trigg, 1970 ; van Dyke, 1970 ; Takashima, 2001). La DHOD, enzyme clé de cette synthèse, est codée au niveau nucléaire (chromosome 6). D'une taille de 56 kDa, elle est active sous forme monomérique. Parmi les sept enzymes de cette voie, elle est la seule à être localisée au niveau de la membrane interne mitochondriale (Krungkrai, 1995). Chez les trophozoïtes âgés et les schizontes, stades où se déroule la synthèse des acides nucléiques, son activité est multipliée par un facteur 30 (Newbold, 1982 ; Gero, 1984).



Adaptée de Krungkrai, 2004.

Figure 10 : Rôle de l'ubiquinone parmi les différentes voies métaboliques de *P. falciparum*.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

L'ubiquinone est une molécule très ubiquitaire, d'où son nom, qui est localisée dans de nombreuses endomembranes cellulaires de la plupart des organismes vivants, plus particulièrement au niveau de l'appareil de Golgi (Crane, 1977). Agent anti-oxydant puissant, elle empêche la formation de radicaux libres et protège ainsi les membranes cellulaires et les lipoprotéines de l'oxydation, les lipides de la peroxydation (Ernster & Forsmark-Andree, 1993). Chez les organismes sensibles à l'oxydation comme *Plasmodium*, cette fonction pourrait être essentielle mais encore largement inexplorée (Golenser, 1991).

Chez certains protozoaires comme les trypanosomes ou chez les plantes et les champignons, la présence d'une oxydase alternative (AOX) a été décrite (Chaudhuri, 1995 ; Figure 10). Cette enzyme permet de transférer directement les électrons de l'ubiquinone à l'oxygène sans passer par les complexes III et IV. Elle a la particularité d'être inhibée par l'acide salicylhydroxylamique (SHAM) et le n-propyl gallate mais d'être insensible aux cyanures (Vanlerberghe & McIntosh, 1997). Son rôle physiologique serait soit de recycler rapidement le pool d'ubiquinone quand l'activité respiratoire est élevée et la voie classique saturée (Sluse & Jarmuszkiewicz, 1998), soit de protéger la mitochondrie des attaques oxydatives en limitant la formation de radicaux oxygénés (Day & Wiskich, 1995). Chez *Plasmodium*, l'existence d'AOX a été envisagée puisque environ 25% de la consommation plasmodiale d'oxygène est résistante à l'action des cyanures et que 50% de la croissance parasitaire est inhibée par SHAM (Murphy, 1997). Une étude a clairement montré que la proportion de la consommation d'oxygène inhibée par SHAM est diminuée par l'application d'atovaquone à forte concentration (10µM) (Suswan, 2001). La présence d'une telle voie pourrait donc jouer un rôle primordial dans la biologie de cette espèce très sensible à l'oxydation et au stress oxydant. A ce jour, peu d'études se sont intéressées à cette éventualité et aucune protéine de ce type n'a été identifiée.

Au final, la phosphorylation oxydative plasmodiale a un rôle anabolique qui permet :

- de générer un potentiel de membrane nécessaire au transport des métabolites et des protéines à travers la membrane mitochondriale,

- de ré-oxyder de nombreuses enzymes du métabolisme pour permettre : (***i***) le fonctionnement des différentes voies métaboliques, particulièrement la voie de synthèse des pyrimidines, et (***ii***) de lutter contre la formation de radicaux oxygénés.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

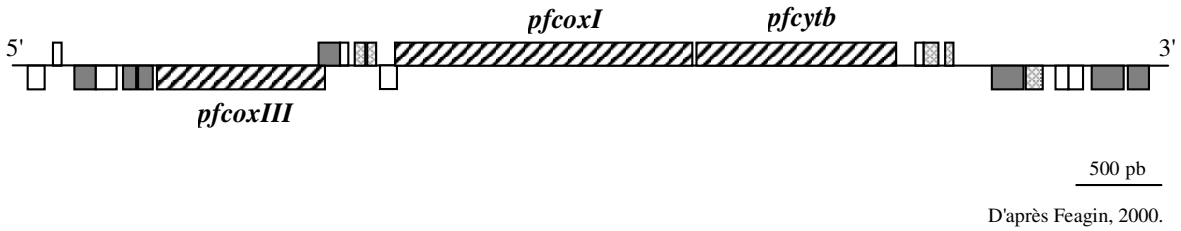
3.3.1.3 - Le génome mitochondrial

Le génome mitochondrial (ADNmt) et le génome de l'apicoplaste (ADNpl) constituent les deux génomes extra-nucléaires plasmodiaux (Wilson & Williamson, 1997). Longtemps confondu avec l'ADNpl, le génome mitochondrial n'est clairement identifié qu'à la fin des années 80 chez *P. yoelii* (Vaidya & Arasu, 1987). Fruits d'une endosymbiose, les génomes mitochondriaux sont tous apparentés. Le génome mitochondrial de *Plasmodium* a cependant fortement dérivé (Gray, 1999). Contrairement aux animaux et aux plantes, les protistes ont des taux de mutation nucléaire (μ_n) et mitochondriaux (μ_m) similaires (Lynch, 2006). Pour *Plasmodium*, le rapport μ_m/μ_n est estimé à 0,42 (Lynch, 2006 ; Joy 2003). Codant pour des fonctions vitales, sa séquence est très conservée entre les espèces plasmodiales (plus de 90% d'homologie ; Feagin, 2000). N'étant pas l'objet de recombinaison au cours de la reproduction sexuée et ne présentant pas de signe de sélection intense, ce génome est un bon marqueur pour les études phylogénétiques (McIntosh, 1998 ; Joy, 2003). Par ce moyen, les chercheurs ont ainsi pu déterminer que *P. falciparum* avait un ancêtre commun avec *P. reichenowi* du chimpanzé il y a 4,5 millions d'années et qu'il était initialement présent en Afrique[1] (Escalante, 1998). Il a secondairement colonisé l'Asie du Sud-Est et l'Amérique du Sud il y a environ 40 000 à 130 000 ans (Joy, 2003).

Composé de 68% d'A/T, ce patrimoine génétique a une transmission uniparentale par les macrogamètes femelles. D'une taille de 6 kb, il est le plus petit génome mitochondrial identifié à ce jour (Feagin, 2000). Majoritairement présent sous forme linéaire avec une petite proportion (5%) de formes circulaires, sa séquence est répétée en tandem jusqu'à 20 fois chez *P. falciparum* (Joseph, 1989). Chacun des tandems est constitué de deux à cinq copies de génome (Preiser, 1996). Six phases ouvertes de lecture ont été identifiées mais seules les trois plus grandes (> 450 pb) apparaissent fonctionnelles et codent trois protéines mitochondriales : le cytochrome *b* (*pfcytb*) et les sous-unités I et III de la cytochrome *c* oxydase (*pfcoxI* ; *pfcoxIII* ; Figure 11 ; Vaidya, 1989 ; Feagin, 1992). Une séquence de 12 nucléotides (TATTTTTTGTTT) a été identifiée dans les régions 5' de l'ADN et de l'ARNm de ces trois gènes (Suplick, 1990). Il pourrait s'agir d'une séquence promotrice ou d'une séquence signal pour les modifications post-transcriptionnelles des ARN. Seul le gène *pfcytb* possède un codon d'initiation ATG (Feagin, 1994). Etant séparé du gène de la cytochrome *c* oxydase I par 30 nucléotides uniquement, certains auteurs ont envisagé une cotranscription de ces deux gènes. De façon assez caractéristique, l'ADNmt plasmodial ne code pour aucun ARN de transfert mais pour une

[1] Les deux espèces se seraient séparées lors de la divergence des genres *Homo* et *Pan* , il y a 4 à 5 millions d'années (Ayala & Rich, 2000).

vingtaine d'ARN ribosomaux (Feagin, 1994). Bien qu'elles soient fragmentées à travers tout le génome, leurs séquences sont exprimées et codent pour les grandes ($ARNr_{lsu}$) et les petites ($ARNr_{ssu}$) sous-unités ribosomiques, respectivement 28S et 5,8S.



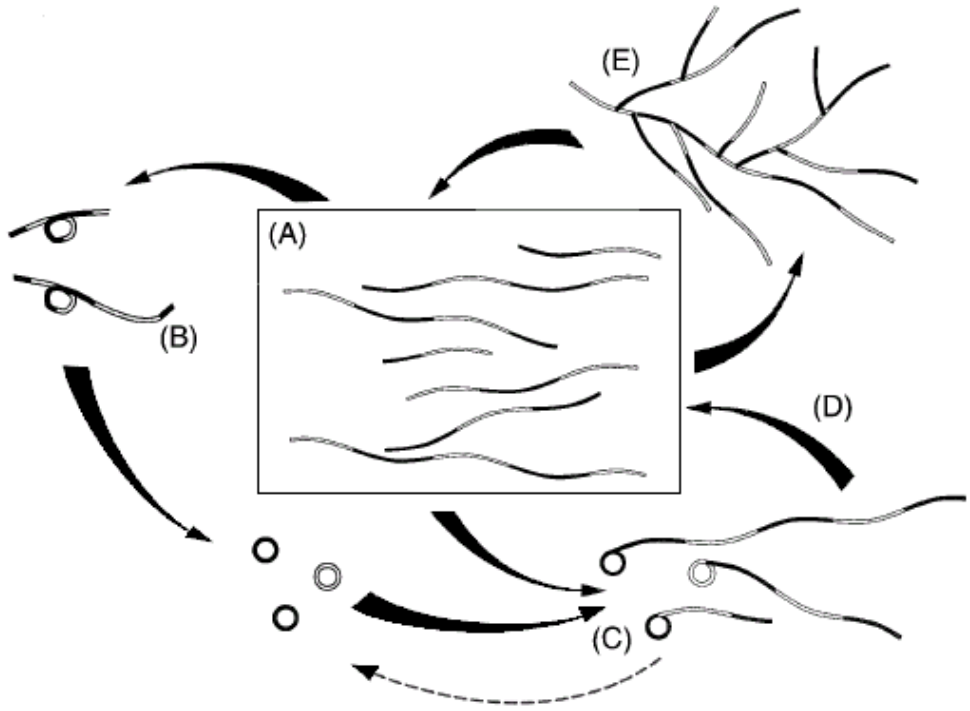
D'après Feagin, 2000.

Figure 11 : Représentation schématique du génome mitochondrial de *P. falciparum* (6kb).

Les trois régions codant la cytochrome oxydase I et III (*pfcoxI*, *pfcoxIII*) et le cytochrome *b* (*pfcytb*) sont hachurées, les ARN ribosomaux codant les grandes sous unités ribosomiques sont représentés en blanc et ceux codant pour les petites sous unités en gris. Les ARN ribosomaux non classés sont représentés par des croisillons.

La réplication du génome mitochondrial et du génome nucléaire a lieu simultanément entre la 18ème et la 36ème heure du cycle (Smeijsters, 1994 ; Feagin & Drew, 1995). Après différentes études en gel bi-dimensionnel, il s'est avéré que *Plasmodium* utilise deux modes de réplication semblables aux bactériophages (Preiser, 1996 ; Figure 12). Le mode majoritaire, semblable à celui du bactériophage T4, entraîne de nombreuses recombinaisons entre les différentes copies. La réplication commence en général à proximité d'une extrémité 3' ce qui génère une extrémité libre qui va alors s'associer à d'autres molécules en phase de réplication pour former de larges réseaux de concatamères (Mosig, 1998). L'autre mode de réplication, caractérisé par la présence de cercle, est semblable à celui du bactériophage λ (Asai, 1994). Celui-ci jouerait un rôle protecteur contre la dégénérescence du génome que pourrait entraîner les nombreuses recombinaisons induites par le premier mode de réplication (Preiser, 1996).

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007



D'après Williamson, 1996.

Figure 12 : Schéma de la réplication de l'ADN mitochondrial chez *P. falciparum*.

Le génome est composé d'environ 20 copies de génome répétées en tandem (**A**). Le nombre de copies par tandem est compris entre 1 et 5. Au début de la réplication, des recombinaisons intra-moléculaires entraînent la formation de formes circulaires (**B**) qui se répliquent selon un mode semblable à celui des bactériophages. Ces cercles vont alors se fixer aux séquences terminales des formes linéaires (**C**) pour aboutir à la formation des différents concatamères (**D**). Au final, durant la phase de réplication, différents types de complexes et de réseaux sont formés par les phénomènes de recombinaison (ex : **E**).

3.3.2 - Mécanisme d'action de l'atovaquone-proguanil

En 1992, Fry et Pudney caractérisent avec précision le site d'action de l'atovaquone en menant des essais rigoureux sur chacun des complexes de la chaîne respiratoire (Fry & Pudney, 1992). Ils montrent ainsi qu'à faible concentration, l'atovaquone agit au niveau du complexe III ou complexe bc_1 de la chaîne de phosphorylation oxydative alors qu'à forte concentration, elle se comporte comme un antagoniste compétitif ubiquitaire de l'ubiquinone. Possédant une structure proche de l'ubiquinone, l'atovaquone va se fixer sur son site d'oxydation au niveau du cytochrome *b* (Figure 13). La conformation *trans* de la molécule (50 fois plus active) ainsi que l'hydroxyle en position 2 de l'hétérocycle naphtoquinone sont indispensables à cette fixation qui entraîne : une inhibition du transport des électrons ainsi qu'une dépolarisation du potentiel de membrane mitochondrial (Srivastava, 1997). Cette action est spécifique de l'Embranchement des

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Apicomplexa dont *Plasmodium* puisque son niveau d'efficacité est mille fois moindre sur les mitochondries de Mammifères (Fry & Pudney, 1992). L'arrêt du transport des électrons par l'atovaquone entraîne une inhibition de la respiration (de plus de 70% ; Hammond, 1985) ainsi qu'une inhibition de la l'activité de la DHOD de 90% (Ittarat, 1994). Cette dernière induit une inhibition de la synthèse des pyrimidines de 40% entre la 18ème et la 24ème heure du cycle érythrocytaire (Seymour, 1994). Bien qu'étant liée à la fixation de l'atovaquone sur le cytochrome *b*, on ne peut pas exclure une action secondaire directe de l'atovaquone sur la DHOD puisqu'une fixation à cette enzyme a été montrée chez le Rat (Hansen, 2004). De plus, l'atovaquone semblerait agir sur la voie de respiration alternative puisqu'elle diminue de 10% la part de respiration liée à SHAM chez des parasites mutés au niveau de *pfcytb* (Suswan, 2001). Une synergie d'action a aussi été décrite entre l'atovaquone et le n-propyl gallate, un inhibiteur de la voie alterne (Murphy & Lang-Unnasch, 1999). Enfin, chez *Pneumocystis*, l'atovaquone inhibe la synthèse de l'ubiquinone (Basselin, 2005). La présence de cibles secondaires est donc à considérer. Celles-ci permettraient d'expliquer le pouvoir parasiticide de l'atovaquone alors même qu'elle n'inhibe que 40% de la synthèse des acides nucléiques.

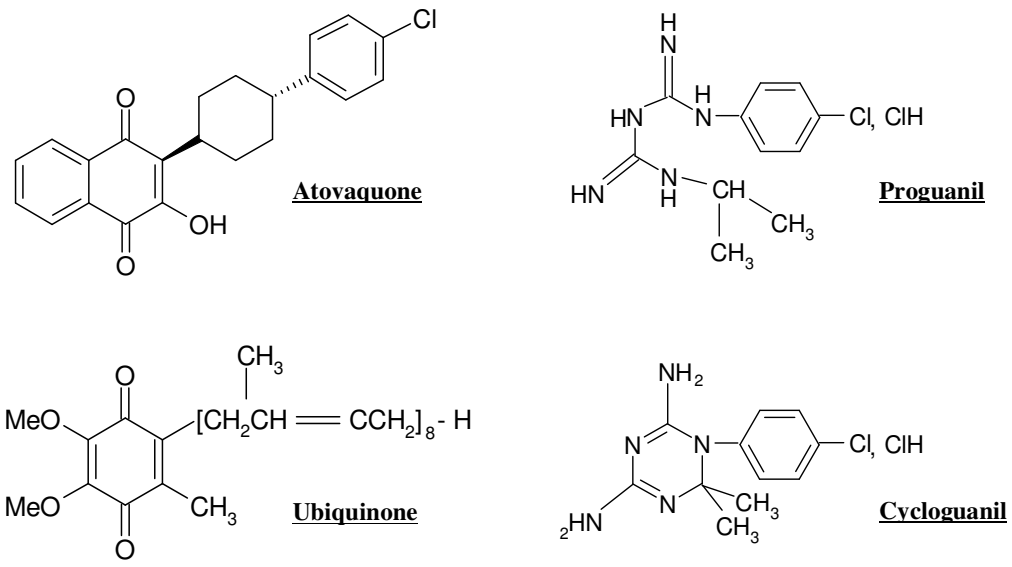


Figure 13 : Structures chimiques de l'atovaquone, du proguanil, de l'ubiquinone et du cycloguanil.

Le mode d'action du proguanil, (chloro-4-phényl)-1-isopropyl-5-biguanide, est connu depuis le milieu du XX^{ème} siècle. D'abord métabolisé au niveau du foie en cycloguanil, c'est ce métabolite

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

actif qui va inhiber les voies de synthèse des purines et des pyrimidines au niveau de la dihydrofolate réductase parasitaire (Figure 13 ; Carrington 1951 ; Ferone, 1969). L'inhibition de la voie des purines n'a cependant que peu de conséquences sur la synthèse des acides nucléiques puisque le parasite peut utiliser celles de l'hôte. Comme pour l'atovaquone, c'est l'inhibition de la synthèse des pyrimidines qui est essentielle.

L'administration simultanée d'atovaquone et de proguanil entraîne une synergie d'action sur le potentiel de membrane mitochondrial (Srivastava & Vaidya, 1999). Comparé à l'atovaquone seule, l'ajout du proguanil multiplie par 8 le niveau de dépolarisation du potentiel de membrane. La faible activité intrinsèque du proguanil décrite *in vitro* (Sucharit, 1985 ; Watkins, 1984 ; Fidock & Wellems, 1997) serait suffisante pour induire cette synergie si l'on considère que l'accumulation du proguanil dans les globules rouges (Black, 1981 ; cf Situation du sujet §3.2) permet d'atteindre des concentrations thérapeutiques (de l'ordre de 5 à 10 µM). Aucune synergie d'action n'est décrite sur la respiration et la consommation d'oxygène ce qui laisse supposer que la dépolarisation de la membrane mitochondriale n'est pas uniquement liée à l'inhibition du transport des électrons par l'atovaquone. Le proguanil appartient à la grande famille des biguanides qui a été décrite comme une classe d'inhibiteurs indirects du complexe I de la chaîne respiratoire (El-Mir, 2000). Bien que son mode d'action et sa cible restent inconnus, on peut donc supposer que cette propriété soit en partie responsable de l'action du proguanil sur le potentiel de membrane mitochondrial. Le cycloguanil ne joue aucun rôle dans cette association puisque la synergie entre l'atovaquone et le proguanil existe *in vitro* alors même que le cycloguanil est inexistant (Thapar, 2003). Ceci est confirmé par l'absence de synergie entre l'atovaquone et la pyriméthamine (un autre inhibiteur de dihydrofolate réductase ; Jones & Ward, 2002). De plus, le niveau d'efficacité de l'association est identique sur des souches cycloguanil-résistantes ainsi que chez des métaboliseurs lents ou rapides (Kaneko, 1999 ; Canfield, 1995).

3.4 - Activité sur les différents stades parasitaires

Activité sur la sporogonie de *Plasmodium*

Chez l'Homme, contrairement à l'atovaquone, le proguanil n'a aucune action sur les gamétocytes (Failey, 1946). L'hydroxynaphtoquinone inhibe principalement les gamétocytes de stade 1 et de façon moins marquée les stades 2, 3 et 4 (Fleck, 1996). Aucun effet gamétocytocide n'est observé sur les stades ultérieurs. Elle inhibe également l'exflagellation des gamétocytes mâles si

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

le traitement est appliqué au moins trois jours avant celle-ci. L'association atovaquone-proguanil réduit le nombre de gamétocytes chez les porteurs asymptomatiques, et induit une nette diminution du pouvoir infectant des moustiques s'étant infestés sur des porteurs sous traitement (Enosse, 2000). Chez l'Anophèle, l'atovaquone réduit de 45 à 100% le nombre d'ookinètes produits par le moustique qu'elle soit mise en contact avec les parasites avant ou après la formation des gamètes (exflagellation) ou la fécondation (Fowler, 1995). Les auteurs supposent donc qu'elle inhibe la réplication d'ADN qui se produit environ 3 à 5 heures après la fécondation, juste avant la méiose. Lorsqu'elle est administrée dans les quatre jours suivant le repas infectant, elle réduit le nombre d'oocystes formés et par voie de conséquence le nombre de sporozoïtes produits puisqu'elle n'a aucune activité sur les sporozoïtes existants. Cependant, selon Fowler, une piqûre infectante de moustique ne contenant qu'une cinquantaine de sporozoïtes, cette réduction influencerait peu le taux de transmission de la maladie d'autant que l'exposition des sporozoïtes à l'atovaquone ne diminue pas leur pouvoir infectant. Le proguanil est quant à lui totalement inefficace sur les sporozoïtes mais il empêche leur formation en inhibant le développement des oocystes dans l'estomac du moustique (Fairley, 1946).

Activité sur les schizogonies de *Plasmodium* chez l'Homme

Sur les formes hépatiques

Les deux composés de cette association agissent sur les stades hépatocytaires du parasite en réduisant le nombre de mérozoïtes libérés dans la circulation sanguine par le foie (Fairley, 1946 ; Davies, 1989 ; Shapiro, 1999). L'association n'a a priori aucune action sur les hypnozoïtes de *P. vivax* et *P. ovale* puisque de nombreuses rechutes (14 sur 19) sont observées dans les 16 à 26 jours suivant l'arrêt de l'atovaquone-proguanil chez des patients impaludés par *P. vivax* (Looareesuwan, 1996). Cependant, le délai de la rechute est probablement trop court à notre sens pour pouvoir uniquement mettre en cause les hypnozoïtes.

Sur les formes érythrocytaires

Une seule étude sur les formes érythrocytaires est disponible à ce jour (Fleck, 1996). Elle montre une action généralisée à tous les stades du cycle asexué. Après 96 heures de culture en présence de principe actif, il y a une réduction de 93% du nombre de trophozoïtes jeunes ou rings, de 43% de celui des trophozoïtes âgés et de 96% de celui des schizontes. *In vivo*, il est difficile de différencier l'action intrinsèque du proguanil de celle de son métabolite actif, le cycloguanil, qui *in vitro* montre une activité comparable à la pyriméthamine sur les formes érythrocytaires

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

(Failey, 1946 ; Watkins, 1984). Cependant, une étude *in vitro* sur des parasites résistant au cycloguanil a montré une action du proguanil sur les formes érythrocytaires du parasite mais à des concentrations bien supérieures aux concentrations plasmatiques obtenues avec les posologies classiques d'atovaquone-proguanil (Fidock & Wellems, 1997). Pour certains auteurs, l'accumulation du proguanil dans les globules rouges non parasités (jusqu'à cinq fois, cf §3.2) permettrait d'atteindre les concentrations efficaces (Black, 1981).

Au plan de son activité pharmacologique, l'atovaquone-proguanil est donc une association active sur l'ensemble des stades parasitaires de *Plasmodium* et particulièrement aux moments clés du développement nécessitant une synthèse d'ADN (Figure 3) à savoir : chez l'homme, le passage du stade trophozoïte âgé au stade schizonte (hépatique ou érythrocytaire) ; et chez le moustique, durant la gamétocytogénèse et pendant la formation des sporozoïtes dans l'oocyste. Dans le paludisme, la prophylaxie peut être de deux types : une prophylaxie causale qui prévient le développement des formes parasitaires hépatiques ainsi que la libération des mérozoïtes dans la circulation sanguine et la prophylaxie suppressive qui permet d'éliminer les formes érythrocytaires. Par conséquent, cette association présente à la fois une activité prophylactique causale et suppressive.

3.5 - Efficacité de l'atovaquone-proguanil

3.5.1 - *In vivo* dans le traitement des accès palustres simples à *P. falciparum*

Une première étude clinique sur l'utilisation de l'atovaquone seule dans le traitement des accès palustres simples à *P. falciparum* a permis d'évaluer l'efficacité d'une dose unique de 500 mg d'atovaquone (n = 8) et de trois doses quotidiennes de 750 mg pendant trois jours (n = 4 ; Chiodini, 1995). Les résultats ont rapporté 75% de rechutes dans le groupe dose unique et 25% dans le deuxième groupe. Les valeurs de chimiosensibilité *in vitro* à l'atovaquone (CI_{50}) avant et après la recrudescence parasitaire étant respectivement de 1,19 nM et 6,29 nM, les auteurs évoquent la possible émergence de parasites résistants. La posologie et la durée de traitement sont cependant largement mises en cause et la réalisation d'une deuxième étude utilisant 750 mg d'atovaquone toutes les 8 heures pour un total de 4 ou 21 prises a lieu (Looareesuwan, 1996). De nouveau, plus de 30% d'échecs sont constatés mais cette fois la chimiosensibilité moyenne des parasites (CI_{50}) était passée de 9 nM (n = 12) avant le traitement à 13000 nM (effectif non précisé) après l'échec thérapeutique. Cette importante diminution de la sensibilité à l'atovaquone

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

montre alors clairement l'apparition de la résistance à l'atovaquone. Ce pourcentage d'échec étant incompatible avec une commercialisation du principe actif seul, l'association atovaquone-proguanil a été évaluée et a fait preuve d'une très grande efficacité (98 à 100%) grâce à la potentialisation de l'effet de l'atovaquone par le biguanide.

L'évaluation de cette association dans le traitement du paludisme à *P. falciparum* a justifié de nombreuses études cliniques randomisées dans le cadre d'essais cliniques de phase 3 et lors du suivi post commercialisation de la spécialité. L'atovaquone-proguanil a ainsi été comparée à neuf autres traitements (cf Tableau 4). Pour une analyse pertinente et compte tenu de l'évolution permanente de la résistance et donc de l'efficacité d'un principe actif, il est important de prendre en compte la date à laquelle l'étude s'est déroulée ainsi que la zone géographique concernée.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des études cliniques comparant l'atovaquone-proguanil à d'autres thérapeutiques dans le traitement des accès palustres à *P. falciparum*.

					Efficacité thérapeutique de l'AP			Clairance parasitaire avec l'AP			Disparition de la fièvre avec l'AP		
				n[a]	Meilleure	Idem	Echecs[b]	+ rapide	Idem	+ lente	+ rapide	Idem	+ lente
Chloroquine (CQ)													
95-96	Pérou[1]	Adulte	19-13		■		0		■			■	
1995	Philippines[2]	Adulte	54-23		■		0		■			■	
Sulfadoxine-pyriméthamine (SP)													
1994	Zambie[3]	Adulte	82-81		■		0			■	■		
95-96	Pérou[1]	Adulte	19-7		■		0			■	■		
CQ + SP													
1995	Philippines[3]	Adulte	54-32		■		0			■		■	
Amodiaquine													
1994	Gabon[4]	Adulte	71-71		■		1		■			■	
99-00	Gabon[5]	Enfant	100-100		■		4		■			■	
Quinine + Tétracycline													
1995	Brésil[6]	Adulte	77-77			■	1	■			■		
Halofantrine													
1994	Kenya[7]	Enfant	81-83			■	5*			■			■
1995	France[8]	Adulte	21-18			■	0			■			■
Méfloquine (MQ)													
1999	Thaîlande[9]	Adulte	84-88		■		0	■				■	
Artésunate + MQ													
98-00	Thaïlande[10]	Tous âges	530-533			■	15			■			■
AP + Artésunate													
98-00	Thaïlande[10]	Tous âges	530-533			■	13			■			■
Dihydroartémisinine, Pipéraquine, Triméthoprime													
01-02	Vietnam[11]	Adulte	79-82			■	4		■			■	

[a]n = effectif dans chaque groupe, le premier chiffre représente celui des patients traités par AP ; [b]nombre d'échecs thérapeutiques observés. Les années rapportées dans le tableau correspondent à la période durant laquelle les patients ont été randomisés.
[1]Llanos-Cuentas, 2001. [2]Bustos, 1999. [3]Mulenga, 1999. [4]Radloff, 1996 (échec à J28). [5]Borrmann, 2003 (1 échec à J2, 3 échecs tardifs). [6]de Alencar, 1997 (échec à J21). [7]Anabwani, 1999 (*un échec lié à l'apparition de parasites résistants puisque son retraitement par l'AP n'a pas fonctionné : nouvelle rechute J7). [8]Bouchaud, 2000. [9]Looareesuwan, 1999. [10]van Vugt, 2002 [15 échecs avec l'AP seule entre J14 et J42 (moyenne J29) sans variation de la chimiosensibilité à l'atovaquone après la recrudescence (CI_{50} ≈ 2,9 nM) ; 13 échecs plus tardifs avec la trithérapie AP + artésunate entre J28 et J42 (moyenne J36)]. [11]Giao, 2004 (3 échecs précoces avant J14 et 1 échec tardif).

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

En règle générale, l'atovaquone-proguanil a présenté une efficacité identique aux ACT et à l'halofantrine et une efficacité supérieure à la plupart des autres antipaludiques, y compris dans des zones de multirésistances comme la Thaïlande ou le Vietnam (où le métabolite du proguanil, le cycloguanil, n'a *a priori* plus aucune efficacité) ou encore chez des voyageurs non-immuns revenant d'Afrique. Une étude montre que le nombre de patients porteurs de gamétocytes est plus important avec l'atovaquone-proguanil qu'avec les ACT et que la durée de leur portage est nettement plus long (multipliée par vingt ; van Vugt, 2002). Ces résultats ne sont pas confirmés par d'autres études (Giao, 2004). En plus de celles indiquées dans le tableau 4, une étude a évalué l'efficacité de l'atovaquone-proguanil en traitement secondaire d'échecs de l'association méfloquine-artésunate (Giao, 2003). Trente sept sujets ont ainsi été traités. Durant le suivi de 28 jours, 14% d'entre eux ont présenté un échec, 2 à J7, 2 à J21 et 1 à J28 sans que la résistance parasitaire ne soit confirmée par génotypage ou phénotypage. Enfin, deux autres sujets ont présenté une infection à *P. vivax* pendant le suivi. Une dernière étude a évalué l'efficacité de l'association dans le traitement du paludisme simple à *P. falciparum* de 50 résidents au Danemark suivis pendant 28 jours (Thybo, 2004). Aucun échec n'a été observé durant cette période.

Au final, sur les 1300 patients traités par atovaquone-proguanil suivis pendant au minimum 28 jours, voire 42 jours pour certains, 46 cas de rechutes parasitaires ont été recensés, la plupart dans les 28 jours suivant l'arrêt du traitement. Le taux d'échec thérapeutique est donc estimé entre 2,03 et 4,26%. Cependant, les résultats ne permettent pas de discriminer une résistance parasitaire d'une malabsorption des principes actifs puisqu'ils ne font état d'aucun génotypage et d'aucun dosage plasmatique.

3.5.2 - *In vivo* en prophylaxie du paludisme à *P. falciparum*

Les études portant sur l'efficacité de l'atovaquone-proguanil en prophylaxie ont été réalisées sur différents types de populations suivies pendant une période d'au moins 28 jours après l'arrêt de la prophylaxie : des voyageurs non-immuns, des sujets non-immuns prenant une prophylaxie de longue durée (réfugiés ou voyageurs), et des sujets semi-immuns vivant en zone d'endémie (McKeage & Scott, 2003). Les résultats montrent une efficacité de 100% chez les voyageurs, de 96% chez les migrants et de 95-100% chez les sujets semi-immuns (Tableau 5).

Deux accès palustres à *P. ovale* ont été rapportés 28 jours et quatre mois après l'arrêt d'une prophylaxie correcte (Høgh, 2000 ; Peterson, 2003) ce qui tendrait à montrer que l'atovaquone n'a effectivement aucune action sur les formes hépatiques dormantes (hypnozoïtes) de *P. ovale* ou *P.*

vivax (cf Situation du sujet §3.4). Chez les patients semi-immuns, trois échecs prophylactiques impliquant *P. falciparum* ont été recensés au cours de la sixième semaine de prophylaxie, généralement associés à des dosages plasmatiques (durant la 5ème semaine) d'atovaquone corrects, mais de proguanil et cycloguanil insuffisants (Sukwa, 1999), ou encore à une pluri-infection *P. falciparum-P. malariae* ou *P. ovale* (Lell, 1998).

L'atovaquone-proguanil en prophylaxie est le seul antipaludique pouvant être arrêté sept jours (au lieu de 28) après le départ de la zone d'endémie. Ce raccourcissement du traitement a été fixé en considérant la très bonne activité de l'atovaquone sur les stades hépatiques de *Plasmodium* et en fonction du temps nécessaire à obtenir le plateau de concentration efficace notamment pour les voyages de très courte durée (inférieure à sept jours).

Tableau 5 : Etudes cliniques d'efficacité et de tolérance, comparatives ou non, de l'atovaquone-proguanil en prophylaxie.

Etude	Classe d'âge	Zone visitée	Molécule utilisée	Durée proph. (jours)	Nbre de patients	Nbre de cas de paludisme	Efficacité (%)
Voyageurs							
Overbosch, 2001	Adultes Enfants	Zones d'endémies	AP MQ	28 53	486 477	0 0	100 100
Høgh, 2000	Adultes	Zones d'endémies	AP CP	26 48	501 507	0 3	100 70
van der Berg, 1999	Adultes	Afrique du Sud	AP	70	113	1°	97
Réfugiés ou voyageurs de longue durée							
Peterson, 2003	Adultes	Soldats Danois	AP	187	300	1	ND
Ling, 2002	Adultes	Papouasie Nouvelle Guinée	AP Placebo	140	148 149	1 21	96
Nasveld, 2000 (résumé)	Adultes	Soldats Australiens	AP DOX	56 56?	75 75	0 0	ND ND
Patients vivants en zone d'endémie							
Lacy, 2002	Adultes	Indonésie	AP Placebo	140	148 148	3# 37	ND
Faucher, 2002	Enfants	Gabon	AP Placebo	84	150 144	1 31	97
Sukwa, 1999	Adultes	Zambie	AP Placebo	70	102 111	2 41	95
Shanks, 1998	Adultes	Kenya de l'Ouest	AP AP* Placebo	70	54 54 54	0 0 28	100
Lell, 1998	Enfants	Gabon	AP Placebo	84	115 112	0 25	100

AP : atovaquone-proguanil ; DOX : doxycycline ; MQ : méfloquine ; CP : chloroquine-proguanil. °Echec lié à une mauvaise observance, #Absence de résistance car accès palustres traités avec succès par AP, *Posologie habituelle doublée (1 comprimé 2 fois par jour). L'efficacité (pour les patients vivant en zone d'endémie) = 100 × [1-(taux d'échec/taux d'échec dans groupe PL], (pour les autres) = 100 × [1-(nombre d'échecs/nombre de participants ayant des anticorps anti-protéine de surface du sporozoïte).

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Il a également été montré que les concentrations d'atovaquone-proguanil présentes dans le plasma ou le sérum d'un patient ayant reçu 35 jours auparavant une dose thérapeutique sont actives *in vitro* sur les stades asexués et sexués du parasite (Edstein, 2005 ; Butcher & Sinden, 2003). Compte tenu des demi-vies respectives de l'atovaquone et du proguanil (59 et 14 heures), cette activité est uniquement liée à la persistance d'atovaquone. Une autre étude au Kenya, zone holoendémique, montre l'avantage d'utiliser l'atovaquone-proguanil pour diminuer la transmission. En effet, le temps écoulé entre l'arrêt d'un traitement et la première réinfestation parasitaire des patients est beaucoup plus long avec l'atovaquone-proguanil qu'avec l'halofantrine ou l'association quinine-doxycycline puisque 50% des patients sont de nouveau impaludés au bout de 55 jours au lieu de 48 et 31 jours respectivement (Shanks, 1999).

3.5.3 - *In vitro* en culture d'hématies humaines

Les sensibilités *in vitro* de *Plasmodium falciparum* à l'atovaquone ou concentration inhibitrice 50% (CI_{50}) sont de l'ordre de 0,5 à 6 nM y compris en zone de multirésistance comme en Thaïlande (Brockman, 2000). Lorsque ces valeurs sont comparées à celles d'autres antipaludiques, l'atovaquone s'avère beaucoup plus active que la chloroquine, la quinine, la méfloquine, l'amodiaquine, la pyriméthamine ou encore l'artéméther (Basco, 1995 ; Hudson, 1991). Par contre, son action est comparable à celle de l'halofantrine. L'hydroxynaphtoquinone est plus active sur les souches Africaines qu'Asiatiques (Gay, 1997 ; Basco, 2003). En se basant sur différents critères ($90^{ème}$ percentile, corrélation avec le seuil de résistance à la quinine, réponses cliniques au traitement), Gay et *al*. ont défini un seuil de résistance pour l'atovaquone à 6 nM (Gay, 1997).

Peu d'études de chimiosensibilité *in vitro* ont associé dans un même test l'atovaquone et le proguanil. En 2004, la méthode des isobologrammes qui consiste à représenter graphiquement l'activité de deux molécules en proportions variables (une en abscisse, l'autre en ordonnée) a permis de confirmer la synergie d'action de l'atovaquone-proguanil sur des souches chloroquino-sensibles et chloroquino-résistantes (Figure 14 ; Fivelman, 2004). Dans cette étude, une souche résistante à l'atovaquone-proguanil *in vivo* (NGATV01) a été étudiée. Les résultats montrent une disparition de la synergie entre l'atovaquone et le proguanil et une chimiosensibilité à l'atovaquone fortement diminuée (CI_{50} : 2987 nM) alors que la chimiosensibilité au proguanil, très faible, n'est pas significativement différente de celle des souches sensibles *in vivo* à l'atovaquone-proguanil.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

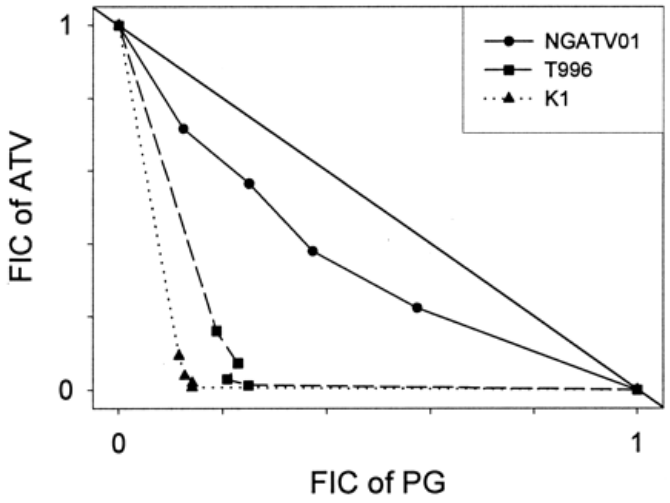


Figure 14 : Isobologrammes montrant l'interaction entre l'atovaquone et le proguanil.

La synergie d'action est très nette sur les souches sensibles à l'atovaquone (K1 et T996) alors qu'elle est inexistante sur la souche, résistant à l'atovaquone-proguanil et mutante Y268N au niveau du cytochrome *b* (NGATV01).

D'après Fivelman, 2004.

3.6 - La résistance à l'atovaquone-proguanil

Dans les premières années de son utilisation, les premiers cas de résistance au proguanil, et donc au cycloguanil, sont apparus en Malaisie et en Inde (Chaudhuri, 1948 ; Field & Edeson, 1949). Plusieurs polymorphismes du gène *pfdhfr-ts* ont ensuite été identifiés et associés à la résistance au cycloguanil : *in vitro*, les mutations A16V et S108P (Peterson, 1990 ; Foote, 1990) ; *in vivo*, les mutations S108N, N51I et C59R (Cowman, 1988). Dès 1995, lors des premiers essais cliniques de l'atovaquone seule chez l'homme dans le traitement des accès palustres, de nombreux échecs thérapeutiques ont été observés (cf Situation du sujet §3.5.1). Avec l'association atovaquone-proguanil, les échecs thérapeutiques ont été rares pendant les essais cliniques. Aucune analyse génotypique de ces isolats n'a été publiée. En l'absence de cible définie pour l'action du proguanil, le premier enjeu était de définir le mécanisme de résistance à l'atovaquone chez *Plasmodium*. Les premières études ont analysé des parasites résistants générés *in vitro* en se basant sur les résultats obtenus chez des isolats de *Toxoplasma* et de *Pneumocystis* résistants ayant émergé durant le traitement par l'atovaquone (Wellvone®) de patients sidéens atteints d'infections opportunistes. Tous ces isolats présentaient des mutations au niveau de *pfcytb* (Walker, 1998 ; Pfefferkorn, 1993).

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

3.6.1 - Les pressions médicamenteuses *in vitro* et *in vivo*

Les premières pressions médicamenteuses avec de l'atovaquone sur *Plasmodium* ont été réalisées dans un modèle murin sur *P. yoelii* (Srivastava, 1999). L'administration par voie orale de 5 $mg.kg^{-1}$ d'atovaquone à des souris parasitées entre 5 et 8% a permis d'isoler neuf clones résistants en 10 à 12 jours à partir de 10^6 parasites initiaux. Ces clones étaient nettement résistants puisque leur CI_{50} étaient comprises entre 15 000 et 25 000 nM alors que la souche parentale présentait une sensibilité à l'atovaquone de 15 nM. Cette résistance était associée à une incapacité de l'atovaquone à dépolariser le potentiel de membrane mitochondrial et à inhiber le transport d'électrons. Le séquençage de *pfcytb* a permis d'identifier cinq mutations ponctuelles dont trois étaient localisées à des positions conservées (I258, Y268 et L271 ; Tableau 6). De façon surprenante, toutes les copies du gène étaient mutées et quatre des cinq mutations étaient un remplacement d'un A/T par un G/C. Les auteurs ont alors suggéré qu'en inhibant le transfert des électrons, l'atovaquone peut généré de nombreux radicaux oxygénés qui ont transformé la guanine en 8-oxo-guanine. Sous cette forme, la guanine, au moment de la réplication de l'ADN, va s'apparier à l'adénine (Friedberg, 1995).

Une deuxième étude rapporte des pressions médicamenteuses sur *Plasmodium berghei* ANKA (Syafruddin, 1999). Cette fois, l'atovaquone est administrée par voie intra-péritonéale à des concentrations croissantes allant de 0,4 $\mu g.kg^{-1}$ à 14,4 $mg.kg^{-1}$. Les pressions débutaient dès que la parasitémie atteignait 1 à 2% (environ 3.10^5 parasites). Au bout de plus de quatre mois, trois clones de sensibilité nettement diminuée ont été identifiés. Tous présentaient la mutation V284F, seule ou associée à la mutation M133I ou à la mutation L144S (Tableau 6).

C'est alors que sont publiées les premières pressions *in vitro* sur *P. falciparum* (Korsinczky, 2000). En utilisant des concentrations d'atovaquone allant de 20 à 15 000 nM et 6.10^8 parasites (cultures à 3% de parasitémie), les auteurs ont isolé cinq clones dont la plupart possédaient la mutation M133I, seule ou associée (Tableau 6).

Une seule étude rapporte des pressions médicamenteuses avec de l'atovaquone (10 nM) associée au cycloguanil dans des proportions de concentrations comparables à celles utilisées *in vivo* (Schwöbel, 2003). Après une première série de pression sur des cultures à 2% de parasitémie, les parasites survivants étaient remis en contact avec les mêmes doses ou avec des doses d'atovaquone plus importantes pouvant atteindre 200 nM. Les résultats obtenus sont semblables à ceux de l'étude précédente avec l'identification de la mutation M133I, seule ou associée à la mutation L271F (Tableau 6).

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Tableau 6 : Caractéristiques des clones résistant à l'atovaquone générés par pression médicamenteuse.

Espèce	Clone	CI_{50} atovaquone (nM)	Mutations du cytochrome *b* : en acide aminé et en base										
			M133I (g401a)	**L144S** (t431c)	**I258M** (t776g)	**F267I** (t801a)	**Y268C** (a805g)	**L271V** (t813g) **L271F** (a815c)	**K272R** (a817g)	**P275T** (c825a)	**G280D** (g841a)	**L283I** (t851a)	**V284F** (g850a + t851a)
P. yoelii chez la souris[a]	Parents	15											
	AR6	10 000					●						
	AR3, AR4, AR5	12 000			●								
	AR1, AR2, AR9	15 000						● V	×				
	AR7, AR8	25 000				●							
P. berghei chez la souris[b]	Parents	18											
	SK1A-1	167											●
	SRA1	> 1000		●									●
	SK2A-1T	> 1000	●										●
P. falciparum in vitro	Parents	3											
	ATV-M1[c]	80	●										
	ATV-M5[c]	240										×	●
	ATV-M2[c]	690	●							×			
	ATV-M3[c]	1680	●						×				
	ATV-M4[c]	2810	●								×		
	AT20[d]	ND	●										
	AT200[d]	ND	●					● F					

[a]Srivastava, 1999 ; [b]Syafruddin, 1999 ; [c]Korsinczky, 2000 ; [d]Schwöbel, 2003 ; ● : mutations localisées au niveau du site d'oxydation de l'ubiquinone qui est aussi le site de fixation de l'atovaquone ; × : mutations en dehors des sites actifs.

De manière générale, ces quatre études ont permis de relier la résistance à l'atovaquone chez *Plasmodium* à la présence de mutations au niveau du gène *pfcytb* et de montrer que systématiquement au moins une des mutations était située au niveau d'un acide aminé localisé dans le site d'oxydation de l'ubiquinone qui est aussi le site de fixation de l'atovaquone.

3.6.2 - Les échecs thérapeutiques chez l'Homme

Malgré la cinquantaine d'échecs thérapeutiques observée parmi 1300 patients traités durant les essais cliniques de l'atovaquone-proguanil, ce n'est qu'en 2000 que la première analyse génotypique d'un isolat issus d'un échec thérapeutique par atovaquone-pyriméthamine est publiée (Korsinczky, 2000). Les résultats montrent une chimiosensibilité de l'isolat TM93C1088 à l'atovaquone de 9974 nM associée à une mutation du codon 268 du cytochrome *b* : Y268S. A elle seule, une mutation à cette position réduit de façon importante la sensibilité de l'isolat (sa chimiosensibilité à l'atovaquone est bien au-delà du seuil de résistance initialement fixé à 6 nM) et supprime toute synergie entre l'atovaquone et le proguanil (cf Situation du sujet §3.5.3).

Une association d'antipaludiques est l'utilisation simultanée pour le traitement des accès palustres de deux principes actifs schizonticides ayant des modes d'action et des cibles différentes. Dans

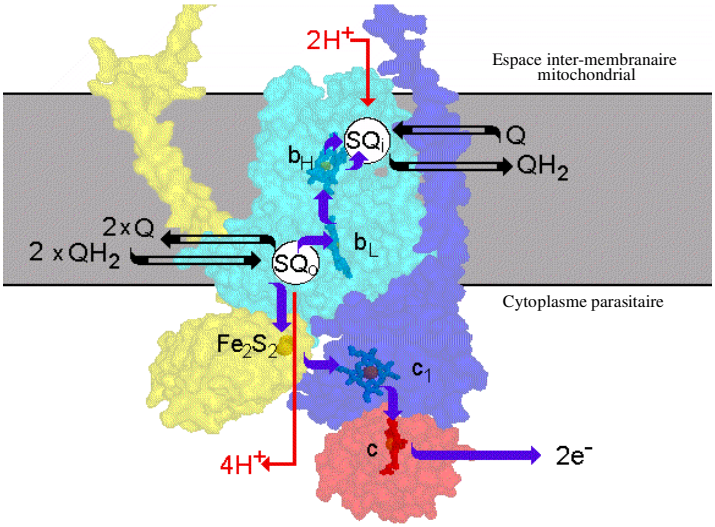
tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

les associations classiques, des principes actifs ayant chacun une bonne efficacité sont combinés pour diminuer la fréquence d'émergence de parasites résistants. Le cas de l'atovaquone-proguanil est particulier puisque aucune des deux molécules n'est utilisable en monothérapie : l'atovaquone sélectionne rapidement de nombreuses résistances, et le proguanil a une action intrinsèque beaucoup trop limitée pour être schizonticide. De plus, la résistance à l'atovaquone semble suffire à rendre l'association inefficace. On se retrouve donc dans un mécanisme de résistance semblable à celui d'une monothérapie. La synergie entre les deux principes actifs étant evidente puique le proguanil permet de multiplier par huit le niveau de dépolarisation de la membrane mitochondriale et de diminuer de 150 fois parler de potentialisation de l'atovaquone par le proguanil.

3.6.3 - Bases moléculaires et conséquences de la résistance

Le complexe III de *Plasmodium* catalyse le transport des électrons de l'ubiquinone au cytochrome *c*. C'est un dimère dont chaque monomère est constitué de 11 sous-unités protéiques. Parmi ces sous-unités, trois possèdent au moins un centre d'oxydo-réduction : le cytochrome *b,* le cytochrome c_1 et la protéine fer-soufre. Le cytochrome *b* est la seule protéine de ce complexe à être codée par le génome mitochondrial. Il s'agit d'une protéine de 376 acides aminés composée de huit domaines transmembranaires (Aldritt, 1989). Elle est codée par un gène de 1131 paires de bases composé de 72% d'A/T (Vaidya, 1993). Deux sites catalytiques ont été identifiés au niveau du cytochrome *b*, le site d'oxydation des quinols (Q_0 pour proton output) du côté cytoplasmique de la membrane et le site de réduction des quinones (Q_i pour proton input) du côté de la matrice mitochondriale ainsi que deux molécules d'hème (b_L et b_H). Au total, le complexe III comporte donc 4 centres redox, un hème au niveau du cytochrome c_1, le groupement de la protéine fer-soufre et les deux hèmes du cytochrome *b*. Dans ce complexe, la protéine fer-soufre a une position centrale et permet le transfert des électrons de l'ubiquinone au cytochrome *c* par un mécanisme cyclique, le cycle Q (Figure 15).

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007



Adaptée de http://www.life.uiuc.edu/crofts/bioph354/bc-complex_summary.html

Figure 15 : Cycle Q au niveau du complexe III mitochondrial.

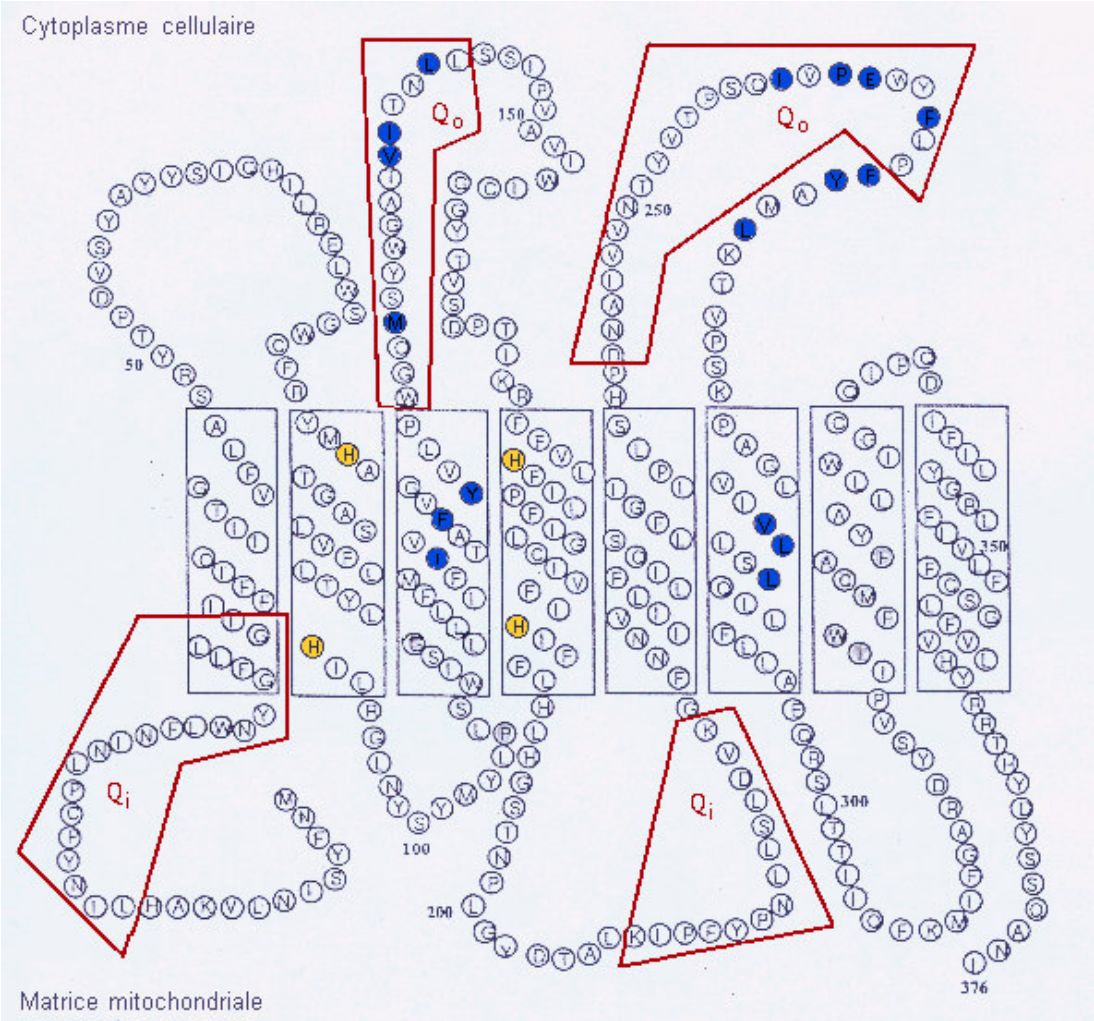
Deux hydroquinones sont déprotonées et viennent se fixer à la protéine fer-soufre pour donner deux électrons et former des semiquinones. Deux autres électrons sont extraits lors de l'oxydation des semiquinones en quinols simultanément à une nouvelle perte de proton. C'est alors que la protéine fer-soufre transfère, par rotation, deux électrons au cytochrome c_1 et deux électrons à l'hème b_H du cytochrome *b* qui vont régénérer un quinol en hydroquinone. Durant ce cycle, deux électrons sont transférés au cytochrome *c* et quatre protons sont expulsés hors de la mitochondrie.

Tout comme la stigmatelline et le myxothiazole, l'atovaquone est un inhibiteur compétitif spécifique du centre Q_0 (K_i = 9 nM) qui se fixe sur le cytochrome *b* lorsque la protéine fer-soufre est sous forme réduite (Kessl, 2003). Pour que l'interaction atovaquone/cytochrome *b* ait lieu, les cycles naphtoquinone et chlorophényle de l'atovaquone doivent être tournés de 90° par rapport au cycle cyclohexyle. Les liaisons atovaquone/cytochrome *b* sont essentiellement hydrophobes et impliquent de nombreux acides aminés à chaînes aromatiques ou aliphatiques (Figure 16 ; Kessl, 2005). Tous les résidus de contact avec l'atovaquone se trouvent du côté cytoplasmique de la protéine. Ce sont les positions I119, F123, Y126, M133, V140, I141, L144, I258, P260, E261, F264, F267, Y268, L271, V284, L285 et L288 (Korsinczky, 2000). L'hydroxyle du cycle naphtoquinone interagit avec l'histidine^{181} de la protéine fer-soufre et le carbonyle en position 4 du cycle interagit avec l'acide glutamique^{261} du cytochrome *b*. Cet acide glutamique fait partie de la séquence universelle PEWY qui est localisée dans la boucle *ef* du cytochrome. Cette boucle, très conservée à travers les espèces, est en contact étroit avec la poche de fixation de l'atovaquone. C'est à ce niveau que sont localisées toutes les mutations conférant la résistance aux inhibiteurs compétitifs du centre Q_0 du complexe III dont l'atovaquone (cf Situation du sujet §3.6.1 et §3.6.2 ; Brasseur, 1996). Des études chez la levure se sont intéressées aux effets des mutations I258M, F267I, Y268C, et L271V générées par pression médicamenteuse sur la structure de complexe III (Kessl, 2005). Elles montrent que la mutation I258M diminue le

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

volume de la poche hydrophobe nécessaire à la fixation de l'atovaquone alors que la mutation L271V a deux conséquences : elle modifie le degré de liberté de l'histidine[181] de la protéine fer-soufre et supprime la liaison hydrogène avec la tyrosine 268. Les mutations F267I et Y268C entraînent une suppression des chaînes aromatiques nécessaires à la fixation de l'atovaquone. Enfin, une étude de fitness sur les parasites mutés en position 133 et 280 a montré une perte de fitness des parasites mutants M133I/G280D de l'ordre de 5 à 9% comparé aux parasites sauvages (Peters, 2002). Bien que les deux mutations induisent peu de modifications conformationnelles, le fait que la position 280 soit impliquée dans la liaison de l'ubiquinone au cytochrome *b* pourrait expliquer ces résultats.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007



Adaptée de Vaidya, 1993.

Figure 16 : Structure secondaire du cytochrome *b*.

Les acides aminés impliqués dans la fixation de l'atovaquone sont représentés en bleu et les histidines qui fixent les deux hèmes en jaune. Les acides aminés formant les sites d'oxydation-réduction du cytochrome *b* (Q_0 et Q_i) sont encadrés en rouge.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Problématique et objectifs

Du fait de son cycle de développement très court et des nombreux évènements de recombinaison, le *Plasmodium* est en constante adaptation au milieu qui l'environne. L'utilisation massive et souvent incontrôlée d'antipaludiques au XX^{ème} siècle a entraîné l'apparition de parasites résistants à plusieurs des molécules disponibles. Pour la résistance à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine -les seuls antipaludiques ayant été utilisés de façon massive et prolongée en zone d'endémie- les foyers d'émergence de la résistance apparaissent rétrospectivement limités. L'extension de la résistance à l'ensemble des zones d'endémies est donc en grande partie liée à la sélection par la pression médicamenteuse des parasites résistants combinée à leur migration. Pour lutter efficacement contre le paludisme, il est donc indispensable de déployer les antipaludiques de manière raisonnée selon des recommandations d'usage attentives aux différentes résistances déjà présentes en zone d'endémie et cohérentes avec la réalité du terrain. La stratégie actuelle visant à limiter l'émergence des résistances est d'utiliser, comme dans le SIDA et la tuberculose, des associations d'antipaludiques ayant des cibles différentes pour lesquels la résistance de *P. falciparum* n'est pas encore généralisée. La compréhension des mécanismes d'action et de résistance à chacun des principes actifs serait donc d'un grand bénéfice avant de recommander une spécialité. Pour les mécanismes d'action en partie élucidés, on trouve : (***i***) la présence de mutations ponctuelles au niveau du gène de la protéine cible (ex : gène *pfdhfr-ts* pour la pyriméthamine et le cycloguanil), (***ii***) des amplifications géniques modifiant l'expression des protéines cibles (ex : gène *pfmdr1* pour la méfloquine) ou encore (***iii***) des modifications de transporteurs parasitaires qui rendent l'accès du principe actif à la cible difficile (ex : gène *pfcrt* pour la chloroquine).

Le sujet de notre étude, en relation étroite avec celle de notre unité et du Centre National de Référence du Paludisme (CNRP), est d'analyser les mécanismes de résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques par des approches épidémiologique et moléculaire. Mise sur le marché en 1999, l'atovaquone-proguanil est rapidement devenue le traitement de référence des accès palustres simples dans de nombreux pays développés dont la France. Notre étude ayant commencé avec le début de l'utilisation de l'association en France, nous avons choisi d'explorer

différents aspects de la résistance à l'atovaquone-proguanil. Le premier objectif a été de **définir le niveau de sensibilité naturelle à l'atovaquone et d'évaluer le polymorphisme du cytochrome *b* des isolats de *P. falciparum* importés** d'Afrique de l'Ouest et des Comores. Pour déterminer le niveau de sensibilité naturelle à l'atovaquone-proguanil, nous avons réalisé des tests de chimiosensibilité *in vitro* à l'atovaquone sur des isolats provenant de voyageurs présentant une monoinfection à *P. falciparum*. Les polymorphismes ont été recherchés par séquençage de la totalité du gène du cytochrome *b* (*pfcytb*). Le choix de *pfcytb*, qui code la protéine cible de l'atovaquone, est justifié par les premiers résultats publiés sur des parasites résistants *in vitro* ou *in vivo* présentant des mutations dans ce gène (cf Situation du sujet §3.6).

En parallèle, le second objectif a été de **générer des parasites résistants par pression médicamenteuse *in vitro* par l'atovaquone** à partir de la souche sensible de *P. falciparum* 3D7. La diminution de la sensibilité a été évaluée par des tests *in vitro* couplés à des génotypages réguliers, par séquençage, du gène *pfcytb* et du gène codant pour la dihydroorotate déshydrogénase (*pfdhod*), une cible secondaire potentielle de l'atovaquone.

Dans la littérature, les polymorphismes nucléotidiques associés aux résistances issus des pressions médicamenteuses *in vitro* sont généralement différents de ceux retrouvés dans la résistance observée *in vivo*. Le troisième objectif a donc été d'**identifier des marqueurs naturels de résistance à l'atovaquone-proguanil**. Associé au protocole de suivi de l'efficacité thérapeutique de l'atovaquone-proguanil mis en place dans différents hôpitaux partenaires du CNRP, notre rôle a été d'analyser les différentes rechutes parasitaires observées. Un dosage plasmatique d'atovaquone, du proguanil et du cycloguanil à la fin du traitement a permis d'écarter les défauts d'observance du patient ou d'absorption des principes actifs. Les parasites issus de ces échecs vrais ont été caractérisés par phénotypage de la sensibilité à l'atovaquone *in vitro* et génotypage par séquençage des gènes *pfcytb*, *pfdhod* et *pfdhfr-ts*. Enfin le codon 268 de *pfcytb* a été analysé par RFLP.

Ainsi, il y a un an, nous étions en possession de six isolats de patients infectés par *P. falciparum* en Afrique ayant présenté un échec thérapeutique vrai à l'atovaquone-proguanil. Pour cinq d'entre eux, nous possédions également les parasites présents au moment du diagnostic, avant l'initiation du traitement.

Le génome mitochondrial de *Plasmodium* étant multicopie, le quatrième objectif a été de **déterminer si le mécanisme de résistance à l'atovaquone-proguanil implique un phénomène d'amplification génique du gène *pfcytb***. Pour ce faire, nous avons quantifié par PCR en temps réel le nombre de copies de *pfcytb* par parasite sur les isolats résistants.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Dans la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine et à la chloroquine, il a été démontré, grâce à l'analyse de marqueurs microsatellites proches des déterminants de résistance, une faible diversité génétique des allèles de résistance. Ces données suggèrent que l'extension de la résistance, sous l'effet combiné de la sélection par la pression médicamenteuse et des migrations, s'est produite à partir d'un petit nombre de foyers d'émergence. Ainsi, le dernier objectif a été d'**étudier l'émergence de la résistance à l'atovaquone-proguanil** par une approche d'empreinte génétique dans les régions adjacentes au gène déterminant la résistance, c'est à dire le génome mitochondrial. Pour compléter ces résultats, nous avons également analysé cinq marqueurs microsatellites du génome nucléaire.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Résultats

1. Chimiosensibilité naturelle de *P. falciparum* à l'atovaquone en Afrique.

La mission du Centre National de Référence du Paludisme est d'évaluer les niveaux de résistance de *P. falciparum* aux différents antipaludiques en usage dans le but d'adapter les recommandations prophylactiques et thérapeutiques nationales. Alors que l'atovaquone-proguanil venait juste d'être introduite en France, l'objectif de cette étude était de déterminer le niveau de sensibilité naturelle à cette association et de rechercher d'éventuels isolats résistants. Pour évaluer la sensibilité des parasites, nous avons réalisé des tests *in vitro* à l'atovaquone et non à l'atovaquone plus proguanil. Ce choix a été motivé par la difficulté de choisir, pour un test utilisant deux molécules, la proportion de chacun des principes actifs à utiliser. Celle-ci peut être celle du comprimé ou celle des concentrations plasmatiques (dans ce cas faut-il y ajouter du cycloguanil, le métabolite produit *in vivo*?). De plus, d'après la littérature, le composé majeur de l'association est l'atovaquone, le proguanil ne serait qu'un potentialisateur, et la résistance à l'association semble liée à la présence de mutations au niveau de la cible de l'atovaquone. Nous avons ainsi testé la sensibilité *in vitro* à l'atovaquone seule sur des parasites isolés de voyageurs revenant majoritairement des anciennes colonies françaises d'Afrique de l'Ouest (Cameroun, Côte d'Ivoire, Sénégal, Mali) et de l'Océan Indien (Comores). Cette étude a nécessité la mise au point de différentes techniques de génotypage du cytochrome *b* (*pfcytb*) ainsi que la mise en place d'un test de chimiosensibilité à l'atovaquone permettant d'évaluer des sensibilités à l'atovaquone très variables, de l'ordre de 5 nM pour les souches sensibles ou nettement diminuées pour les souches résistantes, de l'ordre de 8000 nM. Il a donc fallu recourir à deux gammes de concentrations, une première comprise entre 0 à 384 nM et si aucune inhibition n'était constatée avec celle-ci, réaliser un deuxième test avec des concentrations d'atovaquone allant de 0 à 25600 nM (Annexe 1).

1.1 - Article 1

Apparent absence of atovaquone/proguanil resistance in 477 *Plasmodium falciparum* isolates from untreated French travellers

Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2006) **57**, 110–115
doi:10.1093/jac/dki420
Advance Access publication 30 November 2005

JAC

Apparent absence of atovaquone/proguanil resistance in 477 *Plasmodium falciparum* isolates from untreated French travellers

Lise Musset[1,2], Bruno Pradines[3,4], Daniel Parzy[4,5], Rémy Durand[1,2], Patricia Bigot[4,5] and Jacques Le Bras[1,2]*

[1]Centre National de Référence pour la Chimiosensibilité du Paludisme, APHP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France; [2]Laboratoire de Biologie Animale et Parasitaire, EA 209, Université Paris Descartes, Paris, France; [3]Unité de Recherche en Biologie et Epidémiologie Parasitaires, Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées, Parc du Pharo, Marseille, France; [4]Institut Fédératif de Recherche 48, Marseille, France; [5]Unité de Recherche en Pharmacogénétique Parasitaire, Institut Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées, Parc du Pharo, Marseille, France

Received 5 March 2005; returned 7 July 2005; revised 22 July 2005; accepted 24 October 2005

***Objectives*: We examined the atovaquone *in vitro* susceptibility and the cytochrome *b* (*cytb*) gene polymorphism of African *Plasmodium falciparum* isolates during the first years of atovaquone/proguanil use.**

***Patients and methods*: Between 1999 and 2004, we collected blood samples from French *P. falciparum*-infected patients returning from African countries. Atovaquone susceptibility was determined using an *in vitro* isotopic test and *cytb* genotyping was performed by restriction fragment length polymorphism analysis and sequencing. These results were analysed according to the clinical response to atovaquone/proguanil treatment.**

***Results*: No *in vitro* atovaquone resistance (IC_{50} > 1900 nM) and no *cytb* mutation leading to the Y268S substitution were detected among 477 unexposed African *P. falciparum* isolates. Eight *cytb* polymorphisms were found outside the ubiquinone reduction site by sequencing the entire gene of 270 isolates. One atovaquone/proguanil treatment failure was documented; the post-treatment isolate had an atovaquone susceptibility of 8230 nM and the Ser^{268} Cyt*b* change; the pre-treatment isolate, obtained 4 weeks previously, was Cyt*b* Tyr^{268} (wild-type).**

***Conclusions*: No atovaquone/proguanil resistance was detected by phenotyping or genotyping among 477 unexposed African *P. falciparum* isolates. Atovaquone/proguanil-resistant parasite was detectable only in the post-treatment isolate from a treatment failure.**

Keywords: susceptibility, malaria, antimalarials, *P. falciparum*

Introduction

Two billion people live in malaria endemic countries. Around 400 million clinical episodes and two million deaths occur in Africa every year, mostly during childhood. Fifty million travellers from developed countries visit malaria endemic areas every year, leading to 30000 imported cases of the disease, 12000 of which are diagnosed in Europe.[1] The emergence and spread of multidrug-resistant plasmodia calls for urgent development of new drugs with original cellular targets.[2] Atovaquone is the first metabolically stable hydroxynaphthoquinone with a broad spectrum of activity against protozoan parasites, including plasmodia.[3] In the mid-1990s preliminary clinical trials showed rapid defervescence and *Plasmodium falciparum* clearance, but early relapse occurred in 30% of cases.[4,5] A partner drug was thus sought to bolster atovaquone activity. Tetracycline, pyrimethamine and proguanil were found to be synergistic, and the efficacy, tolerability and safety of the atovaquone/proguanil combination was subsequently demonstrated, with a cure rate of more than 98% in patients with non-severe malaria.[6,7] Malarone, which consists of a fixed-dose of

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

the atovaquone/proguanil combination, was registered in North America and Europe (1996) for the treatment and prophylaxis of malaria. Owing to its high cost, its use is currently limited to travellers from industrialized countries.

In plasmodial mitochondria, ubiquinone carries electrons from dihydroorotate dehydrogenase to the respiratory chain, via the cytochrome bc_1 complex.[8] Atovaquone, which mimics ubiquinone, inhibits electron transfer by binding cytochrome *b* (Cyt*b*).[9] In the absence of electron transfer, the inner mitochondrial membrane potential collapses and, without dihydroorotate dehydrogenase oxidization, pyrimidine biosynthesis is inhibited.[10,11] Proguanil has been used against malaria since the 1950s.[12] After metabolization of proguanil into cycloguanil, the latter inhibits plasmodial dihydrofolate reductase (DHFR).[13] Surprisingly, combined with atovaquone, unmetabolized proguanil by itself lowers the effective concentration at which atovaquone collapses the mitochondrial membrane potential.[14] However, the molecular basis of this enhancement is unclear. Since the introduction of atovaquone/proguanil, 11 treatment failures have been reported in travellers returning from Africa. Seven of the eleven cases were associated with a change in codon 268 of Cyt*b*.[15–21] Mutations in the *dhfr* gene (i.e. cycloguanil resistance) had no effect on proguanil activity.[22] Conversely, mutations in the cytochrome *b* gene (*cytb*) induced resistance to atovaquone and its combination.[23] On this basis, and in the absence of a well defined protein target for proguanil, atovaquone/proguanil resistance is assumed to be linked to atovaquone resistance.

As for tuberculosis and AIDS, combinations are used for malaria treatment in order to minimize resistance and to prolong the activity of the few remaining effective drugs. More than ever, epidemiological monitoring of resistance is essential. Genotyping and *in vitro* phenotyping are commonly used methods. They necessitate reliable molecular markers and accurate *in vitro* susceptibility thresholds, respectively. Mutations in the *cytb* gene, leading to changes in codon 268, represent a potential molecular marker of atovaquone/proguanil resistance. To date, no atovaquone concentration threshold has been defined for *in vitro* resistance phenotyping. In this study, conducted during the first years of atovaquone/proguanil use, we investigated the baseline prevalence of *P. falciparum* susceptibility to atovaquone by measuring the dispersion of atovaquone 50% inhibitory concentration values (IC_{50}s) and screening for *cytb* polymorphisms. The results, together with clinical responses to atovaquone/proguanil treatment, allowed us to define an *in vitro* atovaquone resistance threshold.

Materials and methods

P. falciparum clones

We used the atovaquone-resistant strain TM90C2b, presenting with an amino acid change in Cyt*b* (Ser^{268}) and isolated after atovaquone treatment failure, and the susceptible strains 3D7 and W2 (Tyr^{268}).[6] Each strain was further cloned by the limiting dilution method. Atovaquone *in vitro* susceptibility values were 8060 ± 45 nM, 1.52 ± 0.78 nM and 1.22 ± 0.88 nM for the clones of TM90C2b, 3D7 and W2, respectively.

Clinical P. falciparum isolates

Between 1999 and 2004, blood samples with parasitaemia >0.2% were collected in several hospitals in France, from patients with uncomplicated *P. falciparum* monoinfection returning from West Africa and the Indian Ocean. Patients having taken atovaquone/proguanil prophylaxis were excluded from the study on the basis of a standardized questionnaire. No informed consent was required for this study as all following procedures are part of the French national recommendations for care and surveillance of malaria.

Atovaquone pre-dosed plates

Atovaquone was obtained from GlaxoSmithKline (Evreux, France). Stock solutions were prepared in methanol. Two-fold serial dilutions in methanol were distributed in triplicate in flat-bottom 24-well plates, dried, stored in darkness at room temperature and used within 6 months. To confirm the batch of pre-dosed plates, atovaquone susceptibility was determined with strains 3D7 and W2. If an aberrant value was obtained, the batch was discarded.

In vitro assay

The *in vitro* atovaquone susceptibility level (IC_{50}) was determined using the isotopic semi-microtest method.[24] For each clone of *P. falciparum*, the susceptibility level was determined four times. For clinical isolates, simultaneous assays based on triplicate determinations were done. If the maximal atovaquone concentration (384 nM) was not sufficient to totally inhibit parasite growth, the test was repeated with higher concentrations (up to 12 800 nM); this time, atovaquone was added directly to the medium to avoid problems of solubilization. In all cases, atovaquone susceptibility was determined prior to treatment. In case of atovaquone/proguanil treatment failure, *in vitro* susceptibility to atovaquone was tested again when parasites reappeared in blood. More than 600 tests allowed us to determine the *in vitro* atovaquone susceptibility of 477 isolates. Conditions and duration of shipment of the blood samples are likely to explain the failures.

Determination of in vitro resistance threshold

When physicians considered monitoring of treatment possible, patients had clinical and biological examinations on days 3, 7 and 28, along with recommendations for seeking care in case of illness on the other days. Based on WHO criteria, adequate clinical and parasitological response (treatment success) was defined as disappearance of asexual parasites with fever within 3 days without reappearance before day 28.[25] A recrudescence of parasitaemia and fever between day 4 and day 28 was defined as a late clinical failure. Results of the follow-up were available for 22 of the 58 patients treated with atovaquone/proguanil whose isolates were phenotyped (21 successes and 1 late clinical failure). IC_{50} values were interpreted according to these treatment responses, allowing definition of atovaquone *in vitro* threshold correlating with clinical response. The limit value of resistance was represented by the lower IC_{50} associated with a treatment failure. Prophylactic failure allegations were not used as failure criteria.

Artificial mixtures of clones

The capacity of PCR-sequencing and nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) to detect a minor resistant genotype (Y268S) were tested using artificial mixtures. Synchronous cultures of 3D7 and TM90C2b clones were diluted in fresh erythrocytes to obtain 1% parasitized cells. Mixed suspensions (50%, v/v) were then prepared at the following TM90C2b/3D7 ratios: 100:0, 99:1, 98:2, 95:5, 90:10, 75:25, 50:50, 25:75, 10:90, 5:95, 2:98, 1:99 and 0:100. Genotype ratios, after DNA extraction, were confirmed by the quantitative fragment analysis method.[26] The PCR-sequencing and the nested PCR-RFLP methods detected Y268S representing more than 10 and 5% of the total parasite population in the mixture,

respectively. As nested PCR-RFLP is more sensitive, this method was used to analyse the entire panel of isolates (n = 477). The entire *cytb* gene was examined by PCR-sequencing in the 270 isolates with the lowest atovaquone susceptibilities.

DNA extraction

Parasite DNA was extracted from 200 µL of blood by using the QIAamp DNA minikit, as recommended by the manufacturer (Qiagen, Hilden, Germany).

Amplification and sequencing of the P. falciparum cytb gene

To amplify the whole *cytb* gene, primers were designed from the complete *P. falciparum* mitochondrial DNA sequence (GenBank accession number M99416) using Oligo 4.0 software (Wojceich Rychlik, 1989). The reaction mixture contained 0.3 µM of each primer (sense, 5′-ATGAACTTTTACTCTATTAATT-3′; antisense, 5′-TTATATGTTTGCTTGGGAGCT-3′), 200 µM of each dNTP, buffer (50 mM KCl/10 mM Tris–HCl, pH 8.3/2 mM $MgCl_2$) and 2.5 U of *Thermus aquaticus* DNA polymerase (AmpliTaq Gold, Perkin Elmer) plus 5 µL of DNA extract in a total volume of 50 µL. The samples were denatured for 5 min at 95°C prior to 40 cycles (95°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 40 s). An ultimate primer extension was run for 5 min at 72°C. An amplicon of 1131 bp was purified with the Qiaquick PCR purification kit (PE Biosystems) and sequenced with the ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applera) according to the manufacturer's protocol. Fluorescent PCR products were sequenced in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applera).

Nested PCR-RFLP

This method was previously described.[27]

Clonal diversity analysis

When a treatment failure was observed, clonal composition of isolates before and after the failure was determined by analysing the polymorphism of the merozoite surface protein 2 gene (*msp2*). The highly polymorphic region of this gene was amplified using a fluorescent primer followed by analysis in an ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer. Each clone was visualized as a peak, and characterized by the size of the *msp2* PCR product. A quantitative estimation of the proportion of the clone in the parasite population was obtained from the area under the curve of the peak. This quantitative fragment analysis method allows detection of clones accounting for more than 2% of the whole.[26]

Data analysis

Geometric means were used to minimize the effects of outlier values. IC_{50} values were log-transformed to obtain a normal distribution. Statistical analysis was performed with Statview software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Means were compared with Student's t-test or ANOVA, and variances with Fisher's or Levene's test.

Results

Patients' ages ranged from 1 to 81 (mean 33 ± 16 years), and the male/female sex ratio was 2.9. Atovaquone susceptibility (IC_{50}) ranged from 0.1 to 8230 nM, with a geometric mean of 1.79 nM and a median of 2 nM. All values determined before treatment were between 0.1 and 28 nM and were normally distributed after log-transformation (Figure 1). Values ranged from 0.15 to 6.8 nM in patients with atovaquone/proguanil treatment success, from 0.5 to 14.7 nM in patients lost to follow-up and from 0.1 to 28 nM in patients having received other treatments. One late

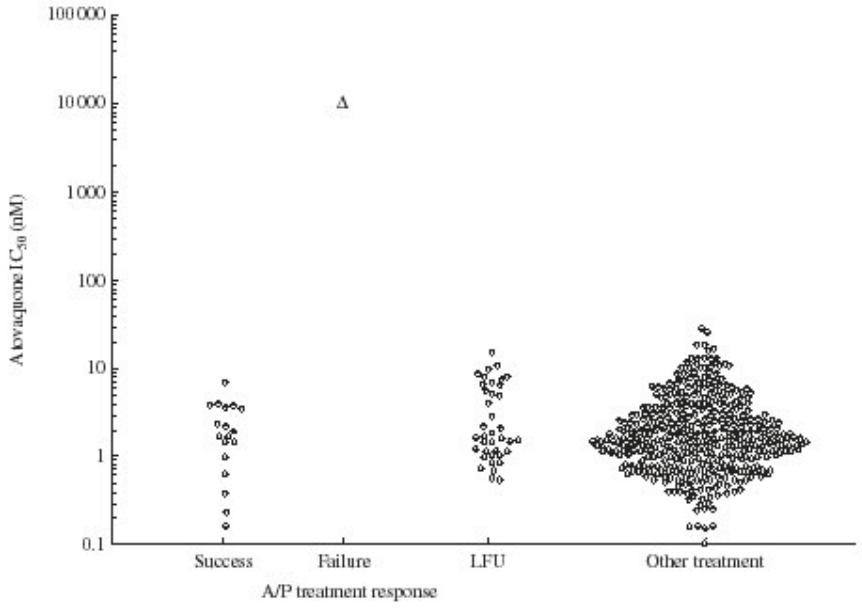


Figure 1. Distribution of atovaquone susceptibility values of *P. falciparum* (IC_{50} in nM) according to the treatment response. Success (n = 21), patients successfully treated with atovaquone/proguanil (A/P) (i.e. absence of parasites and symptoms on Day 28); failure, patient with A/P treatment failure (presence of parasites and symptoms between day 4 and day 28); LFU (n = 36), patients lost to follow-up; other treatment (n = 419). Susceptibility was evaluated before treatment (circles) and after A/P treatment failure (triangle).

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

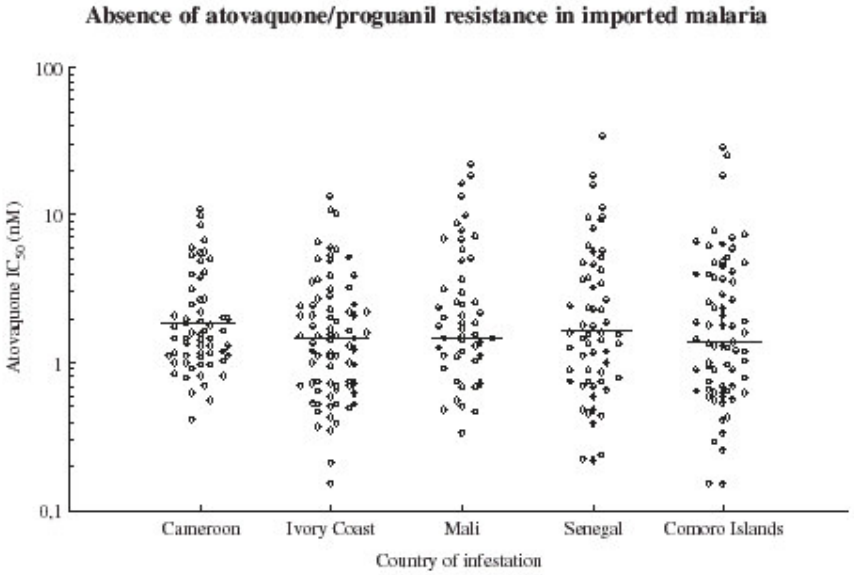


Figure 2. Distribution of atovaquone susceptibility values of *P. falciparum* (IC_{50} in nM) according to countries in West Africa (Cameroon, Ivory Coast, Mali and Senegal) and The Comoro Islands. Geometric means are indicated with bars.

atovaquone/proguanil treatment failure was observed on day 26 in a patient returning from Mali. Unfortunately, atovaquone susceptibility testing was unsuccessful before treatment in this patient. The post-treatment value of 8230 nM was more than two logs different from values in the other three groups.

Most travellers were infected in French-speaking Central and West African countries (81%), whereas the remaining were infected in Madagascar ($n = 19$) or The Comoro Islands ($n = 73$). None of the patients reported having taken atovaquone previously. In the absence of atovaquone pressure in Africa, the natural dispersion of atovaquone IC_{50} values was studied for countries with sufficient data (Figure 2). The geometric means of atovaquone susceptibility were 1.9 ± 1.2, 1.7 ± 1.2, 1.7 ± 1.3, 1.8 ± 1.3 and 1.6 ± 1.3 nM for Cameroon, Ivory Coast, Mali, Senegal and The Comoro Islands, respectively, without atovaquone/proguanil *in vitro* resistance identified. No significant difference was observed between these countries.

Including the case of atovaquone/proguanil failure, no mutation was detected by RFLP in the *cytb* gene of pre-treatment isolates ($n = 477$). One Y268S change was identified in the post-treatment isolate from the failure. To screen for polymorphisms in the entire *cytb* gene, 270 isolates were further sequenced. Nine single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified (Table 1). Five of the nine base pair changes were non-synonymous, namely V54L (GTT to CTT), S70N (AGT to AAT), Y268S (TAT to TCT, previously found with RFLP), F306L (TTT to TTA) and H362Q (CAT to CAA) (GenBank accession numbers AY588279, AY588280, AY910012, AY910013 and AY910014). The four other SNPs were synonymous. Eight SNPs occurred in isolates with atovaquone susceptibility values between 3.6 and 8.7 nM, the Y268S change was associated with an atovaquone IC_{50} of 8230 nM. *msp2* profile of the pre-treatment isolate allowed identification of two clones accounting for 77% and 23% of the whole, respectively. After the failure, the initially dominant clone disappeared, the minor clone was still present at a low value (13%) and a new clone accounted for 87% of the whole.

Table 1. SNPs detected in the cytochrome *b* gene and corresponding atovaquone susceptibility values

Isolate no.	Atovaquone IC_{50} (nM)	Nucleotide change	Amino acid change
1	3.7	g160c	V54L
2	4.6	g209a	S70N
3	8230	a803c	Y268S
4	8.7	t918a	F306L
5	3.6	t1086a	H362Q
6	6.6	c90t	no
7	4	a126t	no
8	4.7	c234t	no
9	3.8	c1059t	no

Isolate 3 was obtained after atovaquone/proguanil treatment failure, the others were isolated before treatment.

Discussion

We observed one late clinical failure during a 6 year atovaquone resistance phenotyping survey of *P. falciparum*. Unlike pre-treatment isolates, parasites recovered after failure bore a mutation modifying codon 268 of Cyt*b*. This change was associated with an atovaquone IC_{50} of 8230 nM. Three previously published atovaquone treatment failures had *in vitro* susceptibilities of 1900 nM (after a standard atovaquone/proguanil regimen), 10 000 nM and 13 500 nM (after treatment with atovaquone alone or in various combinations).[5,15,28] We also evaluated the atovaquone susceptibility of strain TM90C2b isolated from a Thai patient after atovaquone failure.[6] These five values differed markedly from those associated with therapeutic successes (0.2–6.8 nM), creating a bimodal distribution distinguishing cure and failure. Consequently,

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

all isolates studied before treatment may reasonably be considered as susceptible (0.1–28 nM).

We identified isolates with amino acid changes owing to SNPs. Except for Y268S, these changes were located outside the ubiquinone reduction site and were associated with high atovaquone susceptibility. This study being done during the first years of atovaquone/proguanil use, drug pressure was not involved in these SNPs, which probably represent natural polymorphisms. This low frequency of *cytb* polymorphism is consistent with the strong conservation of mitochondrial genes linked with functions crucial for parasite survival.[29] In several *Plasmodium* species, Tyr^{268} is conserved at a position close to the ubiquinone reduction Q_o site. The change to serine, a hydrophilic amino acid, limits hydrophobic contacts with atovaquone. This could explain the consistent and marked decrease in atovaquone susceptibility in mutated parasites.[15,28] As this Y268S change is not systematically detected after atovaquone/proguanil failure, poor atovaquone bioavailability is likely to explain most of these discrepancies.[20,30] Nevertheless, in parasites from our patient with atovaquone/proguanil failure, two clones with distinct *msp2* allelic profiles were identified before treatment. Genotyping results suggested that at least the majority clone, and probably the other one, were Tyr^{268}. After treatment failure, one clone disappeared and a third one emerged. Considering its high proportion (87%), the corresponding genotype was probably linked to sequencing result, Ser^{268}. As this Ser^{268} mutant and the two other clones differed in their *msp2* gene, the mutant clone was probably present but undetectable before treatment. An alternative explanation is appearance of the mutation in the patient's parasites during treatment. This points to lesser fitness of Ser^{268} mutants in the natural situation, as previously observed with other *cytb* mutants *in vitro*.[31] This also demonstrates the limits of genomic resistance detection, as minor clones may go undetected.[26] We thus sequenced the *cytb* gene in residual *P. falciparum* parasites 1 day after the end of atovaquone/proguanil treatment. No changes were detected in comparison with the pre-treatment isolate (data not shown).

This work suggests that the atovaquone resistance threshold previously published (5–7 nM), before the emergence of atovaquone/proguanil resistance, should be reconsidered.[32] This value was chosen after analysis of therapeutic responses, correlation with the quinine threshold, and use of the 90th percentile of atovaquone susceptibility. In our study, we observed a very high atovaquone IC_{50} (8230 nM) associated with the Y268S change in atovaquone/proguanil-resistant parasites. Considering our results and those of the literature, we recommend the use of the following two *in vitro* atovaquone thresholds to discriminate isolates from travellers: 0–30 nM, susceptible; >1900 nM, resistant. More cases of resistance are needed to adjust the cut-off, particularly with regard to the absence of intermediate values.

It has been suggested that antimalarial resistance within infected patients in a drug pressure environment develops in consecutive steps.[33] In the first, the increase in resistance prevalence is not detectable, whereas the second step begins with clustered cases of resistance, followed by an exponential increase in resistance prevalence. A last phase may involve an increase in the level of resistance, as seen for resistance to DHFR or dihydropteroate synthase inhibitors, owing to an increase in mutation numbers. The usefulness of *in vitro* phenotyping and genotyping of pre-treatment samples is questionable during the first phase, particularly in view of our finding that resistant parasites are usually not detected before drug exposure. Cases of atovaquone/proguanil resistance being recently described in travellers, phenotyping and genotyping studies should be more informative during the therapeutic follow-up.

Acknowledgements

Dennis Kyle (Walter Reed Army Institute of Research, Washington, DC, USA) and David Walliker (Cell Animal and Population Biology, Edinburg, UK) kindly provided us with strains TM90C2b and 3D7, respectively. We thank Philippe Deloron for helpful discussions and suggestions. This work was supported by the French Ministry of Health (grant to the National Reference Centre) and the French Armed Forces Health Service (grants DGA and DRT/STRDT). We thank GlaxoSmithKline for their support of *in vitro* atovaquone susceptibility measurements and blood drug assays in patients with Malarone® treatment failure through a 5 year Phase IV surveillance programme. L. M. is the recipient of a thesis fellowship from the French Research Ministry.

References

1. Muenttener P, Schlagenhauf P, Steffen R. Imported malaria (1985–95): trends and perspectives. *Bull World Health Organ* 1999; **77**: 560–6.

2. Bloland PB, Ettling M. Making malaria treatment policy in the face of drug resistance. *Ann Trop Med Parasitol* 1999; **93**: 5–23.

3. Davies CS, Pudney M, Matthews PJ *et al.* The causal prophylactic activity of the novel hydroxynaphthoquinone 566C80 against *Plasmodium berghei* infections in rats. *Acta Leiden* 1989; **58**: 115–28.

4. Chiodini PL, Conlon CP, Hutchinson DB *et al.* Evaluation of atovaquone in the treatment of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *J Antimicrob Chemother* 1995; **36**: 1073–8.

5. Looareesuwan S, Viravan C, Webster HK *et al.* Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalarial drugs, for treatment of acute uncomplicated malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 1996; **54**: 62–6.

6. Canfield CJ, Pudney M, Gutteridge WE. Interactions of atovaquone with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum in vitro*. *Exp Parasitol* 1995; **80**: 373–81.

7. Looareesuwan S, Chulay JD, Canfield CJ *et al.* Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1999; **60**: 533–41.

8. Gutteridge WE, Dave D, Richards WH. Conversion of dihydroorotate to orotate in parasitic protozoa. *Biochim Biophys Acta* 1979; **582**: 390–401.

9. Fry M, Pudney M. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4′-chlorophenyl)cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem Pharmacol* 1992; **43**: 1545–53.

10. Ittarat I, Asawamahasakda W, Meshnick SR. The effects of antimalarials on the *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. *Exp Parasitol* 1994; **79**: 50–6.

11. Srivastava IK, Rottenberg H, Vaidya AB. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J Biol Chem* 1997; **272**: 3961–6.

12. Fairley HN. Researches on paludrine in malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1946; **40**: 105–62.

13. Ferone R, Burchall JJ, Hitchings GH. *Plasmodium berghei* dihydrofolate reductase. Isolation, properties, and inhibition by antifolates. *Mol Pharmacol* 1969; **5**: 49–59.

14. Srivastava IK, Vaidya AB. A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1334–9.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

15. Fivelman QL, Butcher GA, Adagu IS *et al.* Malarone treatment failure and *in vitro* confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malar J* 2002; **1**: 1.

16. Schwöbel B, Alifrangis M, Salanti A *et al.* Different mutation patterns of atovaquone resistance to *Plasmodium falciparum in vitro* and *in vivo*: rapid detection of codon 268 polymorphisms in the cytochrome *b* as potential *in vivo* resistance marker. *Malar J* 2003; **2**: 5.

17. David KP, Alifrangis M, Salanti A *et al.* Atovaquone/proguanil resistance in Africa: a case report. *Scand J Infect Dis* 2003; **35**: 897–8.

18. Färnert A, Lindberg J, Gil P *et al.* Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria resistant to atovaquone and proguanil hydrochloride: case reports. *Br Med J* 2003; **326**: 628–9.

19. Schwartz E, Bujanover S, Kain KC. Genetic confirmation of atovaquone-proguanil-resistant *Plasmodium falciparum* malaria acquired by a nonimmune traveler to East Africa. *Clin Infect Dis* 2003; **37**: 450–1.

20. Wichmann O, Muehlberger N, Jelinek T *et al.* Screening for mutations related to atovaquone/proguanil resistance in treatment failures and other imported isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe. *J Infect Dis* 2004; **190**: 1541–6.

21. Kuhn S, Gill MJ, Kain KC. Emergence of atovaquone-proguanil resistance during treatment of *Plasmodium falciparum* malaria acquired by a non-immune North American traveller to West Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2005; **72**: 407–9.

22. Fidock DA, Wellems TE. Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 10931–6.

23. Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4097–102.

24. Le Bras J, Andrieu B, Hatin I *et al.* *Plasmodium falciparum*: interpretation of the semi-microtest of *in vitro* chemosensitivity by H3-hypoxanthine incorporation. *Pathol Biol* 1984; **32**: 463–6.

25. World Health Organization (WHO). *Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. WHO/HTM/RBM/2003.50*. 2003. http://www.who.int/malaria/includes_en/whomalariapublications19982004.htm (9 May 2005, date last accessed).

26. Jafari S, Le Bras J, Bouchaud O *et al.* *Plasmodium falciparum* clonal population dynamics during malaria treatment. *J Infect Dis* 2004; **189**: 195–203.

27. Gil JP, Nogueira F, Strömberg-Nörklit J *et al.* Detection of atovaquone and Malarone resistance conferring mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome *b* gene (*cytb*). *Mol Cell Probes* 2003; **17**: 85–9.

28. Korsinczky M, Chen NH, Kotecka B *et al.* Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome *b* that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 2100–8.

29. Joseph JT, Aldritt SM, Unnash T *et al.* Characterization of a conserved extrachromosomal element isolated from the avian malarial parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 3621–9.

30. Rolan PE, Mercer AJ, Weatherley BC *et al.* Examination of some factors responsible for a food-induced increase in absorption of atovaquone. *Br J Clin Pharmacol* 1994; **37**: 13–20.

31. Peters JM, Chen N, Gatton M *et al.* Mutations in cytochrome *b* resulting in atovaquone resistance are associated with loss of fitness in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 2435–41.

32. Gay F, Bustos D, Traore B *et al.* *In vitro* response of *Plasmodium falciparum* to atovaquone and correlation with other antimalarials: comparison between African and Asian strains. *Am J Trop Med Hyg* 1997; **56**: 315–7.

33. Hastings IM, D'Alessandro U. Modelling a predictable disaster: the rise and spread of drug-resistant malaria. *Parasitol Today* 2000; **16**: 340–7.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

1.2 - Discussion

Entre 1999 et 2004, la sensibilité *in vitro* à l'atovaquone de 477 isolats de *P. falciparum* a été déterminée. Les séries antérieures concernaient moins de 60 isolats (Basco, 1995, 2003). Elle nous a permis de mettre en évidence l'absence de résistance naturelle à l'atovaquone en Côte d'Ivoire, au Mali, au Sénégal et aux Comores et de confirmer des résultats précédemment publiés au Cameroun (Basco, 2003). Le génotypage des isolats présentant les plus faibles sensibilités n'a pas identifié de polymorphisme de *pfcytb* au niveau des régions codant les zones de fixation du substrat et de l'atovaquone. Plusieurs études ayant recherché la mutation Y268S par RFLP sur des isolats de voyageurs (Wichmann, 2004a) ou des isolats de terrain provenant d'Afrique (Pimentel, 2006 ; Muehlen, 2004) et de Thaïlande (Naoshima-Ishibashi, 2005) ont depuis confirmé ce résultat.

En 2004, le premier cas d'échec thérapeutique à l'atovaquone-proguanil de notre série a été observé. La sensibilité des parasites présents au moment du diagnostic (J0) n'a pas pu être déterminée mais le jour de la rechute, 26 jours après le début du traitement (J26), les parasites isolés avaient une sensibilité à l'atovaquone nettement diminuée (CI_{50} = 8230 nM). De façon assez surprenante, les parasites à J0 ne présentaient aucune mutation de *pfcytb* alors que ceux isolés à J26 présentaient une mutation au niveau du codon 268, Y268S. Le lien entre la résistance à l'atovaquone-proguanil et le codon 268 de *pfcytb* ayant été confirmé depuis (cf Résultats §3), ce premier cas souligne le fait qu'avant la pression médicamenteuse le marqueur de résistance est indétectable dans la population parasitaire. Ceci suggère que soit les parasites sont sensibles avant l'exposition au traitement, soit les parasites résistants sont minoritaires dans la population ce qui les rend indétectables par les méthodes de génotypage. L'absence de résistance naturelle à l'atovaquone-proguanil observée lors de cette étude doit donc être analysée avec prudence puisque l'étude a essentiellement porté sur des parasites isolés avant traitement médicamenteux par l'atovaquone-proguanil. On ne peut pas exclure une circulation de la résistance à bas bruit dans les populations parasitaires. En effet, dans un premier temps, la résistance existe à une fréquence indétectable (Hastings & d'Alessandro, 2000). Le temps nécessaire avant qu'elle le devienne est fonction de différents facteurs comme le niveau d'utilisation du principe actif, son utilisation seul ou en association, le taux de transmission de la maladie ou encore le fitness relatif des parasites résistants et sensibles. L'intérêt d'analyser les isolats avant traitement est donc limité tant qu'on n'a pas atteint la deuxième phase de l'émergence de la résistance : l'identification d'un foyer de résistance à l'atovaquone-proguanil.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Cette étude a également entraîné la remise en question du seuil de résistance à l'atovaquone précédemment fixé à 6 nM (Gay, 1997). En absence d'échec thérapeutique, ce seuil avait été fixé par la méthode du 90ème percentile ainsi qu'en associant les valeurs de CI_{50} à des succès thérapeutiques (n = 18). L'analyse des valeurs de sensibilité à l'atovaquone *in vitro* associées aux échecs cliniques observés lors de cette étude et dans la littérature nous a permis de situer le seuil de résistance à l'atovaquone *in vitro* entre 40 nM (valeur la plus haute associée à une réponse clinique adéquate) et 1900 nM (valeur la plus basse associée à un échec).

Compte tenu de la difficulté à identifier *in vitro* une résistance naturelle, il nous est apparu important de nous focaliser sur les parasites ayant résisté à l'atovaquone-proguanil. Deux types de parasites résistants ont alors été étudiés, des parasites résistants à l'atovaquone générés *in vitro* et d'autres, issus d'échecs thérapeutiques isolés *in vivo*.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

2. Etude des résistants générés *in vitro*

La résistance n'étant pas détectable dans les isolats naturels, la deuxième approche pour appréhender le mécanisme de résistance à l'atovaquone-proguanil a été de générer expérimentalement des parasites résistants à l'atovaquone. Différentes techniques peuvent être utilisées pour induire la résistance, des pressions *in vivo* dans des modèles aviaires, murins ou simiens ou des pressions *in vitro* sur *P. falciparum*. Nous avons effectué des pressions médicamenteuses *in vitro* sur la souche sensible de *P. falciparum* 3D7 (CI_{50} : 1,21 ± 0,21 nM, n = 3). Ainsi, 3.10^7 parasites ont été mis en contact avec des concentrations croissantes d'atovaquone en débutant au niveau de la CI_{90} de 3D7 (3 nM) puis en augmentant par palier à 4, 5, 7, 8, 20 pour atteindre 50 nM durant le septième mois de culture. La pression était appliquée jusqu'à disparition des formes sur le frottis puis levée jusqu'à réapparition. L'étape à 20 nM a été effectuée deux fois de suite (20 nM 2×). Ainsi la pression a été appliquée pendant 54 jours au total. L'analyse de la sensibilité à l'atovaquone associée à des génotypages réguliers de *pfcytb* nous a permis de mettre en évidence une diminution progressive de la sensibilité à l'atovaquone ainsi que l'apparition de trois mutations, M133I, K272R et V284G (Figure 17).

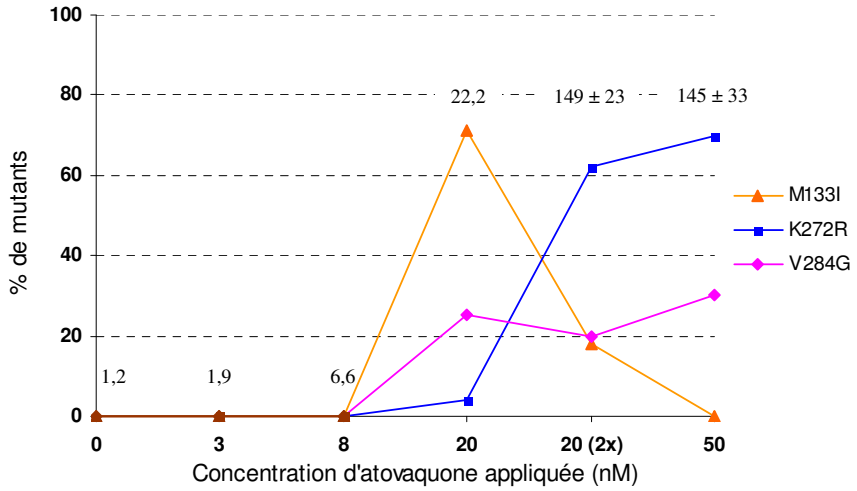


Figure 17 : Pourcentage de mutants du gène du cytochrome *b* associée au phénotype à différents paliers de sélection par l'atovaquone *in vitro*.

Les valeurs au-dessus des points représentent la concentration d'atovaquone inhibant de 50% la croissance parasitaire (CI_{50} nM). Ces valeurs représentent la sensibilité moyenne de l'ensemble des parasites (donc des génotypes) présents dans l'isolat. La proportion de chacun des génotypes dans chacun des isolats a été déterminée à partir des résultats obtenus en séquençage.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Le phénotype de sensibilité à l'atovaquone et le génotype *pfcytb* des clones issus du clonage/sous-clonage des parasites isolés après les étapes 20 nM 2× et 50 nM ont été déterminés selon les méthodes décrites dans l'article 1 (cf Résultats §1.1). Pour tenter d'identifier d'autres mécanismes de résistance, nous avons recherché des mutations au niveau du gène de la dihydroorotate déshydrogénase (*pfdhod*, Annexe 2) puisqu'une fixation directe de l'atovaquone sur cette enzyme a été décrite chez le rat (Knecht, 2000) et nous avons analysé l'évolution du nombre de copies de *pfcytb* au cours de la pression médicamenteuse à la recherche d'une amplification génique (pour la méthode, cf Résultats §4). Tous les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous (Tableau 7).

Tableau 7 : Caractérisation phénotypique et génotypique des clones observés durant la pression médicamenteuse par l'atovaquone.

	CI_{50} atovaquone (nM)	**Gène *pfcytb***		**Mutations de *pfdhod***
		Mutations	Nombre de copies	
3D7	1,21 ± 0,21	Référence	37 ± 3	Référence
3D7 3nM	1,94	Aucune	ND	Aucune
3D7 8nM	6,6	Aucune	ND	Aucune
3D7 20nM	22,2	M133I, K272R, V284G	ND	Aucune
3D7 20nM 2×	149 ± 23	M133I, K272R, V284G	ND	Aucune
3D7 50 nM	145 ± 33	K272R, V284G	ND	Aucune
Clone PAV20bA	187 ± 8	K272R	45 ± 3	Aucune
Clone PAV20bC	40,1 ± 2,7	V284G	74 ± 10	Aucune
Clone PAV50	175 ± 20	K272R	35 ± 5	Aucune

La sensibilité des clones que nous avons obtenus se situe dans la zone (entre 40 et 1900 nM) où nous ne savons pas si les parasites sont chimiorésistants ou non à l'atovaquone-proguanil (cf étude précédente). Une augmentation d'un facteur de 20 de la CI_{50} à l'atovaquone par rapport à la souche initiale est cependant observée. Comme cette augmentation est beaucoup moins marquée que le niveau de résistance associé à un échec *in vivo* (facteur de 2000), nous ne pouvons parler que de clones de sensibilité à l'atovaquone diminuée. La réduction de la sensibilité, si petite soit-elle, coïncide avec l'apparition de mutations au niveau de *pfcytb*. Seules deux mutations ponctuelles signifiantes ont été observées, K272R et V284G. La mutation M133I, majoritaire à l'étape 20 nM, n'a pas pu être isolée. Dans les précédentes études, cette mutation a été observée seule lors des premières étapes de pression (Korsinczky, 2000). Avec l'augmentation des concentrations, elle devenait systématiquement associée à d'autres mutations. Dans notre étude, compte tenu des génotypes individualisés par le clonage parasitaire, on peut supposer que les

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

parasites portant cette mutation étaient simple mutant. Le fitness des parasites mutants M133I n'étant pas modifié (Peters, 2002), c'est probablement le faible niveau de résistance conféré par cette simple mutation (CI_{50} publiée à 80 nM ; Korsinczky, 2000) qui n'a pas permis à ce clone parasitaire de survivre à l'augmentation des concentrations à 50 nM. Les mutations *pfcytb* observées se trouvent sur des positions identiques à celles déjà décrites dans les études précédentes (Korsinczky, 2000 ; Srivastava, 1999 ; Syafruddin, 1999 ; cf Situation du sujet §3.6.1). Très conservées parmi de nombreuses espèces Eucaryotes, ces positions sont situées dans le site actif du cytochrome *b* qui est aussi le lieu de fixation de l'atovaquone. Pour espérer identifier des mutations semblables à celles retrouvées *in vivo*, nous aurions pu effectuer une pression médicamenteuse associant de l'atovaquone et du proguanil. Les résultats n'auraient probablement pas été différents puisqu'une précédente étude avait été faite en associant de l'atovaquone et du cycloguanil et les mutations observées par les auteurs étaient identiques à celles obtenus avec de l'atovaquone seule (Schwöbel, 2003). Une augmentation du nombre de copies du gène *pfcytb* est observée chez la souche PAV20bC par rapport à la souche parent 3D7 ($p < 0,004$). Cette amplification génique n'étant pas corrélée avec le niveau de sensibilité des parasites à l'atovaquone, aucune amplification génique de *pfcytb* n'est associée à la résistance à l'atovaquone. De plus, aucune variation de séquence du gène *pfdhod* n'a été observée entre les différents clones.

Dès l'identification d'un nouveau principe actif, des pressions médicamenteuses *in vitro* sont généralement réalisées, avant que des échecs thérapeutiques ne soient identifiés, pour accélérer la recherche de marqueur de résistance. Avec l'atovaquone, les pressions sur *P. berghei*, *P. yoelii* et *P. falciparum* ont permis d'identifier 11 mutations distinctes dont la plupart sont localisées dans le site actif du cytochrome *b*. Les mutations sélectionnées *in vitro* sont généralement les mêmes d'une espèce à l'autre, mais elles ne sont jamais sélectionnées *in vivo*. Alors que le codon 268 du cytochrome *b* est impliqué dans le premier cas de résistance à l'atovaquone observé *in vivo* (Y268S), cette mutation n'a été observée qu'une seule fois dans le modèle murin avec *P. yoelii* (Y268C). Les mêmes constatations ont été faites avec le cycloguanil, la pyriméthamine ou encore la chloroquine (Paget-McNicol & Saul, 2001). Il est donc important d'analyser les résultats obtenus suite à des pressions médicamenteuses *in vitro* avec prudence car même s'ils permettent souvent de localiser le gène impliqué dans la résistance, les mutations observées sont rarement les mêmes que celles observées lors d'un processus sélectif naturel *in vivo*. Plusieurs raisons pourraient expliquer cette discordance. Les concentrations de principe actif utilisées *in vitro* sont toujours des concentrations sub-thérapeutiques, ce qui modifie nettement la réponse des parasites

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

comparée à un effet thérapeutique *in vivo*. Dans le cas de l'atovaquone, des pressions utilisant des concentrations plus élevées ont été effectuées (jusqu'à 500 nM) mais n'ont jamais permis de générer des parasites résistants (Korsinczky, 2000). Enfin, l'explication la plus convainquante est que la culture *in vitro* est effectuée à une température contrôlée (jamais plus de 37°C) dans un milieu de culture tamponné et dans des conditions de stress oxydant très différentes de l'*in vivo*. L'atovaquone, en bloquant le transfert des électrons, entraîne probablement la formation de nombreux radicaux oxygénés qui pourraient générer de nombreuses mutations. Un tel mécanisme a été évoqué lors de la pression médicamenteuse sur *P. yoelii* chez la souris en partant du constat que 11 des 12 substitutions observées étaient un remplacement d'une base A:T par une G:C (Srivastava, 1999). Les auteurs ont alors suggéré une action mutagène de l'atovaquone par production de radicaux oxygénés qui peuvent oxyder la guanine en oxo-guanine (Friedberg, 1995). Cette dernière a alors la propriété de s'associer à une adénine lors de la réplication de l'ADN. Mis à part ce pouvoir mutagène de l'atovaquone, l'apparition des mutations est classiquement liée à des erreurs aléatoires au cours de la réplication de l'ADN. Le nombre de parasites mis en contact avec la molécule est donc primordial. En effet, pour sélectionner un parasite résistant, le nombre de parasites mis en contact avec le principe actif doit être supérieur à la fréquence d'émergence de la résistance qui elle-même dépend du taux de mutation de l'ADN et du nombre de mutations nécessaires à son acquisition. Le deuxième intérêt des pressions médicamenteuses est donc de déterminer la fréquence de base d'émergence de la résistance propre à chacune des molécules dans la population naturelle. Nos pressions médicamenteuses n'ont pas permis d'effectuer un tel calcul puisque la culture n'a pas été effectuée en continu mais a subi de nombreuses congélations/décongélations. Il est donc difficile d'évaluer la perte de parasites engendrée par une telle manipulation. D'autres études ont cependant déduit que pour l'atovaquone, la fréquence d'apparition de la résistance est comprise entre 10^{-5} et 10^{-6} par nucléotide et par mitose à une concentration d'atovaquone de 10 nM (Gassis & Rathod, 1996 ; Rathod, 1997). Ce taux est supérieur à celui de la plupart des antipaludiques comme la pyriméthamine ou le cycloguanil qui est de 10^{-9} pour l'acquisition d'une mutation (Paget-McNicol & Saul, 2001). Ceci va donc dans le sens d'une éventuelle action mutagène de l'atovaquone.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

3. Etude de la résistance observée *in vivo*

3.1 - Article 2 (soumis)

In vivo emergence of *cytochrome b* codon 268 mutations conferring *Plasmodium falciparum* resistance to atovaquone-proguanil during treatment

Lise Musset[a,b,*], Olivier Bouchaud[c], Sophie Matheron[d], Laurent Massias[e], Jacques Le Bras[a,b]

[a]Laboratoire de biologie animale et parasitaire, EA209, Université Paris Descartes, 4, av de l'obsevatoire, 75006 Paris, [b]Centre national de référence pour la chimiosensibilité du paludisme, APHP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, 46 Rue Henri Huchard, 75877 Paris cedex 18, [c]Unité de maladies infectieuses et tropicales, APHP, Hôpital Avicenne, 125, rue de Stalingrad, 93000 Bobigny, [d]Unité de maladies infectieuses et tropicales, APHP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, 46 Rue Henri Huchard, 75877 Paris cedex 18, [e]Laboratoire de toxicologie, APHP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, 46 Rue Henri Huchard, 75877 Paris cedex 18, France.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

SUMMARY

Plasmodium falciparum resistance to atovaquone-proguanil has so far been associated with Y268S or Y268N mutations in cytochrome *b* (cyt*b*), although these changes were identified in only seven of the eleven therapeutic failures. Here, we describe 10 new cases of atovaquone-proguanil failures among which parasite resistance was confirmed in six cases, either by identifying correct drug concentrations in patient plasma or by observing in vitro atovaquone resistance. Resistance was consistently associated with codon 268 mutations (Y268S or a previously unidentified mutation, Y268C). Notably, mutations were not detected before treatment but only after drug exposure.

Key words : *Plasmodium falciparum*, chemotherapy, resistance, cytochrome *b*, atovaquone, proguanil.

INTRODUCTION

In 1996, the atovaquone-proguanil (AP) combination was registered in North America and Europe for the prophylaxis and treatment of malaria. While this safe and efficient combination is increasingly used in developed countries, owing its high cost, its use is limited in endemic countries. Atovaquone, an ubiquinone analogue binding to cytochrome *b* (cyt*b*) of plasmodial mitochondria, inhibits electron transfer of the respiratory chain [1]. In combination with atovaquone, proguanil lowers the effective concentration at which the former collapses the mitochondrial membrane potential [2]. However, the proguanil target and the detailed mechanism implicated in AP synergy remain unknown. Since the introduction of AP combination, eleven cases of treatment failures have been published in travelers returning from Africa [3-7]. Seven failures exhibited a modification of cyt*b* codon 268, mostly from tyrosine (Y) to serine (S), however four failures were reported without any *cytb* mutation. Thus, the usefulness of *cytb* 268 mutations for predicting *P. falciparum* AP resistance has been questioned [8]. The limitation for understanding the failure mechanisms may also have been related to an insufficient description of the cases, impairing discrimination between parasite resistance and poor drug absorption. With this in mind, this study was designed to investigate putative causes of ten additional AP treatment failures identified over a 3-year period.

MATERIALS AND METHODS

Patients. Between January 2003 and September 2005, in five hospitals of the Paris area, six cases of AP treatment failures were identified among 298 patients suffering from uncomplicated *P. falciparum* malaria and treated with AP (four tablets daily for three days). As our laboratory is the French national reference centre for malaria, we were informed of four additional cases of late AP therapeutic failure. Most patients, being 9-75 years of age, had returned from Central or West African countries. Eighty percent were living in France but were native from the country of infection. In agreement with

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

national consensus, all patients with failure were re-treated with quinine. Informed consent was not required for this study as the following procedures are part of the French national recommendations for the care and surveillance of malaria.

Investigation of therapeutic failures. For all treatment failure patients, atovaquone in vitro susceptibility testing, *cytb* and *dhfr* genotyping, and merozoite surface protein 1 and 2 (*msp2, msp1*) polymorphism analyses were performed on day-0 and day-of-failure isolates. Measurements of atovaquone, proguanil and cycloguanil concentrations were determined from plasma taken on day 3 to assess for correct drug absorption and compliance.

- Atovaquone in vitro susceptibility testing. An in vitro isotopic test was used to determine the atovaquone 50 % inhibitory concentration (IC_{50}). The in vitro atovaquone resistance threshold was set at 1900 nM [9].

- Cytochrome *b* genotyping. The entire *cytb* gene was analysed by sequencing [9]. The Y268S change results were confirmed using a nested polymerase chain reaction followed by a restriction full-length polymorphism method.

- *Dhfr* genotyping. The three major *dhfr* mutations (at positions 51, 59, 108) associated with cycloguanil resistance were studied with a restriction method.

Parasite population analysis. Parasite diversity within isolates was determined by analysing the *msp1* and *msp2* polymorphisms. The highly polymorphic region of each gene was amplified with a fluorescent primer. Each genotype was visualized as a peak and characterized by the size of *msp* PCR products. The area under the curve of the peak corresponded to a quantitative estimation of the clonal proportion in the population. This *msp* fragment analysis method allows for the detection of all genotypes accounting for more than 2 % of the whole parasite population [10].

Drug measurements. Determinations of drug concentrations in plasma were performed by reversed-phase liquid chromatography. The lower limits of quantification were 1.4 µM, 0.03 µM and 0.04 µM for atovaquone, proguanil and cycloguanil, respectively. Expected atovaquone concentrations in the plasma in malaria treatment was evaluated between 3 and 20 µM, 0.6 and 18 µM, 0.3 and 2.2 µM on day 3, 8 and 21 respectively [11].

Classification of therapeutic failures. To define a reliable allele of AP resistance, therapeutic failures were classified in three categories:

i) Failures in absence of AP resistance : incorrect plasma drug dosages associated with day-of-failure parasites in vitro susceptible to atovaquone,

ii) Failures caused by AP resistance : correct drug dosages or day-of-failure parasites resistant to atovaquone,

iii) Undetermined.

RESULTS

Of the ten analysed atovaquone-proguanil therapeutic failures, parasite resistance was present, absent and undetermined in five, three and two cases respectively (Table 1). All five cases of confirmed AP resistance carried *cytb* 268 mutations, these being Y268S (n=3) or the novel mutation Y268C (n=2), and all five were associated with triple mutant *dhfr* genotype.

Additional information was available for three patients :

Patient 5 : The first *P. falciparum* infection was diagnosed in a private pathology laboratory and immediately treated with AP. Symptoms returned 21 days later leading to a self-treatment with a second standard AP regimen. After a 2-day period without any improvement, the patient presented at the hospital with a 38.5°C fever.

Patient 6 : This man prolonged his standard treatment with 2 tablets daily during 6 days without any medical advice.

Patient 8 : A standard AP treatment was prescribed in a 14-year old girl. Day-10 parasitaemia was negative but a new malaria attack occurred on day 23. An interview determined that she took four pills as a single dose. Consequently, this attack was not considered as a failure, and the girl was hospitalised for a new AP treatment under supervision. Nevertheless, a third malaria attack occurred on day 39.

DISCUSSION

In imported uncomplicated *P. falciparum* malaria, AP has rapidly become the first line antimalarial drug in most European infectious diseases wards. Epidemiological monitoring of *P. falciparum* resistance to AP has thus become essential and requires reliable molecular markers. Since the emergence of AP resistant parasites, Y268S and Y268N *cytb* changes have been proposed as a molecular marker of *P. falciparum* AP resistance, however they were not identified in all treatment failures. In the current study, the involvement of *cytb* codon 268 was confirmed in all cases of AP parasite resistance. Moreover, two cases were associated for the first time with a Y268C mutation. The previously reported Y268N mutation was not observed in this series [3]. Our Y268S or Y268C parasites exhibited an important level of resistance with atovaquone IC_{50} values around 10,000 nM, far above the resistance threshold of 1900 nM. The higher atovaquone in vitro resistance level observed with Y268C parasites (17,000 nM) than with Y268S parasites (8230 and 10,400 nM) could be explain by a sulfur atom of the cysteine less electronegative than the oxygen atom of the serine. Yeast transfection studies demonstrated that tyrosine change by a nucleophilic residue, cysteine or serine, suppressed cyt*b*-atovaquone interactions and conferred atovaquone resistance [12]. Involvement of weak

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Table 1. Characterization of atovaquone/proguanil (AP) *falciparum* malaria treatment failures.

		Failure in absence of AP resistance			Failure caused by AP resistance					Undetermined	
		Patient 1	**Patient 2**	**Patient 3**	**Patient 4**	**Patient 5**	**Patient 6**	**Patient 7**	**Patient 8**	**Patient 9**	**Patient 10**
Age		40	17	22	38	51	36	55	14	28	23
Sex		M	F	F	F	M	M	M	F	M	F
Country of infestation		Mali	Ivory Coast	Mali	Burkina Faso	Burkina Faso and/or Mali	Guinea	Ivory Coast	Ivory Coast	Mali	Burkina Faso and/or Senegal
Chemoprophylaxis		None	CP underdosed	CP underdosed	CP underdosed	CP correct	CP correct	None	None	CP correct	CP correct
D0[a]	**symptoms**	Fever, diarrhoea vomiting	Fever	Headaches asthenia	Fever, shiver	Fever	Fever	Fever	Fever	Fever, shiver	Fever
	parasitaemia	0.002 %	0.3 %	0.007 %	0.35%	Unknown	13 %	4%	0.15%	0.2 %	2.8 %
Failure	**day**	3	7	11	22	25	26	26	39	3	28
	symptoms	Fever	None	Fever, diarrhoea	Fever	Fever	Fever	Fever, shiver	Fever	Asthenia	None
	parasitaemia	0.5 %	1 %	0.75 %	0.47%	0.04%	5 %	5%	0.25%	1.1 %	1.5 %
	atov. IC_{50} (nM)	**9.89**	**1.49**	**7.87**	**17,000**	ND	**8230**	Unsuccessful	**10,400**	unsuccessful	unsuccessful
Remark		D1: vomiting	Intakes with low fatty food	Intakes: 2 pills/day 6days	D7 parasitaemia negative, *cytb* wt	2 correct AP treatments (D0 and D21)	D0: 1 AP treat. D4: 2 pills/day 6days	Hospitalised patient	D10 parasitaemia negative, *cytb* wt	D2: vomiting	Hospitalised patient Weight 100 kg
Drug level (µM)	**atovaquone**	**3**	**< 1.4**	**< 1.4**	**13.4**	D2 **10.1**	ND	**1.9**	D8 **4.1**	**< 1.4**	**1.4**
	proguanil	D3 **1.1**	D3 **< 0.03**	D3 **< 0.03**	D3 **1.8**	of 2nd **2.1**	ND	D26 **< 0.03**	of 2nd **< 0.03**	D3 **0.04**	D3 **ND**
	cycloguanil	**0.05**	**< 0.04**	**< 0.04**	**0.2**	treatment **0.1**	ND	**< 0.04**	treatment **< 0.04**	**1.6**	**ND**
***Msp2* polymorphism**[b]	**D0**	716 (1)	767 (1)	716 (0.43) 772 (0.57)	714 (1)	ND	836 (0.77) 986 (0.23)	735 (0.47) 755 (0.53)	682 (1)	855 (1)	682 (0.82) 864 (0.18)
	Dfailure	716 (1)	767 (1)	716 (0.85) 772 (0.15)	714 (1)	717 (1)	956 (0.87) 986 (0.13)	755 (1)	682 (1)	855 (1)	864 (1)
***Cytb* genotype**[c]	**D0**	wt	wt	wt	Asn^{299}	ND	wt	wt	wt	wt	wt
	Dfailure	wt	wt	wt	Cys^{268}, Asn^{299}	Ser^{268}	Ser^{268}	Cys^{268}	Ser^{268}	wt	Ser^{268}
***Dhfr* genotype**[d]	**D0**	wt	Triple mutant	Triple mutant	Triple mutant	ND	Triple mutant	Triple mutant	Triple mutant	wt	Triple mutant
	Dfailure	wt	Triple mutant	Triple mutant	Triple mutant	Triple mutant	Triple mutant	Triple mutant	Triple mutant	wt	Triple mutant

[a] day of the diagnosis and initiation of the treatment ; [b] merozoite surface protein 2 polymorphisms: each clone was characterized by the size of amplification products in base pair, in brackets its proportion in the parasite population, *msp1* genotyping results provided no additional information to *msp2* alone as such are not shown ; [c] cytochrome *b* genotype ; [d] dihydrofolate reductase genotype ; CP: chloroquine-proguanil ; wt: wild-type ; ND: not done. Criteria of classification of the failures were in bold.

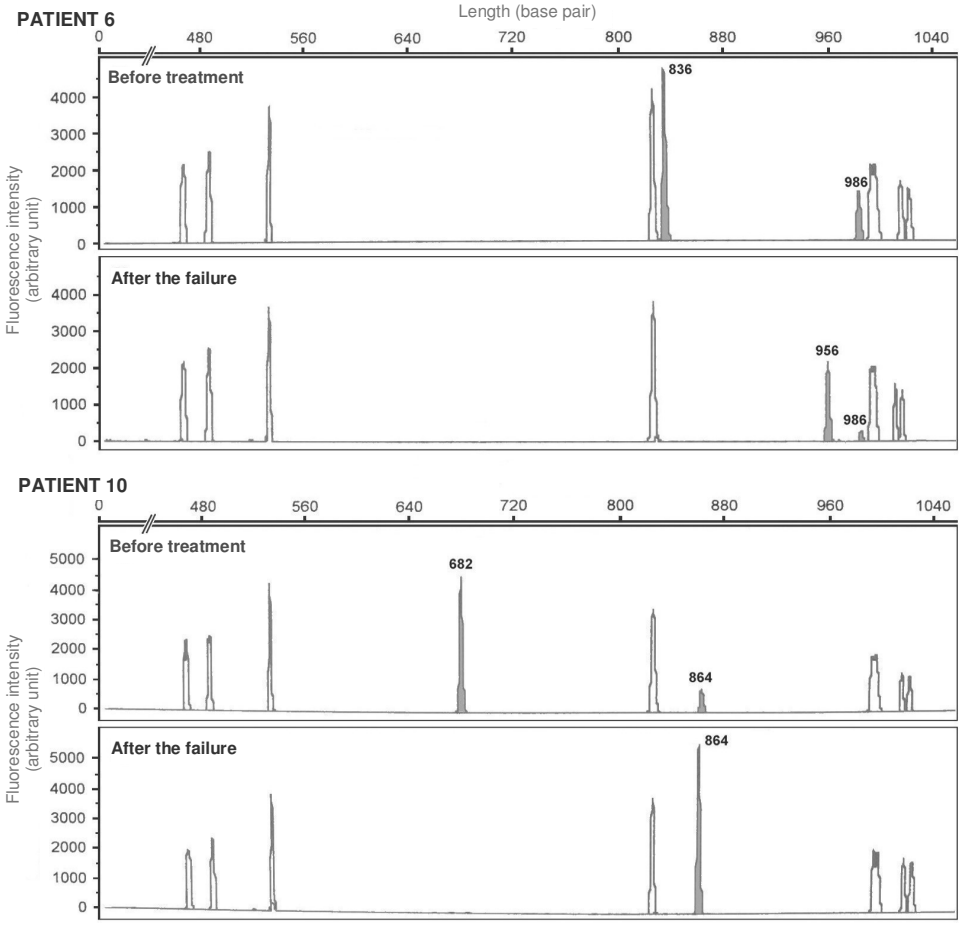


Figure 1. *Msp2* genotypic composition of *P. falciparum* parasites isolated from patient 6 and patient 10 before treatment and upon parasite recrudescence. Genotypes of each isolate were visualized by electropherograms. White peaks represent the internal lane standard (470 to 1021 base pairs) and grey peaks represent genotypes. Each genotype was characterized by the size of the *msp2* amplification product and a quantitative estimation of its proportion in the parasite population was derived from the value yielded by the area under the curve of the corresponding peak (value in table 1). In these two cases, the atovaquone-proguanil treatment failure was associated with parasite resistance.

hydrogen bonds from the aromatic side chain of tyrosine (fully conserved in all cytochrome *b*) is recently suggested as crucial for positioning ubiquinol in the active site of cytochrome *b* [13]. Our results confirmed the findings of these studies in vivo and in vitro in *P. falciparum*.

Observations from patient 10 show that AP failure is not systematically associated with symptoms on day 28. Residual plasma concentration of atovaquone on day 3 was at the limit of detection. As intakes were supervised, the low level of drug could have resulted from the patient's high weight of 100 kg. In fact, compared to a typical 70 kg patient, oral clearance and volume of distribution of atovaquone were increased by 40 % [11]. Nevertheless, even if this low level of atovaquone contributed to the failure, the presence of the Y268S mutation on day 28 suggested parasite resistance. In patients 1, 2 and 3, the atovaquone in vitro phenotype excluded parasite resistance, with susceptible values far below the in vitro threshold of 1900 nM. Day 3 drug level measurements confirmed poor absorption or bad observance. In these cases, no *cytb* polymorphism was identified in parasites isolated before and after the treatment failure. Atovaquone is a very lipophilic drug and its low bioavailability is 4-fold increased (reaching 23 %) with simultaneous intake of fatty food. This characteristic of atovaquone may explain the large number of failures linked with poor absorption. In patient 9, undetectable plasma drug levels were identified but atovaquone in vitro tests were unsuccessful, thus parasite resistance could not be excluded. Nevertheless, the short time (3 days) that elapsed before parasite recrudescence and the presence of the Y268 codon in cyt*b* suggested treatment failure in the absence of AP parasite resistance.

Pre-treatment isolates available in five out of six AP resistance cases (patients 4, 6, 7, 8 and 10) showed the parasites to be cyt*b* wild-type on day 0, and until day 7 and day 10 for patients 4 and 8 respectively. For a better understanding of AP resistant parasite emergence in

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

patients, *msp2* and *msp1* profiles of day-0 and day-of-failure parasites were explored. In absence of travel between day-0 and day-of-failure, reinfection was excluded in all patients. Profiles from patients 4, 7, 8 and 10 showed that the *msp2* genotypes identified after recrudescence were also identified in day-0 isolates tested (Fig. 1). Considering that this common *msp* genotype accounted for 18% at least of the whole parasite population, if AP resistance alleles were associated then they should have been identified in day-0 isolates. These observations suggest that mutation appeared after day-0, either spontaneously or as a consequence of atovaquone action within the mitochondria, as previously suggested [14]. Profiles from patient 6 brought argument for the absence or undetectable level of resistant clone before treatment. In fact, in the day-of-failure sample, an initially undetected genotype accounted for 87 % of the whole parasite population was detected. Considering that only the Y268S *cytb* genotype was observed in this sample, this newly dominant clone was likely to be the resistant one. Three previous cases of AP therapeutic failure with simultaneous genotyping of day-0 and day-of-failure parasites have been reported. Y268S was identified before treatment in one case, while in the other two, a change of *cytb* genotype was observed. In these latter two cases, an identical *msp1* genotype composition was found in day-0 and day-of-failure isolates [4, 5, 7]. In patient 5, a change in codon 299 was observed in parasites from both day-0 and day-of-failure suggesting a natural polymorphism at this position.

In this study, all the therapeutic failure isolates from before or after parasite recrudescence were *dhfr* triple mutant, except for patients 1 and 9. Even though a previous study demonstrated the absence of *dhfr* triple mutations on the intrinsic activity of proguanil, we could not exclude a cycloguanil selection of these mutations during the treatment [15]. Nevertheless, owing to the elevated proportion of isolates bearing triple mutations in West and Central Africa (30-50 %), no conclusion could be drawn between *dhfr* mutations and AP resistance.

Not considering therapeutic failures reported from external hospitals, two cases of AP therapeutic failures were identified as associated with parasite resistance among 298 patients followed between 2003-2005. Several patients were not followed for 28 days, and our calculations predict the actual prevalence of AP resistance in this population to be equal to or higher than 0.08%. Therapeutic failures associated with parasite resistance occurring after day 20 highlight the importance of monitoring AP treatment efficacy for at least 28 days. Finally, *cytb* codon 268 is clearly implicated in AP resistance with two AP resistant alleles identified : Y268S and Y268C. Nevertheless, these have not been detectable before exposure to the drug and improvements of the sensitivity of existing genotypic methods are necessary to confirm or not the absence of mutation on day-0 isolates.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all collaborating centres for their participation in collecting materials and data. This work was supported by the French Ministry of Health (grant to the National Reference Centre). LM is the recipient of a PhD grant from the French Ministry of Education and Research. We thank David Fidock and Jérôme Clain for helpful discussions and suggestions.

REFERENCES

[1] M. Fry, M. Pudney, Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone,2-[trans-4-(4'chlorophenyl)cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80), Biochem. Pharmacol. 43 (1992) 1545-1553.

[2] I.K. Srivastava, A.B. Vaidya, A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil, Antimicrob. Agents Chemother. 43 (1999) 1334-1339.

[3] Q.L. Fivelman, G.A. Butcher, I.S. Adagu, D.C. Warhurst, G. Pasvol G, Malarone treatment failure and in vitro confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria, Malar. J. 1 (2002) 1 [Online.] Available at: http://www.malariajournal.com/content/1/1/1. Accessed 11 January 2005.

[4] E. Schwartz, S. Bujanover, K.C. Kain, Genetic confirmation of atovaquone-proguanil-resistant *Plasmodium falciparum* malaria acquired by a nonimmune traveler to East Africa, Clin. Infect. Dis. 37 (2003) 450-451.

[5] A. Färnert, J. Lindberg, P. Gil, G. Swedberg, Y. Berqvit, M.M. Thapar, N. Lindegardh, S. Berezcky, A. Björkman, Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria resistant to atovaquone and proguanil hydrochloride: case reports, Br. Med. J. 326 (2003) 628-629.

[6] O. Wichmann, N. Muehlberger, T. Jelinek, M. Alifrangis, G. Peyerl-Hoffmann, M. Mühlen, M.P. Grobusch, J. Gascon, A. Matteelli, H. Laferl, Z. Bisoffi, S. Ehrhardt, J. Cuadros, C. Hatz, I. Gjørup, P. McWhinney, J. Beran, S. da Cunha, M. Schulze, H. Kollaritsch, P. Kern, G. Fry, J. Richter and the European Network on Surveillance of Imported Infectious Diseases. Screening for mutations related to atovaquone/proguanil resistance in treatment failures and other imported isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe, J. Infect. Dis. 190 (2004) 1541-1546.

[7] S. Kuhn, M.J. Gill, K.C. Kain, Emergence of atovaquone-proguanil resistance during treatment of *Plasmodium falciparum* malaria acquired by a non-immune north American traveller to West Africa, Am. J. Trop. Med. Hyg. 72 (2005) 407-409.

[8] S.R. Meshnick, B. Trumpower, Multiple cytochrome *b* mutations may cause atovaquone resistance [letter], J. Infect. Dis. 191 (2005) 822.

[9] L. Musset, B. Pradines, D. Parzy, R. Durand, P. Bigot, J. Le Bras, Apparent absence of atovaquone/proguanil resistance in 477 *Plasmodium falciparum* isolates from untreated French travellers, J. Antimicrob. Chemother. 57 (2006) 110-115.

[10] S. Jafari, J. Le Bras, O. Bouchaud, R. Durand, *Plasmodium falciparum* clonal population dynamics during malaria treatment, J. Infect. Dis. 189 (2004) 195-203.

[11] Z. Hussein, J. Eaves, D.B. Hutchinson, C.J. Canfield, Population pharmacokinetics of atovaquone in patients with acute malaria caused by *Plasmodium falciparum*, Clin. Pharmacol. Ther. 61 (1997) 518-30.

[12] J.J. Kessl, H.K. Ha, A.K. Merritt, B.B. Lange, P. Hill, B. Meunier, S.R. Meshnick, B.L. Trumpower, Cytochrome *b* mutations that modify the ubiquinol binding pocket of the cytochrome bc_1 complex and confer anti-malarial drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem. 280 (2005) 17142-17148.

[13] H. Palsdottir, C.G. Lojero, B.L. Trumpower, C. Hunte, Structure of the yeast cytochrome bc_1 complex with a hydroxyquinone anion Q_0 site inhibitor bound, J. Biol. Chem. 278 (2003) 31303-31311.

[14] I.K. Srivastava, J.M. Morrisey, E. Darrouzet, F. Daldal, A.B. Vaidya, Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome *b* in malaria parasites, Mol. Microbiol. 33 (1999) 704-711.

[15] D.A. Fidock, T.E. Wellems, Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 (1997) 10931-10936.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

3.2 - Discussion

Cette étude de la résistance à l'atovaquone-proguanil *in vivo* a pu être réalisée grâce au suivi de l'efficacité des antipaludiques mis en place dans de nombreux hôpitaux partenaires du CNRP et grâce à un protocole d'étude élaboré pour évaluer la tolérance de l'atovaquone-proguanil chez le voyageur revenant d'Afrique de l'Ouest souffrant d'un accès palustre simple à *P. falciparum*. Ainsi, entre janvier 2003 et septembre 2005, 465 patients ont été traités par l'atovaquone-proguanil, 337 ont été suivis à J3, et 144 ont présenté à J28 une réponse clinique et parasitologique adéquate. Parmi ces patients, huit cas d'échec thérapeutique ont été observés. Deux cas supplémentaires nous ont été rapportés dans le cadre de notre activité de Centre National de Référence du Paludisme. Pour pouvoir identifier un marqueur génotypique de résistance fiable, nous avons tout d'abord dissocié, grâce aux dosages plasmatiques des principes actifs ou aux phénotypes de sensibilité *in vitro* à l'atovaquone, les échecs liés à une résistance parasitaire de ceux liés à une malabsorption des principes actifs.

Pour pouvoir interpréter les concentrations plasmatiques mesurées en cas d'échec thérapeutique, nous avons préalablement réalisé une série de dosages CLHP (de Angelis, 1994) sur des patients traités par atovaquone-proguanil pour connaître la dispersion des concentrations associées à des succès et des échecs thérapeutiques (Figure 17).

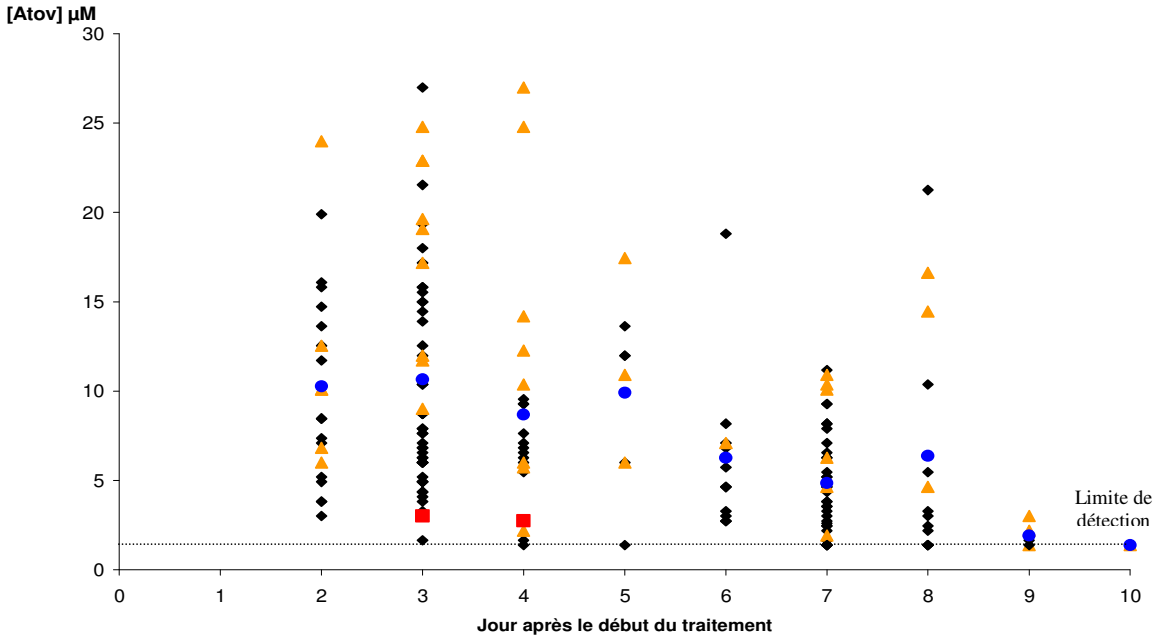


Figure 17 : Concentrations plasmatiques d'atovaquone observées chez des patients sous traitement par atovaquone-proguanil (AP) en relation avec la réponse thérapeutique observée.
◆ : réponse thérapeutique inconnue ; ▲ : réponse clinique et parasitologique adéquate 28 jours après le début du traitement ; ■ : échec thérapeutique ; ● : moyenne des concentrations plasmatiques observées.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Ces dosages ont été effectués sur des plasmas "tout venant" provenant de patients dont l'observance médicamenteuse n'a pas été vérifiée. Il est donc préférable de se baser uniquement sur les valeurs associées à une réponse thérapeutique. A J3, la concentration efficace la plus faible est de 9 µM pour une concentration moyenne de 10,7 ± 6,4 µM. Les concentrations associées à une malabsorption sont autour de 3 µM. Entre les deux, nous n'avons pas suffisament de réponses thérapeutiques associées pour évaluer si une concentration est efficace ou non. Les moyennes obtenues dans notre série sont comparables aux valeurs observées dans les études pharmacocinétiques standardisées (Hussein, 1997).

Ainsi, parmi les dix échecs identifiés, quatre étaient associés à des concentrations plasmatiques faibles des principes actifs alors que les six autres étaient associés à des dosages corrects ou à une résistance *in vitro* des parasites à l'atovaquone (CI_{50} > 1900 nM). Plus précisément, les quatre échecs survenus avant le vingtième jour après le début du traitement sont liés à une mauvaise absorption ou à une mauvaise observance du traitement alors que les six plus tardifs (> J20) sont liés à une résistance parasitaire. Cette résistance apparaît systématiquement associée à la substitution de la tyrosine 268 du cytochrome *b* par une sérine (n = 4) ou une cystéine (n = 2). Décrite chez *P. yoelii* suite à des pressions médicamenteuses, la mutation Y268C est ici observée pour la première fois *in vivo* chez *P. falciparum.* L'analyse des parasites isolés avant le traitement confirme l'observation faite lors du premier échec, la mutation 268 n'est pas observable par les techniques classiques de biologie moléculaire avant la pression médicamenteuse.

Au début de ce doctorat, un seul échec thérapeutique associé à la mutation Y268S avait été publié. A partir de 2002, l'augmentation de l'utilisation de l'atovaquone-proguanil par les voyageurs de nombreux pays industrialisés a été suivie par la publication de dix cas d'échecs à travers le monde (Tableau 8 ; Fivelman, 2002 ; Schwöbel, 2003 ; David, 2003 ; Färnert, 2003 ; Schwartz, 2003 ; Wichmann, 2004a et 2004b ; Kuhn, 2005). Presque tous sont des échecs thérapeutiques tardifs observés chez des voyageurs revenant d'Afrique. Sur ces dix échecs, la résistance parasitaire a été confirmée par dosage ou phénotypage pour trois d'entre eux. Aucune confirmation de la résistance parasitaire n'est apportée pour les autres. Dans six échecs, les parasites au moment de l'échec sont porteurs de la mutation Y268S (n = 5) ou Y268N (n = 1). De façon assez surprenante, aucune mutation de *pfcytb* n'a été identifiée dans les quatre autres cas. Compte-tenu de la fréquence des malabsorptions avec cette association, certains de ces échecs sont probablement associés à une faible concentration plasmatique d'atovaquone-proguanil sans résistance parasitaire associée ce qui permettrait d'expliquer l'absence de mutation au niveau de *pfcytb*.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Tableau 8 : Données sur les échecs thérapeutiques à l'atovaquone-proguanil publiés avant mai 2006.

		Fivelman 2002	Schwöbel 2003	David 2003	Färnert 2003	Schwartz 2003	Wichmann 2004a	Wichmann 2004b			Kuhn 2005
Sexe		Homme	Homme	Homme	Homme	Femme	Femme	Homme	Homme	Homme	Femme
Age		45 ans	28 ans	28 ans	4 ans	24 ans	38 ans	30 ans	33 ans	56 ans	25 ans
Pays de résidence		Royaume-Uni	Allemagne	Danemark	Suède	Canada	Allemagne	Allemagne	Allemagne	Espagne	Canada
Pays d'infestation		Nigeria	Mali	Cameroun	Côte d'ivoire	Kenya	Congo	Gambie	Kenya	Nigeria	Sierra Leone
Parasitémie à J0		1,5%	ND	1%	0,5%	3%	0,1%	3%	positif	positif	Positif
Posologie atovaquone-proguanil		4cp/j 3 jours	4cp/j 3 jours	4cp/j 3 jours 2 traitements	1cp/j 3 jours	4cp/j 3 jours	4cp/j 3 jours	4cp/j 3 jours	4cp/j 3 jours	4cp/j 3 jours	2cp 2 fois/j 3 jours (2 fois)
Délai d'apparition de l'échec en jour		28	28	1er échec : 21 2ème échec : 13	28	30	16	21	21	3	1er échec : 19 2ème échec : 15
Parasitémie à l'échec		1%	1,5%	2,5%	1,6%	Positif	0,01%	Positif	Positif	Positif	ND
2ème traitement		Quinine-doxycycline	Coartéméther	Méfloquine	Méfloquine	Quinine-doxycycline	Coartéméther	Méfloquine	Coartéméther	Coartéméther	Quinine-doxycycline
Confirmation de l'échec		ND	ND	*pfmsp1*	ND	*pfmsp1*	ND	ND	ND	ND	*pfmsp1*
Confirmation de la résistance		CI_{50} atov 1888 nM			Dosages atov. corrects		J2 correct, atov. : 47µM				
Génotype *pfcytb*	**Avant échec**	ND	ND	**Y268S**	**Y268S**	**Aucune**	Aucune	ND	ND	ND	**Aucune**
	Après échec	**Y268N**	**Y268S**	**Y268S**	**Y268S**	**Y268S**	Aucune	Aucune	Aucune	Aucune	**Y268S**
Génotype *pfdhfr-ts*	**Avant échec**	ND	ND	Triple mutant	Sauvage	Triple mutant	ND	ND	ND	ND	Double mutant
	Après échec	ND	ND	Triple mutant	Triple mutant	Triple mutant	ND	ND	ND	ND	Double mutant
Nom isolat		NGATV01	TN352	JC-MAAS1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND : non déterminé ; *pfmsp1* : gène codant une protéine de surface du mérozoïte utilisée pour discriminer les échecs thérapeutiques d'une réinfection en zone de transmission du paludisme ; *pfcytb* : gène codant le cytochrome *b* ; *pfdhfr-ts* : gène codant la dihydrofolate réductase-thymidylate synthase ; Y : tyrosine ; S : sérine ; N : asparagine.

Ainsi, nous avons confirmé que les mutations du codon 268 du gène *pfcytb* sont sélectionnées au cours du traitement par l'atovaquone-proguanil, suggérant qu'elles sont les déterminants de la résistance. Ces mutations impliquent toujours le codon 268 du cytochrome *b* mais de différentes manières puisque l'on peut retrouver trois types de mutations, Y268S, Y268C et Y268N. Un cas avéré de résistance parasitaire reste cependant publié sans aucun polymorphisme associé au niveau de *pfcytb* (Wichmann, 2004a). De ce fait, on ne peut donc pas exclure la présence d'un autre mécanisme de résistance. Ainsi, l'amplification génique de *pfcytb* a été évaluée en quantifiant le nombre moyen de copies du gène présent chez des parasites sensibles ou résistants. Cette section a donné lieu à la rédaction d'une publication qui est présentée dans le paragraphe suivant.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

4. Evaluation du nombre de copies du gène cytochrome *b* de *P. falciparum*

4.1 - Article 3 (en préparation)

Absence of increase *pfcytb* gene copy number in *Plasmodium falciparum* resistant to atovaquone-proguanil

Short communication

Lise Musset[1,2], Béatrice Parfait[3], Christophe Delaunay[2], Jacques Le Bras[1,2]

[1]Laboratoire de Biologie Animale et Parasitaire, Université Paris Descartes, Paris, [2]Centre National de Référence pour la Chimiosensibilité du Paludisme, APHP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, [3]INSERM U475, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Paris, France.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

INTRODUCTION

P. falciparum treatment and prophylaxis is largely based on antimalarial drugs but continuous resistance emergence caused an increase of malaria morbidity and mortality (Trape, 2001). Drug resistance mechanisms of *P. falciparum* yet identified are associated with various modifications (single nucleotide polymorphism (SNP) or gene amplification) of the gene coding the protein target or a membrane transporter (Anderson & Roper, 2005). Since atovaquone-proguanil (AP) has expanded the range of antimalarial drugs used against *P. falciparum*, parasite resistance has emerged and involves mutations in codon 268 of the mitochondrial cytochrome *b* gene (*pfcytb*) (Korsinczky, 2000). The objective of this study is to determine the copy number of *pfcytb* present per parasite in relation to AP treatment response in order to clarify a potential implication of *pfcytb* amplification as associated or compensatory mechanism of AP resistance.

MATERIALS AND METHODS

P. falciparum isolates. Quantification of *pfcytb* copy number was realised on isolates from travellers returning from West Africa presenting an uncomplicated *P. falciparum* infection treated with AP. Sixty seven isolates were analysed. Fourty seven samples isolated before treatment were associated with AP treatment success on day twenty eight. Thirteen samples were associated with AP resistance (defined by *in vitro* phenotyping or blood drug dosage). Among these, eight isolates were isolated on the day of parasite recrudescence (*PfCYTb* Y268S or Y268C) and five of the eight corresponding samples isolated before treatment (*pfcytb* wild type). Seven isolates were associated with AP treatment failure but were AP susceptible and *pfcytb* wild-type as failures were due to bad compliance or poor absorption (defined by *in vitro* phenotyping and/or blood drug dosage). DNA was extracted from 200 µl of infected blood with the QIAamp® DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Preparation of the standards. To define the *pfcytb* gene copy number, two absolute quantifications were realized. The first one was run to determine the number of parasites genomes per sample using the single copy gene of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (*pfdhfr-ts*) and the second one was to determine the copy number of the *pfcytb* gene present in each sample. The average copy number of *pfcytb* gene per parasite for each isolate was the *pfcytb* copy number/parasite number ratio.

On the basis of the mitochondrial sequence of *P. falciparum* (GenBank accession number M99416), two different pairs of *Plasmodium* specific primers were designed. A first one to amplify an amplicon of 186 pb of *pfcytb* : sense 5'-TTGGTGCTAGAGATTATTCTGTTCC-3' ; antisense 5'-GGAGCTGTAATCATAATGTGTTCGT-3'. A second one to amplify an amplicon of 192 pb of *pfdhfr-ts* : sense 5'-ATTATTGAAGAATTGCTTTGGTTTA-3' ; antisense 5'-TGTATATTCAGCACCGAAATGTC-3'.

The resulting PCR products were cloned into pCR®4-TOPO vector using manufacturer protocol of the TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Plasmids were purified with Qiaquick® miniprep kit, (Qiagen, Courtaboeuf, France), quantified by A_{260} measurements and sequenced to control the sequence amplification. In order to refine the standard curves,

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

5-fold serial dilutions of each plasmid (from 5.10^6 copies down to 5.10^{-1} copies.μl^{-1}) were made using salmon sperm DNA solution for a final concentration of 15µg/ml. Each dilution was divided into aliquot, and stored at –80°C. Aliquots were used once to avoid plasmid denaturation after thawing.

Development of *pfcytb* gene quantitative assays. Real-time PCR reactions were performed using the FastStart DNA Master SYBR Green I in the LightCycler system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Reaction components and cycling conditions were optimised to give reliable and reproducible results. Each amplification was performed in triplicate for the sixty seven isolates, in a total volume of 20 µl containing 2 µl of master mix, 0.4 µM of each primer, 6 mM or 7 mM of $MgCl_2$ for *pfcytb* and *pfdhfr-ts* amplification, respectively, and 2 µl of DNA. The amplification program comprised 10 minutes of pre-incubation at 95°C followed by 40 cycles for 10 seconds at 95°C, 10 seconds at 65°C and 10 seconds at 72°C. The fluorescent signal produced from the amplicons was acquired at the end of each polymerisation step at 72°C. At the end of each program, melting curves were acquired and analysed to verify absence of primer dimer formation.

Reproducibility of DNA quantification. To assess intra-assay reproducibility of the methods, we tested the 10-fold differences in copy number with a broader concentration range from 5.10^6 to 5 copies (3 or 5 replicates each). To assess inter-assay reproducibility of the methods, we tested the 10-fold differences in copy number with a broader concentration range from 5.10^6 to 5 copies (6 replicates each).

Statistical analysis. Means were compared with ANOVA and variances with Fisher's test.

RESULTS

Validation of the methods. Gene copy number was evaluated with high confidence. The coefficients of variation of the intra- and inter-assays for the copy number are summarised in Table 1. The coefficients of variation (CVs) for the Ct ranged between 0.34 and 2.09%, 0.50 and 1.78% for the intra-assay of *pfdhfr-ts* and *pfcytb* methods, respectively.

Table 1. Intra- and inter-assay precision of the quantitative PCRs.

Gene	Copies	Reproducibility					
		Intra-assay			Inter-assay		
		n	% CV	Mean[a]	n	% CV	Mean[a]
pfdhfr-ts	5,000,000	5	10.5	4,660,000	6	9	5,200,000
	500,000	3	8.5	580,000	6	18	505,000
	50,000	5	26.2	55,000	6	10	51,000
	5,000	3	12.5	5,100	6	13	5,500
	500	5	7	560	6	17	486
	50	6	24	49	6	16	44
	5	5	21.5	5	6	28	6
pfcytb	5,000,000	5	7.6	6,500,000	6	10	5,400,000
	500,000	3	10	500,000	6	10	525,000
	50,000	5	9.8	48,550	6	6	53,000
	5,000	3	12.6	5,000	6	11	4,655
	500	5	11	345	6	22	439
	50	6	8	50	6	21	51
	5	5	31	16	6	20	7

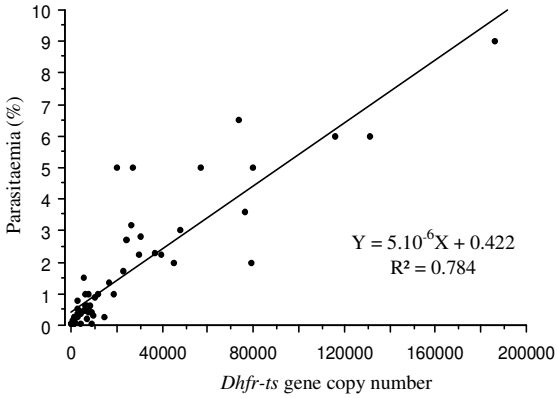
[a]Means are in copy numbers per microliter ; n = number of replicate ; CV : coefficient variation.

PCR efficiencies were 99.62 ± 1.63 % and 99.91 ± 3.24 % for *pfdhfr-ts* and *pfcytb* method, respectively. To control the efficacy of *pfdhfr-ts* method, correlation between *pfdhfr-ts* copy number and parasitaemia was studied ($r^2 = 0.784$, Figure 1).

Pfcytb copy number and *in vivo* treatment response. The average copy number of *pfcytb* gene per parasite is evaluated at 16 ± 9 ; 17 ± 9 ; 14 ± 5 and 20 ± 11 in the 47 isolates associated with AP treatment success, 8 AP resistant parasites, 5 corresponding samples isolated before treatment and 7 AP susceptible parasites associated with therapeutic failure in absence of AP resistance, respectively.

No difference was identified between the five groups (p = 0.58) indicating that *pfcytb* gene amplification is not associated with *P. falciparum* AP resistance.

Figure 1. Correlation between *dhfr-ts* gene copy number and parasitaemia.



tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

DISCUSSION

Resistance mechanisms have been partly associated with point mutations in *pfdhfr*-ts, *pfdhps* and *pfcrt* genes in antifols, sulphonamides and chloroquine resistance, respectively, while reduced susceptibility *in vitro* to mefloquine is associated with increased *pfmdr1* copy number (Anderson & Roper, 2005).

As SNP on codon 268 of the *pfcytb* gene is unambiguously implicated in atovaquone-proguanil resistance, a gene amplification should be an associated or compensatory mechanism. In the present study, no amplification was observed to be associated with AP resistance. We confirmed, with an accurate method, the average of *pfcytb* copy number per parasite to be 16, close to previous estimations (Joseph, 1989 ; Preiser, 1996). This correspond to the tandem repeats content in the mitochondrial linear genome present within the mitochondria of each parasitic cell, known to be unique (Slomianny & Prensier, 1986). *Pfcytb* copy number varies between isolates from 5 to 40 copies per parasite. As the method has strong performances at the current Ct values, these variations may depend on differences in the DNA synthesis level occurring in nuclear and mitochondrial (mt) genomes. However, parasites from our patient samples were naturally synchronous with only rings present in samples, a stage at which DNA synthesis has not began in the two genomes (Preiser, 1996). Another explanation of this variation may be related to the division mode of mitochondria. Before mitochondria division, the mitochondrial genome replicates on similar modes to phages λ and T4 (ie rolling circle process and recombination-dependent mode ; Williamson, 1996). During parasite maturation, the mitochondria elongates and becomes branched before a random way of splitting among the newly merozoites (Divo, 1985). At this step, little is known about the mechanisms implicated in the distribution of the copies of mitochondrial genome among each daughter cells. We could venture the hypothesis of a random and variable distribution of the copies which could explain the different copy number observed between isolates.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Nicaise Tuikue Ndam and Florence Damond for helpful technical support and suggestions.

REFERENCES

Anderson TJC & Roper C. 2005. The origins and spread of antimalarial drug resistance: Lessons for policy markers. *Acta Trop*, 94: 269-280.

Divo AA, Geary TG, Jensen JB, Ginsburg H. 1985. The mitochondrion of *Plasmodium falciparum* visualized by rhodamine 123 fluoresence. *J Protozool*, 32: 442-446.

Joseph JT, Aldritt SM, Unnasch T, Puijalon O, Wirth DF. 1989. Characterization of a conserved extrachromosomal element isolated from the avian malarial parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Mol Cell Biol*, 9: 3621-3529.

Preiser PR, Wilson RJM, Moore PW, McCready S, Hajibagheri MAN, Blight KJ, Strath M, Williamson DH. 1996. Recombination associated with replication of malarial mitochondrial DNA. *EMBO J*, 15: 684-693.

Slomianny C & Prensier G. 1986. Application of the serial sectionning and tridimensional reconstruction techniques to the morphological study of *Plasmodium falciparum* mitochondrion. *J Parasitol*, 72: 595-598.

Trape JF. 2001. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 64: 12-17.

Williamson DH, Preiser PR, Wilson RJM. Organelle DNAs: the bit players in malaria parasite DNA replication. *Parasitol Today*, 12: 357-362.

4.2 - Discussion

Des phénomènes d'amplification génique ayant été identifiés dans certains mécanismes de résistance aux antipaludiques (cf Situation du sujet §2.1), nous avons recherché si une éventuelle amplification génique de *pfcytb* est associée à la résistance à l'atovaquone-proguanil.

D'un point de vue technique, nous avons choisi de réaliser deux quantifications absolues plutôt que d'utiliser comme étalon interne un gène domestique de *Plasmodium* puisque notre premier objectif était avant tout de préciser le nombre de copies du génome mitochondrial présent chez *P. falciparum.* Il a donc fallu réaliser deux clonages bactériens pour obtenir deux gammes plasmidiques étalons. La première amplification a été effectuée sur le gène *pfdhfr-ts* qui est en copie unique chez le parasite, pour évaluer le nombre de génomes nucléaires et ensuite déduire le nombre de parasites présents dans chaque échantillon. Dans un deuxième temps, le résultat de l'amplification de *pfcytb*, rapporté au nombre de parasites présents dans l'isolat, nous a permis d'évaluer le nombre moyen de copies du gène *pfcytb* présent par parasite. Il s'agit d'un nombre moyen puisque nous ne travaillons pas systématiquement sur des isolats monoclonaux. On peut donc imaginer que le nombre de copies de *pfcytb* varie en fonction du clone parasitaire et peut-être de la sensibilité à l'atovaquone-proguanil des parasites. De plus, on ne peut pas exclure une variation du nombre de copies en fonction du stade de développement des parasites. Le Sybr green a été choisi comme moyen de détection compte tenu de l'utilisation très ponctuelle de cette technique. Ce marqueur fluorescent a la propriété de s'incorporer non spécifiquement à tous les doubles brins d'ADN ce qui rend les résultats parfois moins robustes qu'avec l'utilisation de sondes spécifiques. Pour nous prémunir de cela, nous avons réalisé une courbe de dénaturation à la fin de chaque manipulation pour nous assurer de la spécificité du signal.

Lors de cette étude, nous avons étudié 47 isolats associés à une réponse clinique et parasitologique adéquate, les souches de sensibilité diminuée générées par pression médicamenteuse *in vitro* (cf Résultats §2) ainsi que huit isolats résistant à l'atovaquone-proguanil issus des échecs thérapeutiques. En comparant les moyennes de chacun des groupes, aucune amplification génique n'a été observée. Le nombre moyen de copies du gène a été évalué à 15 comme précédemment décrit (Joseph, 1989 ; Preiser, 1996). Cette moyenne est cependant très variable (entre 5 et 40) en fonction des isolats. Cette importante variation peut s'expliquer : (***i***) par une dégradation des échantillons d'ADN si l'on considère que l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial ont des stabilités différentes ; (***ii***) par l'absence de synchronisme parasitaire au moment de l'extraction ou encore (***iii***) par un nombre de génomes mitochondriaux et donc de

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

pfcytb variable entre les parasites du fait de la division aléatoire de la mitochondrie lors de l'endomitose parasitaire. Pour cette dernière hypothèse, seule une compréhension plus approfondie de la biologie mitochondriale et des mécanismes de division cellulaire chez *Plasmodium* permettrait d'élucider cette question. Concernant le synchronisme des parasites, deux constatations réfutent cette hypothèse. Tout d'abord, les isolats de patients sont conservés à + 4°C avant l'extraction, ce qui permet de conserver le synchronisme naturel des isolats. De plus, s'ils se désynchronisaient, la réplication de l'ADN nucléaire et de l'ADN mitochondrial a lieu en même temps environ 18 heures après le début du cycle.

La résistance à l'atovaquone-proguanil n'est donc pas liée à une amplification génique de *pfcytb*. Après avoir observé le gène *pfcytb*, il serait intéressant de mesurer l'expression de ce gène en fonction de la présence ou non d'une mutation en position 268 pour examiner si un coût biologique associé à la mutation de résistance est compensé par une transcription plus importante du gène. Nous avons en cours un projet en ce sens qui a pour objectif d'étudier les variations d'expression génique suite à un stress généré par l'atovaquone sur des parasites sensibles ou résistants. Ce projet, en collaboration avec la génopole de l'Institut Pasteur, utilise des puces à ADN.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

5. Mécanisme d'émergence de la résistance à l'atovaquone-proguanil

L'étude de nos six isolats ainsi que d'une souche issus d'échecs thérapeutiques à l'atovaquone-proguanil montre que la position *pfcytb* 268 est strictement associée à la résistance suggérant, avec d'autres études, qu'il s'agit du déterminant moléculaire principal. Cependant, ces mutations ne sont pas identifiables dans la population parasitaire isolée avant le traitement. Pour tenter de comprendre le mode d'émergence de la résistance à l'atovaquone-proguanil, nous avons émis l'hypothèse que chacun des patients était impaludé par plusieurs clones, et que le clone résistant était tellement minoritaire avant la pression médicamenteuse liée au traitement, qu'il était indétectable par séquençage ou RFLP. Nous avons donc adapté une méthode de détection de mutation plus sensible, utilisée en cancérologie, basée sur la neutralisation de l'amplification du génotype sauvage pour favoriser l'amplification du génotype mutant (cf Annexe 3 ; Kahn, 1991). Avec une sensibilité de détection de une copie mutante parmi 1000 copies sauvages, nous n'avons pas mis en évidence le génotype mutant dans nos isolats J0. L'étude de la composition clonale des isolats par génotypage des gènes *msp* (merozoite surface protein) a montré que dans quatre cas sur cinq, le clone impliqué dans la résistance au moment de l'échec était déjà majoritairement présent au moment du diagnostic. Ceci suggérait donc que la mutation soit apparue chez le patient à partir d'une population initiale sauvage (cf Tableau 1 p81). Pour évaluer cette hypothèse, nous avons séquencé dans sa totalité le génome mitochondrial, où est localisé le gène *pfcytb*, de sept isolats résistants à l'atovaquone-proguanil et de six des sept isolats associés avant traitement. Le génome mitochondrial étant peu polymorphe et de petite taille (6 kb), cinq marqueurs microsatellites hautement polymorphes en Afrique, d'où sont originaires nos échantillons (Anderson, 1999 ; Durand, 2003), ont également été analysés. La quantité d'ADN étant limitée pour l'un de nos isolats J0, les microsatellites ont été amplifiés par une PCR multiplexée (cf Annexe 4). Nous avions également projeté d'analyser quatre mutations ponctuelles neutres (Anderson, 2005) mais leur degré de polymorphisme dans notre population de référence s'est avéré trop faible pour être exploitable.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

5.1 - Article 4 (soumis)

Within-host selection of *de novo Plasmodium falciparum* cytochrome *b* mutations during atovaquone-proguanil treatment

Lise Musset[1,2], Jacques Le Bras[1,2], and Jérôme Clain[2*].

[1]Centre National de Référence du Paludisme, AP-HP, Hôpital Bichat Claude Bernard, 46, rue Henri Huchard, 75877 Paris cedex 18 ; [2]EA 209 Transports membranaires et chimiorésistances - Université Paris Descartes, 4, av de l'Observatoire, 75006 Paris, France.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

SUMMARY

Understanding the evolution of drug resistance is an important issue for the control of *Plasmodium falciparum* malaria. Most studies have focused on the spread of resistance to massively used antimalarials. To survey the emergence of resistance to recently introduced drugs, we studied isolates from patients experiencing atovaquone-proguanil treatment failure. Mitochondrial genome sequence analysis and microsatellite markers genotyping revealed that the mitochondrial *pfcytb*268 mutation, the determinant of atovaquone-proguanil resistance, has evolved *de novo* independently within each patient and expanded clonally during treatment. Unlike presently known chloroquine and antifolates resistance alleles, atovaquone-proguanil resistance alleles have numerous multiple independent origins.

Drug resistance is a major obstacle to the control of *Plasmodium falciparum* malaria. Identification of resistance alleles to several antimalarial drugs has opened the possibility to study the evolution of adaptive mutations in nature. Earlier reports indicate that strong selection and large distance migration operate during spread of chloroquine and antifolates resistance alleles in natural parasite populations (Wootton 2002, Roper 2003, Nair 2003, Roper 2004). Very few origins of resistance alleles to these widely used antimalarial drugs were identified. To get insights into the initial step of antimalarial drug resistance evolution, appearance and selection of the resistance mechanism, it should be informative to analyze resistance to drugs recently introduced.

Atovaquone-proguanil (AP) is a fixed combination introduced for a decade for the treatment and the prophylaxis of drug-resistant *P. falciparum* malaria. Mutations on codon 268 in the cytochrome *b* gene (*pfcytb*268) of *P. falciparum* are associated with AP late therapeutic failure (LTF) (Fivelman 2002, Färnert 2003, David 2003, Schwartz 2003, Kuhn 2005, Musset 2006). As its high cost precludes a widespread use in endemic areas, AP is prescribed mostly in travellers from non endemic areas. Thus, AP resistance (APR) alleles are rare in the field (Wichmann 2004, Muehlen 2004, Basco 2003, Musset 2006) and, unlike chloroquine and antifolates resistance alleles, their transmission to a human host through a mosquito bite is expected to be very unlikely. This unusual context opens the way to survey the origine of emergence of APR alleles.

We focused on seven resistant isolates collected at the day of treatment failure (Dfail) and presenting the *pfcytb*268 mutation (Y268S n = 5 ; Y268C n = 2 ; ref methods). Six were obtained from travellers infected in West Africa and treated in France with AP, and one from a patient infected and treated in Thailand with atovaquone alone. In addition, parasites isolated before initiation of AP treatment (D0) were available in six of these failure cases. No *pfcytb*268 mutation was detected in D0 isolates by using a method that detects one APR allele in the presence of as many as 10^3 copies of the wild type sensitive allele, indicating that the APR alleles were absent or at very low frequency before treatment onset. To determine the origin(s) of these APR alleles, we first investigated the genetic diversity among Dfail isolates. We analyzed sequence variation of the mitochondrial (mt) DNA where the *pfcytb* gene is located (ref methods). A single mt genotype was observed for each isolate. Across the entire data set, eleven variable sites defined a distinct mt haplotype for each *pfcytb*268 mutated isolate (table), suggesting that APR has evolved multiple times. To examine whether these rare APR alleles were transmitted to the hosts by a mosquito bite or whether the mutational event occurred *de novo* within patients, we investigated the genetic diversity within each pair of D0 and Dfail isolates from each patient. Identical genetic background within paired isolates would indicate genetically identical infections, suggesting that the *pfcytb*268 mutation has occurred *de novo*, whereas different

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

pattern would indicate mosquito inoculation of the APR allele together with a wild one. Remarkably, with the exception of the *pfcytb268* mutation, the mt genetic background within pairs was identical, suggesting that the *pfcytb*268 mutational event has occurred after the mosquito inoculation within each patient (table). Identity of genetic background within pairs was confirmed with five highly polymorphic nuclear microsatellite markers for four patients (ref methods). D0 isolate of the other two contained more than one alleles at two different *loci*, indicating the presence of several haploid clones of *P. falciparum*. When only the predominant allele was scored, identity of the genetic background was also observed. In addition, each of the five African D0 background is unique, even among contemporary isolates originating from the same countries (table). Therefore, it is exceedingly unlikely that, on five independent occasions, a sensitive and a resistant alleles that share an identical haplotype, are transmitted by chance to the same host. Taken together, these are strong molecular evidences that the *pfcytb*268 mutation occurred *de novo* in each patient and expanded clonally during AP treatment selection. Other observations support this *scenario* (Kuhn 2005, Schwartz 2003, Looareesuwan 1996). Importantly, these emergences happened following a three days full course controlled therapy. This highlights the vulnerability of this drug combination to resistance and contrasts with the current view that misuse of antimalarial drugs -uncontrolled drug use and inadequate dosage- provides the main selective pressure driving resistance evolution. In our clinical center, our calculations predict the frequency of APR *de novo* selection to be equal to 0.67% ($IC_{95\%}$: 0.08 – 2.39%), consistent with a previous estimate (White 1999). Such therapeutic failures caused by within-host selection of *de novo* resistant pathogens during treatment were reported in bacterial and viral infections, but not in malarial infections. Indeed, for the long-time first-line drugs chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine (SP), failures occur most often by selection of a mutant parasite transmitted by a mosquito bite before or during treatment (Slater 2005).

What could explain the multiple origins of APR alleles? First, APR has a very simple genetic basis. To date, a single point mutation (SNP) on *pfcytb*268 is sufficient to confer APR to *P. falciparum*. In the field, SNPs occur frequently within a host, as multiple origins of the *PfDHFR-TS* S108N mutation, conferring tolerance to pyrimethamine, have been reported (Roper 2003). Theorically, given the number of parasites in a patient blood during a typical symptomatic infection (10^{10} to 10^{12}), and the *in vitro* prevalence of spontaneous atovaquone resistance (10^{-5} to 10^{-8} atovaquone resistant mutants per replicating parasite), around one to 10^{7} AP-resistant mutants may be present at treatment onset. Interestingly, the frequency of atovaquone resistance emergence under artifical selection is ~ one order higher than for other antimalarial drugs (Gassis 1996, Rathod 1997). The reasons for this remain unclear, as estimates of neutral mt and nuclear mutation rates are similar (Mu 2002, Joy 2003, Lynch 2006). We found no additional mutation to *pfcytb*268 in the mt genome of APR isolates, suggesting that the APR-associated mutational event did not result from a sudden increase in the mtDNA mutation rate. A simple explanation is that each parasite cell contains ~15 copies of the mt genome, increasing the chance of error in one *pfcytb* copy during the DNA replication compared to single copy nuclear *loci*. Further investigations are needed to clarify this issue and the contribution of mitochondrial basic processes in emergence of drug resistance-associated mutations should also be evaluated. Second, acquisition of compensatory mutations are believed to accompany drug resistance mutations to lower their fitness cost (Walliker, 2005). This, in turn, lowers the likelihood of drug resistance emergence (Anderson 2005). In our APR isolates, we found no evidence of specific compensatory mutation at least in the *pfcytb* gene nor in the mt genome, as five of the seven *pfcytb*268 mutations occurred on different mt haplotypes. Third, the *pfcytb*268 mutations confer a high-level of resistance to atovaquone *in vitro* and they suppress the synergic effect of proguanil (Musset 2006, Fivelman 2004). Consequently, the single mutant parasite can survive important AP plasmatic concentrations achieved in blood during treatment (Hussein 1997). Finally, AP is mostly used to treat non-immune travellers. In absence of specific immunity, a mutant parasites have higher chance to survive than in immune patients who live in endemic areas (White 2004).

Our data provide direct evidence for multiple and independent *de novo* origins of APR alleles. This pattern of evolution differs dramatically from the one observed for other antimalarial resistance alleles. Antifolates and chloroquine resistance mechanisms probably arose through a complex process involving step by step addition of several SNPs. Restricted genetic diversity was found in regions flanking the mutant versions of the genes that determine resistance to chloroquine and antifolates. This situation reflects the effect of intense purifying selection for decades and the spread of the fittest resistance alleles in populations, and a limited number of origins were inferred for these resistance alleles (Wootton 2002, Roper 2003).

Because antimalarial drug resistance evolution primarily depends on the intensity of the drug use and migration, APR spread should remain very low as long as it is not a first-line drug for uncomplicated *falciparum* malaria in endemic areas. However, in the perspective of a widespread use, AP should be combined with another antimalarial drug for which resistance is determined by a different *locus* to reduce the rate of *de novo* selection of APR alleles. Our study also suggests a strategy to estimate the rate of *de novo* origin of drug resistance before deploying a new drug in endemic areas. Surveys combining complete follow-up (at least 30 days) of infected non immune travellers and molecular analysis could be extended in clinical trials in non endemic areas. These might help to implement strategies to better manage drug resistance.

Table. Mitochondrial DNA sequence variation and microsatellite markers haplotypes for *P. falciparum* isolates derived from control patients or those experiencing atovaquone-proguanil treatment failure.

	Patient[c]	MtDNA variant positions[a]																			Microsatellite[b]				
		6804r	6807r	6809r	6879s	6899s	11603n	11507r	12692i	13716i	14019i	14616n	15175n	15317s	**4294n**	4473s	4550n	4622s	4787i	4952i	5452r	TAA87	TAA60	ARA2	PfPK2	TA81
Failures	IVC$_1$	D0	A	*	*	G	T	G	A	G	T	C	C	C	A	A	G	C	A	G	C	*	83	**89**	104	168	**178**
	IVC$_1$	D26	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**G**	.	.	.	.	.	*	83	89	104	168	178
	IVC$_2$	D0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	.	.	nd	nd	nd	nd	.	.	nd	nd	nd	nd	nd	83	77	101	171	175
	IVC$_2$	D39	.	*	*	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	**C**	.	.	.	.	T	T	83	77	101	171	175
	UPV$_1$	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	*	83	86	**110**	**174**	172
	UPV$_1$	D28	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	**C**	.	.	.	.	.	*	83	86	110	174	172
	UPV$_2$	D0	.	*	*	nd	.	nd	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	*	80	71	98	165	175
	UPV$_2$	D22	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**G**	A	.	.	.	.	*	80	71	98	165	175
	UPV$_3$	D25	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**C**	.	.	.	.	.	*	80	86	104	**162**	**166**
	GUI$_1$	D0	.	*	*	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	*	92	86	104	165	178
	GUI$_1$	D26	.	*	*	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	**C**	.	.	G	.	.	*	92	86	104	165	178
	THA$_1$	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	95	77	104	165	175
	THA$_1$	Dfail	.	*	*	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	**C**	.	.	.	.	.	*	95	77	104	165	175
Controls	IVC$_3$	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	86	89	94	162	178
	IVC$_4$	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	95	89	100	189	190
	IVC$_5$	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	**80**	**77**	100	**156**	**172**
	IVC$_6$	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	77	77	103	165	178
	IVC$_7$	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	**86**	**77**	**106**	**165**	**169**
	IVC$_8$	D0	.	*	*	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	68	77	103	186	181
	IVC$_9$	D0	.	*	*	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	**83**	80	**100**	**165**	172
	IVC$_{10}$	D0	.	*	*	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	68	77	103	186	181
	IVC$_{11}$	D0	.	*	*	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	86	83	94	165	178
	IVC$_{12}$	D0	.	*	*	.	.	.	.	C	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	*	83	77	103	171	178
	UPV$_4$	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	83	86	109	162	172
	UPV$_5$	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	95	83	103	162	178
	UPV$_6$	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	89	80	115	171	181
	UPV$_7$	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	83	89	106	162	175
	UPV$_8$	D0	.	*	*	nd	nd	nd	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	nd	nd	nd	nd	nd
	UPV$_9$	D0	.	*	*	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	101	80	103	**168**	**181**
	UPV$_{10}$	D0	.	*	*	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	89	80	97	168	184
	UPV$_{11}$	D0	.	*	*	.	.	.	.	A/G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	98	89	94	**165**	**181**
	UPV$_{12}$	D0	.	*	*	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	86	77	106	168	175
	UPV$_{13}$	D0	.	*	*	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	T	.	.	.	*	113	80	106	168	178
	GUI$_2$	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	**83**	**77**	**100**	168	**175**
	GUI$_3$	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	86	89	109	162	178
	GUI$_4$	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	92	**98**	**97**	168	**178**
	GUI$_5$	D0	.	*	*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	92	77	97	165	181
	GUI$_6$	D0	.	*	*	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	86	77	94	159	172
	GUI$_7$	D0	.	*	*	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	**89**	**80**	**94**	**168**	**163**
	GUI$_8$	D0	.	*	*	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	89	89	100	165	187
	GUI$_9$	D0	.	*	*	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	*	82	77	103	192	172
	GUI$_{10}$	D0	.	T	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	89	86	124	183	172
	GUI$_{11}$	D0	G	*	*	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	89	89	100	171	169

[a] Only variant positions are represented, position 4294 associated with atovaquone-proguanil resistance is in bold (a4294g = Y268C ; a4294c = Y268S). s: synonymous coding, n: nonsynonymous coding, r: variation in RNAr sequences, i: intergenic. Dots indicate identity with the reference sequence, asterisks: absence of insertion at these position, nd: not determined.

[b] Allele lengths (bp) are shown for five microsatellites ; number in bold is the dominant allele when more than one alleles per *loci* were identified in an isolate.

[c] Each isolate is identified by the international code of the country of infestation (IVC: Côte d'Ivoire, UPV: Burkina Faso, GUI: Guinea, THA: Thailand) and the number of day following the beginning of atovaquone-proguanil treatment (D0 were isolated before treatment). The sequence at the top is the most common one identified in African isolates (Joy 2003) and is derived from accession number AY282977.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

MATERIALS AND METHODS

Isolates sampling

Six isolates from patients in late therapeutic failures were identified in France among travellers returning from West Africa between 2003 and 2005. The six isolates from the day of failure (Dfail) are resistant to atovaquone-proguanil and present the *pfcytb*268 mutation: Y268S, n = 4 ; Y268C, n = 2. In addition, parasites isolated before initiation of AP treatment (D0) were available in five of these failure cases. Two additional strains (D0: Tm90C2a and Dfail: Tm90C2b) collected from a Thai patient experiencing AP treatment failure, kindly provided by Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4), were analysed. To evaluate the genetic diversity of isolates in the countries where patients were infected, we randomly collected ten contemporary isolates of each country of infestation : Guinea, Côte d'Ivoire, Burkina Faso.

Mitochondrial genome genotyping

Five independent amplifications were designed to amplify DNA fragments of 1.2–1.5 kb to cover the whole of the mitochondrial genome. Final concentrations of PCR reactions was 0,3µM of each primer, 4mM of $MgCl_2$ and 200µM of dNTPs added to 2µl DNA and 2.5U of *Taq* polymerase in a final volume of 25µl. Amplifications were performed with the following conditions: 95 °C for 10min, 30 cycles of 95 °C for 60 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 80 s and a final elongation step of 10 min at 72 °C. Fifty microlitres of the products were treated with Quiaquick PCR purification kit and used in sequencing reactions with Big Dye Terminator v1,1 chemistry on a ABI3130 DNA sequencer. DNA sequences were aligned with a reference sequence (Genbank accession number AY282977) which is the most common haplotype identified in African isolates (Joy 2003). All electrophoregrams were checked by eye. Each amplification was performed in duplicate and for isolates derived from late therapeutic failure, sequence variations were validated by sequencing both strands of new products from independent PCR to avoid PCR artefacts.

Microsatellite genotyping

To further explore the genetic background of each isolate, we analysed five microsatellite markers highly polymorphic in African populations distributed throughout the nuclear genome of *P. falciparum* namely, TAA87 (Chr6), TAA60 (Chr13), ARA2 (Chr11), PfPK2 (Chr12) and TAA81 (Chr5) (Anderson 2000, Durand 2003). Microsatellite loci were amplified with a multiplex strategy (table S1). Briefly, final concentrations in the buffer supplied by the manufacturer of PCR reactions were 200µM of dNTPs, 5mM of $MgCl_2$ added to 2,5U of *Taq* polymerase and 1µl of DNA. Primers concentrations were described in the table S1. Amplifications were performed with the following conditions: 95 °C for 10min, 30 cycles of 95 °C for 60 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 80 s and a final elongation step of 10 min at 72 °C. After amplification, one microlitre of the reaction mixture were analysed by electrophoresis with ROX 350 ladder on a ABI310 DNA analyser. All electrophoregrams were analysed by the software Genscan analysis. Each amplification was performed in duplicate from two DNA templates separately extracted for all isolates.
To assess the variation of the markers selected for this study, expected heterozygosity (Hz) and allelic richness were measured at each locus in ten contemporary isolates from the countries where patients were infected (table S2).

Table S1. Microsatellite loci genotyping multiplex strategy.

	Primers (5'-3')	[Primer] (pM)	Size range (bp)
TAA87	ACATGTTCATATTACTCACCA Fam-CATTCAACCACCTAACAAC	1 0.3* - 0.7	68 - 113
TAA60	GGTAAAAAAAGGAGGATAAAT Ned-AAGTAGGAACGATGTTGACAAA	7.5 3.75* - 3.75	71 - 98
ARA2	TCCGCTTTGAGTATTATTA Hex-TTAAAAACCAGAATTATCTAA	7.5 7.5*	95 - 125
PfPK2	ATTCCTTTCATCGATACTAC Hex-AAAGAAGGAACAAGCAGA	3 0.6* - 2.4	156 - 192
TAA81	CATTTCACACAACACAGGATT Fam-GAAATAAGGGAAGGTGAGGA	1 0.3* - 0.7	163 - 190

* Labelled primer.

Table S2. Patterns of diversity in the three malaria control populations.

		TAA87		TAA60		ARA2		PfPK2		TAA81	
Population	n	A	H_z	A	H_z	A	H_z	A	H_z	A	H_z
GUI	10	6	0,87	4	0,60	4	0,76	7	0,88	5	0,78
UPV	9	7	0,94	5	0,81	6	0,89	4	0,75	5	0,86
IVC	10	5	0,82	5	0,80	6	0,89	7	0,91	7	0,91
total	29	12	0,89	6	0,76	8	0,86	11	0,87	9	0,84

Number of alleles per locus (A) and expected heterozygosity (H_z) at five *loci* were calculated from thirty 'control' contemporary isolates from the countries where patients were infected. n: number of isolates ; IVC: Côte d'Ivoire ; UPV: Burkina Faso ; GUI: Guinea.

5.2 - Discussion

La diversité génétique des parasites résistants d'une part, et l'identité génétique au sein des couples de parasites isolés avant (sensibles) et après le traitement (résistants) montre que la résistance à l'atovaquone-proguanil a émergé chez chacun des patients à partir d'une population de parasites sensibles. Il aurait donc été impossible de détecter la mutation avant la pression médicamenteuse même avec une méthode d'enrichissement encore optimisée. Pour affiner la chronologie de l'émergence des mutations chez le patient, nous avons, en supplément des résultats présentés dans l'article ci-dessus, génotypé des parasites isolés à des temps intermédaires pour deux des patients en échec thérapeutique.

Tableau 9 : Fond génétique de la population parasitaire hébergée par un patient traité par atovaquone-proguanil à différents temps après l'initiation du traitement.

			Positions variables de l'ADNmt[a]						Microsatellites[b]					Génotype *pfmsp*[b]	
			8 6 7 s G	1 5 0 7 r A	**4 2 9 4 n A**	4 3 8 7 s G	4 9 5 2 i C	5 4 5 2 r *	TAA87	TAA60	ARA2	PfPK2	TAA81	*msp1*	*msp2*
	Isolats[c]														
UPV_2	D0	0,35%	nd	.	**.**	A	.	*	80	71	98	165	175	632	714
-	D3	0,002%	.	.	**.**	A	.	*	80	71	98	**165**	**175**	632	714
-	D7	Négative	.	nd	**.**	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
-	D22	0,47%	.	.	**G**	A	.	*	80	71	98	165	175	632	714
IVC_2	D0	0,15%	nd	T	**.**	.	nd	nd	83	77	101	171	175	611	682
-	D23	0,05%	T	T	**.**	nd	T	T	83	77	101	**171**	**175**	611	682
-	D31	0,008%	T	T	**C**	.	T	T	83	77	101	**171**	**175**	611	682
-	D39	0,25%	T	T	**C**	.	T	T	83	77	101	171	175	611	682

[a]Seules les positions mutantes du génome mitochondrial sont représentées. La position 4294 est associée à la résistance à l'atovaquone-proguanil en générant la mutation Y268S (a4294c) ou Y268C (a4294g). Les points indiquent l'absence de mutation et les astérisques l'absence d'insertion. s : mutations signifiantes, n : mutations non signifiantes, i : mutations intergéniques, r : mutations dans les régions codants pour des ARN ribosomaux. L'haplotype de référence est l'haplotype majoritaire dans les populations africaines (Joy, 2003). [b]La taille des allèles en paire de base est montrée pour les cinq marqueurs microsatellites ainsi que les gènes hautement polymorphes *pfmsp* (merozoite surface protein). En gras sont représentés les allèles majoritaires d'un mélange. [c]Chaque isolat est caractérisé par son pays d'origine (UPV : Burkina Faso ; IVC : Côte d'Ivoire, les numéros qui suivent sont les mêmes que ceux présents dans le manuscrit), le temps écoulé depuis le début du traitement ainsi que la parasitémie au moment du prélèvement.

L'analyse des microsatellites les plus polymorphes (ici PfPK2 et TAA81) montre que la population parasitaire détectable dans le sang périphérique évolue au fil du temps probablement au gré des séquestrations successives des différents clones dans les organes profonds (Jafari, 2004). Concernant la patiente revenant de Côte d'Ivoire (IVC_2), il est important de préciser que les parasites présents lors de la première rechute à J23 n'ont été en contact qu'avec un tiers de la

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

dose puisque la patiente n'a absorbé qu'une seule prise au lieu de trois. Ceci pourrait expliquer pourquoi à J23 la mutation 268 n'est pas détectée alors que chez l'autre patiente, elle est déjà visible à J22. Chez un patient correctement traité, on peut donc constater que le marqueur de résistance à l'atovaquone-proguanil n'existe pas ou est présent dans une proportion inférieure à 10^{-3} pendant plus de 7 jours après le début du traitement. Compte tenu du temps de multiplication de *P. falciparum* (48 heures), il fort probable que des parasites mutants soient déjà présents dans l'isolat à J7 puisqu'ils doivent avoir le temps de se multiplier suffisament pour provoquer la rechute à J22. Une de nos perspectives est de simuler la cinétique d'évolution de la mutation chez un patient à partir de l'application du traitement (J0) jusqu'à la rechute (généralement J28), à l'aide d'un modèle probabiliste.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Discussion générale - perspectives

Notre travail avait comme principal objectif de caractériser la résistance de *P. falciparum* à l'atovaquone-proguanil (AP) dans les premiers temps de son utilisation préventive et curative en France et dans le monde. Quatre objectifs ont alors été fixés : (***i***) définir la résistance *in vitro* à l'atovaquone ; (***ii***) évaluer l'association de la résistance *in vivo* à l'AP à un ou des marqueurs moléculaires ; (***iii***) identifier des mécanismes associés à la résistance et enfin (***iv***) préciser le mécanisme d'émergence-sélection-dispersion de la résistance au sein de la population parasitaire.

L'étude de la résistance à l'atovaquone *in vitro* a été abordée avant que l'association ne soit déployée en zone d'endémie ce qui nous a permis de définir le niveau de sensibilité "naturelle" des parasites. Ainsi, dans les régions étudiées d'Afrique de l'Ouest et des Comores, tous les isolats ont montré un niveau de sensibilité élevé et homogène à l'atovaquone (moyenne des CI_{50} = 2,8 ± 3,3 nM) et aucun polymorphisme n'a été identifié au niveau des sites actifs du cytochrome *b*. L'analyse des isolats issus du premier échec thérapeutique de notre série a montré que, la résistance *in vivo* est associée (***i***) à un très haut niveau de résistance *in vitro* à l'atovaquone des parasites (CI_{50} = 8230 nM) et (***ii***) à une mutation simple du cytochrome *b* : Y268S.

Pour l'atovaquone, le seuil de résistance avait été défini à 6 nM sur la base de la valeur du $90^{ème}$ percentile (Gay, 1997). Cette méthode est souvent utilisée pour définir les seuils avant l'émergence de la résistance *in vivo*. Nos valeurs de sensibilité à l'atovaquone forment deux groupes, un groupe de valeurs sensibles s'échelonnant entre 0,2 et 30 nM et un groupe de valeurs résistantes entre 2000 et 14000 nM. Les CI_{50} de l'atovaquone associées à la résistance à l'atovaquone-proguanil *in vivo* sont plus de 2000 fois supérieures à la moyenne des valeurs des isolats sensibles. La présence d'un seul changement au niveau du codon 268 du cytochrome *b* diminue la sensibilité des parasites de plus de 3 Logarithmes. Cette répartition, clairement bi-

modale, est typique des antimétabolites puisqu'un nombre limité de mutations ponctuelles suffit généralement à conférer un haut niveau de résistance. Les isolats sont soit très sensibles soit très résistants. Dans la résistance à la pyriméthamine, le seuil de résistance est évalué à 2000 nM, très peu de valeur de sensibilité sont retrouvées entre 100 et 2000 nM (Nzila-Mounda, 1998). Cet écart considérable observé entre les valeurs des isolats sensibles et résistants aux antimétabolites *in vivo* montre bien les limites de la méthode statistique du 90ème percentile. Pour éviter toute confusion, il a été envisagé de parler de seuil de diminution de la sensibilité quand il est fixé par les méthodes statistiques (Basco & Ringwald, 2000). Il faut donc utiliser le terme de seuil de résistance avec prudence pour ne le réserver qu'aux valeurs éprouvées sur une grande série de réponses cliniques associées à des échecs. Les phénotypes *in vitro* et la réponse thérapeutique au traitement sont cependant difficilement superposables puisque le modèle *in vitro* n'intègre pas le rôle de la réponse immune du patient dans l'efficacité thérapeutique. Il est donc tout à fait possible que des parasites résistants *in vitro* soient associés à une réponse clinique et parasitologique adéquate *in vivo*. En cas de mauvaise absorption ou métabolisation des principes actifs, l'inverse peut être observé, des parasites sensibles *in vitro* peuvent être associés à un échec thérapeutique. Il est donc préférable de corréler le seuil de résistance *in vitro* avec des réponses thérapeutiques obtenues chez des patients non-immuns, comme des voyageurs, chez lesquels le rôle de l'immunité sera réduit, et pour lesquels les concentrations plasmatiques sont contrôlées. Même avec un seuil bien défini, les nombreux facteurs associés font que les valeurs de CI_{50} sont peu prédictives de la réponse thérapeutique du patient. Les tests *in vitro* ont donc peu d'intérêt pour les patients, d'autant que les résultats sont généralement connus après l'initiation du traitement. Par contre, ils sont très précieux pour le suivi épidémiologique des résistances. A l'heure actuelle, les seuils de résistance à plusieurs antipaludiques majeurs (quinine, amodiaquine, artémisinine, méfloquine, luméfantrine) restent à définir. L'autre alternative pour déterminer le seuil de résistance d'un principe actif est de le corréler à la présence ou non des marqueurs génotypiques de résistance lorsque ceux-ci sont identifiés et validés.

L'étude complète des différents cas d'échecs thérapeutiques à l'atovaquone-proguanil a montré que seuls les échecs thérapeutiques les plus tardifs (> J20) sont associés à une résistance parasitaire. Les autres sont le plus souvent associés à une mauvaise absorption ou à une mauvaise observance du traitement. Dans les échecs tardifs, une mutation au niveau du codon 268 du gène du cytochrome *b* (*pfcytb*) est systématiquement retrouvée chez les parasites au moment de l'échec (Y268S, Y268C ou Y268N). Plusieurs publications évoquent l'existence probable d'un autre marqueur de résistance que *pfcytb* sur la base d'échecs thérapeutiques dont la résistance

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

parasitaire a été confirmée ou non et sans qu'aucune mutation au niveau de ce gène ne soit observée (Wichmann, 2004a ; Färnert, 2003). Au cours de ce doctorat, nous avons tenté d'identifier d'autres mécanismes de résistance et plus particulièrement la présence de mutations au niveau du gène de la dihydroorotate déshydrogénase (*pfdhod*) puisqu'une fixation directe de l'atovaquone sur cette enzyme avait été décrite chez le Rat (Hansen, 2004). Le séquençage de *pfdhod* chez les parasites issus des pressions médicamenteuses et des échecs thérapeutiques (résultats non présentés) a permis d'exclure tout lien entre la séquence de ce gène et la résistance à l'atovaquone-proguanil. L'implication d'une amplification génique de *pfcytb* comme mécanisme principal ou associé a également été évaluée par l'analyse du nombre moyen de copies du gène de la cible de l'atovaquone présent par parasite en liaison avec la réponse thérapeutique. Aucune amplification n'a été observée. Lors de l'étude du mécanisme d'action de l'atovaquone, certains auteurs ont évoqué la possible action de l'hydroxynaphtoquinone sur une l'enzyme impliquée dans une voie respiratoire alternative, l'oxydase alternative (AOX). La recherche par homologie de séquence de cette protéine dans le génome complet de 3D7 n'a pas abouti. Les données disponibles montrent que l'existence d'une résistance parasitaire à l'atovaquone suffit à entraîner une résistance à l'association (Fivelman, 2004). Plusieurs études ont cependant montré que le proguanil, et les biguanides en général, avaient une activité propre, synergique de celle de l'atovaquone, sur le potentiel de membrane mitochondrial (Jones & Ward, 2002 ; Srivastava & Vaidya, 1999). Le proguanil pourrait donc inhiber la NADH déshydrogénase plasmodiale, l'unique composant du complexe I identifié à ce jour (cf Situtation du sujet §3.3.2). Une des perspectives serait de séquencer le gène codant pour cette protéine à la recherche d'éventuelles mutations associées à la résistance. Enfin le dernier mécanisme biologique évoqué pour expliquer la résistance en l'absence de mutation au niveau de *pfcytb* serait l'existence de stades parasitaires dormants (Thapar, 2005). Cette hypothèse est née de l'observation de la survie de parasites d'une souche sensible (FCR3) après leur exposition à des concentrations d'atovaquone et de proguanil allant respectivement de 100 à 500 nM et de 10 à 50 µM durant 48 à 144 heures. Les auteurs supposent alors que certains parasites ont stoppé leur développement pendant l'action des deux principes actifs puisqu'ils ont survécu sans qu'aucune mutation de *pfcytb* n'existe. Selon les auteurs, les parasites auraient survécu grâce à l'intervention de la supposée voie de respiration alternative en relais de la voie de phosphorylation oxydative principale. Cette hypothèse est discutable puisque lors des suivis de l'efficacité de l'atovaquone-proguanil *in vivo* nous avons observé une clairance parasitaire lente. En effet, sans échec thérapeutique associé, plus de 42% des parasitémies sont positives à J3, certaines l'étant encore à J6. Le temps de latence entre l'action des principes actifs et la mort des parasites peut donc être très long. On peut supposer que

les 6 jours de pression médicamenteuse n'ont pas été suffisants pour entraîner la mort de tous les parasites et qu'un très petit nombre de survivants ont suffi à générer les recrudescences parasitaires observées entre J10 e J22.

Les seuls marqueurs de résistance à l'atovaquone-proguanil omniprésents sont donc les mutations ponctuelles du codon 268 de *pfcytb*. Située au niveau de la boucle *ef* du cytochrome, dans une région particulièrement conservée, la tyrosine 268 participe au positionnement de l'ubiquinone sur le cytochrome *b*. Chez la levure, sa substitution par une sérine ou une cystéine induit une augmentation du volume de la poche de fixation Q_0 qui provoque une diminution des interactions cytochrome/ligand (Palsdottir, 2003), ainsi qu'une incapacité du cytochrome *b* à stabiliser la protéine fer-soufre pendant le cycle Q (Mather, 2005). Au final, tous ces changements conformationnels rendent les parasites mutants totalement résistants en empêchant la fixation de l'atovaquone sur le cytochrome *b*. Les répercutions biochimiques des mutations n'ont pas encore été mesurées chez *P. falciparum* mais les nombreuses modifications structurales observées chez la levure suggèrent un lien causal entre les mutations du codon 268 et la résistance de *Plasmodium* à l'atovaquone-proguanil. La démonstration univoque de ce lien ne pourra être apportée que par la manipulation du génome de *P. falciparum*. Le remplacement, par recombinaison homologue, du gène *pfcytb* sauvage de parasites sensibles par une copie mutée au codon 268 permettrait d'évaluer directement l'effet de l'expression de cette mutation sur le phénotype de sensibilité à l'atovaquone. La transfection de *P. falciparum* est délicate mais elle est aujourd'hui maîtrisée par plusieurs laboratoires. Cependant, une telle approche est difficile du fait de la localisation mitochondriale du gène *pfcytb* et de la présence de plusieurs copies de ce gène par parasite. La transfection du génome mitochondrial est actuellement largement étudiée dans le cadre des thérapies géniques chez l'Homme pour corriger les troubles métaboliques engendrés par les dysfonctionnements mitochondriaux (D'Souza & Weissig, 2004). Plusieurs approches sont actuellement à l'étude. La première insère le gène directement dans le génome mitochondrial, c'est une thérapie génique directe. Cette approche n'est pour l'instant applicable que chez la levure ou sur des mitochondries isolées puisque le principal facteur limitant est le passage du gène à travers les différentes membranes et son adressage à la mitochondrie. Seuls des petits peptides (< 322 pb) peuvent être importés dans la matrice mitochondriale à l'aide de liposomes. La deuxième approche consiste à insérer le gène, recodé en utilisant le code génétique universel, dans le génome nucléaire en y associant une séquence signal d'adressage des protéines à la mitochondrie. Les protéines mitochondriales synthétisées au niveau nucléaire peuvent cependant s'avérer toxiques au niveau cytoplasmique et leur grande hydrophobicité entraîne

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

souvent des difficultés pour passer à travers les pores des différentes membranes. Enfin, la dernière méthode, appelée protofection, permet une altération de l'ADN mitochondrial des cellules cibles suivi d'un remplacement par le génotype voulu, ce qui permet l'expression unique du génotype étudié (Khan & Bennett, 2004). En adaptant l'une de ces techniques, la transfection de *Plasmodium* doit être possible mais sera certainement très difficile d'autant que le gène *pfcytb* est naturellement coexprimé avec le gène *pfcoxI* (Feagin, 1994). Si on veut modifier l'expression du gène *pfcytb*, on modifiera aussi celle de *pfcoxI*.

La présence de la mutation Y268S supprime totalement l'effet de l'atovaquone sur la consommation d'oxygène du parasite, sensible ou non aux cyanures (voie classique ou supposée voie alternative). Exprimée chez la levure, la mutation Y268C entraîne une diminution de la synthèse (-25%) et de l'activité du cytochrome *b* (-31%) ce qui diminue de 30% la consommation d'oxygène et de 60% les fonctions respiratoires parasitaires (Fisher, 2004 ; Kessl, 2005). Les perturbations liées à la mutation Y268S sont plus marquées avec 50% de perte d'activité du cytochrome *b*. Chez l'homme, l'activité du complexe III est évaluée à 5% en présence de la mutation Y268C, ce qui entraîne d'importants troubles métaboliques provoquant de multiples symptômes auditifs, oculaires, cognitifs qu'ainsi qu'une intolérance à l'exercice (Wibrand, 2001). A considérer tous ces résultats, il est fortement probable que la présence de mutation au niveau du codon 268 de *pfcytb* entraîne une diminution du fitness des parasites mutants. Pour compenser une diminution de fitness, certains parasites résistants acquièrent des mutations compensatrices (Walliker, 2005). Ces mutations se trouvent en général dans des régions du génome proches du gène de résistance pour qu'elles puissent rester associées à ce déterminant lors des phénomènes de recombinaison (Nair, 2003). Durant notre étude, aucune mutation de ce type n'a été identifiée dans le génome mitochondrial. Ceci n'exclut pas une acquisition ultérieure puisque plusieurs passages *in vivo* sont parfois nécessaires à cette acquisition. La perte de fitness des parasites M133I + G280D est de l'ordre de 5 à 9% comparée aux parasites sauvages mais aucune étude n'a été effectuée sur les parasites mutés en 268 (Peters, 2002). Une des perspectives de notre travail est d'évaluer la perte de fitness conférée par l'acquisition de la mutation Y268S à partir d'une paire d'isolats issue d'un échec thérapeutique avant (*pfcytb* sauvage) et après traitement (*pfcytb* Y268S ; Canfield, 1995) que nous détenons au laboratoire. L'expérience consisterait à mettre en culture un nombre identique de parasites de génotype sauvage et de parasites de génotype mutant. Toutes les 48 heures, à la fin de chaque cycle de multiplication asexuée, la proportion de chacun des génotypes serait évaluer par PCR en temps réel pour suivre le pouvoir de multiplication des parasites portant chacun un des deux génotypes et ainsi évaluer leur fitness.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

L'autre solution plus simple et moins coûteuse serait de cultiver les deux génotypes indépendamment et de comparer leur index de multiplication. Ces expériences mesureraient le fitness des parasites résistants *in vitro*. Cependant, le fitness peut varier en fonction de l'environnement dans lequel les parasites évoluent. Ainsi, les mesures de fitness qui ont été effectuées sur des toxoplasmes transfectés avec les mutations 108, 59 et 223 de *pfdhr-ts* montrent que les variations de fitness ne sont pas les mêmes *in vitro* et *in vivo* (Fohl & Roos, 2003). Certains génotypes ne se multiplient pas correctement *in vitro* alors qu'ils présentent une croissance normale chez la souris. Dans l'absolu, il faudrait donc effectuer ces mesures dans des modèles simiens.

L'étude de la diversité génétique des isolats résistant à l'atovaquone-proguanil a montré que les mutations du codon 268 observées sont le fruit d'évènements mutationnels indépendants et que ces évènements se sont produits chez chacun des patients avant ou juste après la mise en place de la thérapeutique. Depuis 2002, les nombreuses études qui se sont intéressées à l'évolution des gènes de résistance dans les populations naturelles des parasites montrent que le nombre d'événements mutationnels à l'origine de la résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine et à la chloroquine ayant un succès évolutif est limité (Roper, 2004 ; Wootton, 2002). C'est avant tout la pression médicamenteuse continue et globale qui permet la sélection puis la diffusion des parasites résistants à l'ensemble des zones d'endémie. Il s'agit d'études rétrospectives portant sur la résistance à des molécules qui ont été utilisées de façon massive comme première ligne thérapeutique pendant de nombreuses années. Les résultats observés avec l'atovaquone-proguanil sont totalement différents, puisqu'il y a pour l'instant autant de foyers d'émergence que d'échecs thérapeutiques analysés. Selon les modèles mathématiques mis en œuvre pour simuler la sélection et la dispersion des allèles de résistance dans les populations parasitaires, avant de former des foyers d'émergence détectables, les allèles de résistance circulent dans la population à bas bruit pendant de nombreuses années (Hastings & d'Alessandro, 2000). Le délai nécessaire, avant l'émergence de foyers détectables, est fonction, entre autres, de la complexité du mécanisme de résistance (nombre de mutations nécessaires), de la fréquence d'apparition des mutations dans la population parasitaire, de l'intensité de la pression médicamenteuse, de l'utilisation des principes actifs seuls ou en association, du niveau de transmission, ou encore du fitness des parasites résistants. Ces modèles peuvent difficilement être appliqués à l'atovaquone-proguanil puisqu'ils ne prennent que rarement en compte les émergences multiples *de novo*, en supposant que les mutations originelles sont trop peu nombreuses, pour n'examiner que le phénomène de sélection par la pression médicamenteuse (Hastings, 2004). De plus, la plupart

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

d'entre eux ne considèrent pas l'effet de l'association deux principes actifs. Cette étude sur la dynamique de la résistance à l'atovaquone-proguanil est exceptionnelle puisque contrairement aux autres molécules, l'émergence de la résistance est observée "en temps réel" alors même qu'aucune pression médicamenteuse n'est exercée en zone d'endémie. On peut donc se demander si dans le cas de la sulfadoxine-pyriméthamine et de la chloroquine, la situation n'était pas identique à celle de l'atovaquone-proguanil dans les tout premiers temps de l'émergence. Ce que l'on observe aujourd'hui rétrospectivement ne serait alors que le fruit d'une sélection drastique et massive des parasites résistants. Cette sélection aurait conduit à la survie des parasites de quelques uns des nombreux foyers d'émergence initiaux. La survie des parasites dépend de l'équilibre entre l'avantage sélectif en présence de principe actif et la perte de fitness apporté par la résistance. Les mutants se trouvant dans des conditions favorables auraient ainsi été favorisés, comme par exemple en Asie du Sud Est où, la pression de l'immunité des patients et la compétition entre clones sont nettement moins élevées. La multiplication des parasites survivants sélectionnés dans ces zones aurait alors permis à la résistance d'atteindre une proportion suffisante pour s'étendre à l'ensemble des zones d'endémie.

L'émergence *de novo* des mutations de résistance à l'atovaquone-proguanil est surprenante. L'apparition de mutations est considérée comme un phénomène aléatoire dépendant du taux de mutations du gène considéré, indépendamment de la pression médicamenteuse puisque les principes actifs sont considérés comme non mutagènes (White, 1998). La pression médicamenteuse a donc comme rôle unique d'offrir une niche aux parasites résistants de fitness médiocre. Rapidement après la découverte d'un nouveau principe actif, la fréquence d'acquisition des mutations de résistance est évaluée artificiellement *in vitro* où dans des modèles murins, en exposant un grand nombre de parasites à des doses sub-thérapeutiques de principe actif (Peters, 1987). Pour l'atovaquone, la fréquence de l'émergence d'une mutation est de l'ordre de 10^{-5} par nucléotide et par mitose (Gassis & Rathod, 1996). Cette valeur est nettement plus élevée que la fréquence d'émergence d'une mutation unique de *pfdhfr-ts* avec la pyriméthamine qui est comprise entre 10^{-9} et 10^{-10} (Walliker, 1975 ; Paget-McNicol & Saul, 2001) ou que la valeur généralement admise dans les différents modèles de 10^{-8} (Hastings & d'Alessandro, 2000). Cette fréquence élevée pourrait s'expliquer par la localisation mitochondriale des mutations. Chez les mammifères, le taux de mutation au niveau du génome mitochondrial est 10 à 30 fois plus important qu'au niveau nucléaire du fait de la production massive de radicaux oxygénés par la mitochondrie, du caractère multicopie du génome et de l'absence de système efficace de réparation de l'ADN (Lynch, 2006). Chez *Plasmodium*, comme chez la levure, la tendance est

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

inversée, le génome mitochondrial serait moins variable que le génome nucléaire (rapport de 0,42). Ce chiffre est confirmé par le haut degré de conservation de ce génome à travers les différentes espèces plasmodiales (> 90%). De fait, la principale fonction de la mitochondrie de ces organismes microaérophiles étant la formation d'un potentiel de membrane mitochondrial et non la synthèse d'ATP (McIntosh, 1998), la production de radicaux oxygénés pourrait donc être limitée. L'atovaquone, en inhibant le transfert des électrons, augmenterait la quantité de radicaux oxygénés et entraînerait ainsi de nombreuses mutations à travers tout le génome mitochondrial, voir nucléaire (Srivastava, 1999). Les séquences analysées lors de notre étude ne montrent cependant aucune accumulation de mutations aux côtés de la position 268.

La présence d'une quinzaine de copies du génome mitochondrial par parasite pourrait aussi majorer la fréquence d'émergence de la mutation en augmentant la probabilité d'apparition d'une mutation à une position donnée. Lors de nos pressions médicamenteuses, des mélanges de génotypes ont été observés aux différentes étapes de la pression médicamenteuse. Le clonage parasitaire nous a permis d'individualiser plusieurs clones parasitaires génétiquement distincts. Cependant, au sein d'un même clone et sûrement d'un même parasite, l'homoplasmie des différentes copies du génome mitochondrial semble être la règle. Chez l'homme, il existe de nombreux cas d'hétéroplasmie du génome mitochondrial qui entraîne, selon la proportion de mutants, des pathologies plus ou moins sévères (Wibrand, 2001). Selon certains auteurs, il existerait, chez les Eucaryotes inférieurs, un système de réparation de l'ADN qui permettrait d'inclure ou d'exclure rapidement une mutation si elle est avantageuse pour la survie du parasite (Birky & Skavaril, 1976). Dans nos observations, au bout de deux à trois semaines, le génotype mutant en position 268 est le seul détecté. Une de nos perspectives est de simuler la cinétique d'évolution de la mutation chez un patient à partir de l'application du traitement (J0) jusqu'à la rechute (généralement J28), à l'aide d'un modèle probabiliste impliquant différents facteurs. Certains d'entre eux sont déjà connus, comme le taux de mutation (estimé à partir de la fréquence d'émergence du mécanisme de résistance à l'atovaquone *in vitro* : 10^{-5} à 10^{-6}), le nombre de générations entre J0 et J28 (14 générations), la règle de mortalité "naturelle" des parasites chez le patient du fait de l'immunité, entre autres, (22/32 mérozoïtes par génération) et la durée d'action du traitement (la totalité des 28 jours). Au sein d'un parasite comportant la mutation, le nombre de copies mutées sera fixé à un parmi les quinze copies. Pour d'autres paramètres, le modèle sera mis en œuvre en faisant fluctuer certaines variables ; par exemple, pour le nombre de parasites mutés initiaux, les valeurs testées pourraient être 1, 10 et 100, et pour le nombre de copies du gène par parasite, 5, 15 et 50. Enfin, deux points importants sont encore à discuter pour l'élaboration du modèle. D'une part le mécanisme de division de l'ADN mitochondrial (plusieurs

hypothèses existent dans la littérature), dont dépend directement la distribution de la mutation au sein des parasites à chaque génération. D'autre part, la modalité d'action du traitement : les parasites sont-ils éliminés à chaque division parasitaire ou à chaque réplication d'ADN? La probabilité de survie des parasites en présence du traitement dépend-elle plutôt du nombre ou plutôt du pourcentage de copies mutées ? Cette dépendance est-elle de type linéaire ? Si non, présente-t-elle un plateau (i.e. existe-t-il un pourcentage de copies mutées au-delà duquel la résistance au traitement est de 100%)? Ce modèle est actuellement développé en collaboration avec Gilles Cottrell, biostatisticien. L'autre possibilité serait de suivre de façon rapprochée la propagation d'une copie mutante à l'ensemble du génome *in vivo*. Techniquement, il faudrait utiliser une PCR en temps réel spécifique des génotypes sauvages et mutants. Concrètement, il faudrait suivre de trop nombreux patients pour espérer en identifier un qui hébergerait des parasites en mutation. Il faudrait également que ce patient ne soit infecté que par un seul clone pour que le nombre de copies de *pfcytb* soit fixe. Dans un modèle *vitro*, ce type de manipulation est impossible puisque la mutation en position 268 y est très rarement observable. Pour évaluer le potentiel mutagène de l'atovaquone, la dernière solution serait d'effectuer un test de mutagénèse chez la levure ou chez *Plasmodium* qui permettrait d'évaluer l'effet de l'atovaquone sur l'expression des gènes de réparation de l'ADN. Cette analyse nécessiterait au préalable d'identifier et de caractériser sur le plan fonctionnel les différents systèmes de réparation de l'ADN chez *P. falciparum*.

L'atovaquone-proguanil est une association commercialisée depuis la fin des années 90 mais dont l'usage, du fait de son coût, est limité aux voyageurs des pays industrialisés. En zone d'endémie, la pression médicamenteuse est totalement inexistante depuis que les programmes de donations initialement prévus par la firme n'ont pas abouti (Shretta, 2000). On se trouve donc dans des conditions uniques pour étudier l'émergence de la résistance à un antimétabolite. Les résultats obtenus pendant ce doctorat mettent en lumière les faiblesses de l'association atovaquone-proguanil pour laquelle plusieurs émergences indépendantes de la résistance ont été identifiées dès le début de son usage thérapeutique. Cependant, l'atovaquone-proguanil reste une association d'antipaludiques très intéressante pour le traitement des voyageurs puisqu'elle est très bien tolérée et très efficace (moins de 0,08% d'échecs thérapeutiques liés à une résistance parasitaire). Lorsqu'un suivi thérapeutique de l'efficacité est mis en place, celui-ci doit être d'au moins de 28 jours pour pouvoir détecter les échecs thérapeutiques liés à une résistance parasitaire. Le risque actuel de dispersion de la résistance est quasiment nul puisque la plupart des résistances émergent chez des patients traités dans des régions où la transmission est nulle.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Par contre, si un jour cette association est déployée massivement en zone d'endémie, il sera indispensable de la combiner avec d'autres molécules.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Références bibliographiques

Aikawa M. **1971**. Parasitological review. *Plasmodium* : the fine structure of malarial parasites. *Exp Parasitol*, 30: 284-320.

Aldritt SM, Joseph JT, Wirth DF. **1989**. Sequence identification of cytochrome *b* in *Plasmodium gallinaceum*. *Mol Cell Biol*, 9: 3614-3620.

Anabwani G, Canfield CJ, Hutchinson DB. **1999**. Combination atovaquone and proguanil hydrochloride *vs.* halofantrine for treatment of acute *Plasmodium falciparum* malaria in children. *Pediatr Infect Dis J*, 18: 456-461.

Andersag H, Breitner S, Jung H. **1934**. Quinoline compound and process making the same. US patent n°2233970.

Anderson TC, Nair S, Sudimack D, Williams JT, Mayxay M, Newton PN, Guthmann JP, Smithuis FM, Tinh Hien T, van den Broek IV, White NJ, Nosten F. **2005**. Geographical distribution of selected and putatively neutral SNPs in Southeast Asian malaria parasites. *Mol Biol Evol*, 22: 2362-2374.

Anderson TC, Haubold B, Williams JT, Estrada-Franco JG, Richardson L, Mollinedo R, Bockarie M, Mokili J, Mharakurwa S, French N, Whitworth J, Velez ID, Brockman AH, Nosten F, Ferreira MU, Dy KP. **2000**. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*, 17: 1467-1482.

Anderson TC, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP. **1999**. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology*, 119: 113-125.

Asai T, Bates DB, Kogoma T. **1994**. DNA replication triggered by double-stranded breaks in *E. coli* : dependence on homologous recombination functions. *Cell*, 78: 1051-1061.

Attaran A, Barns KI, Curtis C, d'Alessandro U, Fanello CI, Galinski MR, Kokwaro G, Looareesuwan S, Makanga M, Mutabingwa TK, Talisuna A, Trape JF, Watkins WM. **2004**. WHO, the Gobal Fund, and medical malpractice in malaria treatment. *Lancet*, 363: 237-240.

Ayala FJ & **Rich SM**. **2000**. Genetic variation and the recent worldwide expansion of *Plasmodium falciparum*. *Gene*, 261: 161-170.

Babiker HA, Pringle SJ, Abdel-Muhsin A, Mackinnon M, Hunt P, Walliker D. **2001**. High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *pfcrt* and the multidrug resistance gene *pfmdr1*. *J Infect Dis*, 183: 1535-1538.

Ball EG, Anfinsen CB, Cooper O. **1947**. The inhibitory action of naphtoquinones on respiratory processes. *J Biol Chem*, 168: 257-270.

Basco LK. **2003**. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XVII. Baseline monitoring of atovaquone-resistant *Plasmodium falciparum* by *in vitro* drug assays and cytochrome *b* gene sequence analysis. *Am J Trop Med Hyg*, 69: 179-183.

Basco LK & **Ringwald P**. **2000**. Chimiorésistance du paludisme : problèmes de la définition et de l'approche technique. *Santé*, 10: 47-50.

Basco LK, Ramiliarisoa O, Le Bras J. **1995**. *In vitro* activity of atovaquone against the African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, 53: 388-391.

Basselin M, Hunt SM, Abdala-Valencia H, Kaneshiro ES. **2005**. Ubiquinone synthesis in mitochondrial and microsomal subcellular fractions of *Pneumocystis spp*.: differential sensitivities to atovaquone. *Eukaryot Cell*, 4: 1483-1492.

Beerahee M. **1999**. Clinical pharmacology of atovaquone and proguanil hydrochloride. *J Travel Med*, 6: S13-S17.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Bennett LL Jr, Smithers D, Rose LM, Adamson DJ, Thomas HJ. **1979**. Inhibition of synthesis of pyrimidine nucleotides by 2-hydroxy-3-(3,3-dichloroallyl)-1,4-naphtoquinone. *Cancer Res*, 39: 4868-4874.

Berberian DA, Slighter RG, Freele HW. **1968**. Causal prophylactic activity of Menoctone (a new hydroxynaphtoquinone) against sporozoite-induced *Plasmodium berghei* infection in mice. *J Parasitol*, 54: 1181-1189.

Biagini GA, Viriyavejakul P, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA. **2006**. Functional characterization and target validation of alternative complex I of *Plasmodium falciparum* mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 1841-1851.

Birky CW & **Skavaril RV**. **1976**. Maintenance of genetic homogeneity in systems with multiple genomes. *Genet Res Camb*, 27: 249-265.

Black RH, Canfield CJ, Clyde DF, Peters W, Wernsdorfer WH. **1981**. Chemotherapy of malaria. Second edition, 3: 73-75. *Geneva* : *Bruce-Chwatt World and Health Organization* monograph series.

Blanchard TJ, Mabey DC, Hunt-Cooke A, Edwards G, Hutchinson DB, Benjamin S, Chiodini PL. **1994**. Multiresistant *falciparum* malaria cured using atovaquone and proguanil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88: 693.

Boehm P, Cooper K, Hudson AT, Elphick JP, McHardy N. **1981**. *In vitro* activity of 2-alkyl-3-hydroxy-1,4-naphtoquinones against *Theileria parva*. *J Med Chem*, 24: 295-299.

Borrmann SN, Faucher JF, Bagaphou T, Missinou MA, Binder RK, Pabisch S, Rezbach P, Matsiegui PB, Lell B, Miller G, Kremsner PG. **2003**. Atovaquone and proguanil versus amodiaquine for the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in African infants and young children. *Clin Infect Dis*, 37: 1441-1447.

Bouchaud O, Monlun E, Muanza K, Fontanet A, Scott T, Goetschel A, Chulay JD, Le Bras J, Danis M, Le Bras M, Coulaud JP, Gentilini M. **2000**. Atovaquone plus proguanil versus halofantrine for the treatment of imported acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in non-immune adults: a randomized comparative trial. *Am J Trop Med Hyg*, 63: 274-279.

Brasseur G, Saribas AS, Daldal F. **1996**. A compilation of mutations located in the cytochrome *b* subunit of the bacterial and mitochondrial bc_1 complex. *Biochim Biophys Acta*, 1275: 61-69.

Bray PG, Martin RE, Tilley L, Ward SA, Kirk K, Fidock DA. **2005**. Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. *Mol Microbiol*, 56: 323-33.

Bray PG, Mungthin M, Ridley RG, Ward SA. **1998**. Access to hematin: the basis of chloroquine resistance. *Mol Pharmacol*, 54: 170-179.

Brockman A, Price RN, van Vugt M, Heppner DG, Walsh D, Sookto P, Wimonwattrawatee T, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F. **2000**. *Plasmodium falciparum* antimalarial drug susceptibility on the north-western border of Thailand during five years of extensive use of artesunate-mefloquine. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94: 537-544.

Bustos DG, Canfield CJ, Canete-Miguel E, Hutchinson DB. **1999**. Atovaquone-proguanil compared with chloroquine and chloroquine-suladoxine-pyrimethamine for treatment of acute *Plasmodium falciparum* malaria in Philippines. *J Infect Dis*, 179: 1587-1590. Commentaires dans *J Infect Dis*, 181: 405.

Butcher GA & **Sinden RE**. **2003**. Persistence of atovaquone in human sera following treatment: inhibition of *Plasmodium falciparum* development *in vivo* and *in vitro*. *Am J Trop Med Hyg*, 68: 111-114.

Canfield CJ, Pudney M, Gutteridge WE. **1995**. Interactions of atovaquone with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum in vitro*. *Exp Parasitol*, 80: 373-381.

Carrington HC, Crowther AF, Davey DG, Levi AA, Rose FL. **1951**. A metabolite of Paludrine with high antimalarial activity. *Nature*, 168: 1080.

Cerutti C Jr, Durlacher RR, de Alencar FE, Segurado AA, Pang LW. **1999**. *In vivo* efficacy of mefloquine for the treatment of *falciparum* malaria in Brazil. *J Infect Dis*, 180: 2077-2080.

Chaiyaroj SC, Buranakiti A, Angkasekwinai P, Looareesuwan S, Cowman AF. **1999**. Analysis of mefloquine resistance and amplification of *pfmdr1* in multidrug-resistant *Plasmodium falcipaum* isolates from Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 61: 780-783.

Chaudhuri M, Ajayi W, Temple S, Hill GC. **1995**. Identification and partial purification of a stage-specific 33kDa mitochondrial protein as the alternative oxidase of the *Trypanosoma brucei brucei* bloodstream trypomastigotes. *J Eukaryot Microbiol*, 42: 467-472.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Chaudhuri RN. **1948**. Treatment of malaria. *Ind Med Gazette*, 83: 225-230.

Chen N, Kyle DE, Pasay C, Fowler EV, Baker J, Peters JM, Cheng Q. **2003**. *pfcrt* allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquino-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Philippines. *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 3500-3505.

Chiodini PL, Conlon CP, Hutchinson DB, Farquhar JA, Hall AP, Peto TE, Birley H, Warrell DA. **1995**. Evaluation of atovaquone in the treatment of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *J Antimicrob Chemother*, 36: 1073-1078.

Clyde DF & **Shute GT**. **1957**. Resistance of *Plasmodium falciparum* in Tanganyika to pyrimethamine administered at weekly intervals. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 51: 505-513.

Cooper WC, Myatt AV, Hernandez T, Jeffrey GM, Coatney GR. **1953**. Studies in human malaria. XXXI. Comparison of primaquine, isopentaquine, SN-3883 and pamaquine as curative agents against Chesson strains vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 2: 949-951.

Cortese JF, Caraballo A, Contreras CE, Plowe CV. **2002**. Origin and dissemination of *Plasmodium falciparum* drug-resistance mutations in South America. *J Infect Dis*, 186: 999-1006.

Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA, Foote SJ. **1988**. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 9109-9113.

Crane FL, Sun IL, Sun EE, Morré DJ. **1977**. Alternative functions for coenzyme Q in endomembranes. In Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q, vol. 6 : 59-70. *Amsterdam, Oxford : Elsevier.*

Creasey A, Mendis K, Carlton J, Williamson D, Wilson I, Carter R. **1994**. Maternal inheritance of extrachromosomal DNA in malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 65: 95-98.

Croft SL, Hogg J, Gutteridge WE, Hudson AT, Randall AW. **1992**. The activity of hydroxynaphtoquinones against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother*, 30: 827-832.

D'Souza GG & **Weissig V**. **2004**. Approaches to mitochondrial gene therapy. *Curr Gene Ther*, 4: 317-328.

David KP, Alifrangis M, Salanti A, Vestergaard LS, Ronn A, Bygbjerg IB. **2003**. Atovaquone/proguanil resistance in Africa: a case report. *Scand J Infect Dis*, 35: 897-898.

Davies CS, Pudney M, Matthews PJ, Sinden RE. **1989**. The causal prophylactic activity of the novel hydroxynaphthoquinone 566C80 against *Plasmodium berghei* infections in rats. *Acta Leiden,* 58: 115-128.

Day DA & **Wiskich JT**. **1995**. Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. *J Bioenerg Biomemb*, 27: 379-385.

de Alencar FE, Cerutti C Jr, Durlacher RR, Boulos M, Alves FP, Milhous W, Pang LW. **1997**. Atovaquone and proguanil for the treatment of malaria in Brazil. *J Infect Dis*, 175: 1544-1547.

de Angelis DV, Long JD, Kanics LL, Woolley JL. **1994**. High-performance liquid chromatographic assay for the measurement of atovaquone in plasma. *J Chromatogr B*, 652: 211-219.

Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. **1979**. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother*, 16: 710-718.

Divo AA, Geary TG, Jensen JB, Ginsburg H. **1985**. The mitochondrion of *Plasmodium falciparum* visualized by rhodamine 123 fluorescence. *J Protozool*, 32: 442-446.

Dorn A, Vippagunta SR, Matile H, Jaquet C, Vennerstrom JL, Ridley RG. **1998**. An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. *Biochem Parasitol*, 55: 727-736.

Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF. **1998**. Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, 148: 1667-1686.

Druilhe P, Mazier D, Brandicourt O, Gentilini M. **1983**. One-step *Plasmodium falciparum* cultivation-application to *in vitro* drugs testing. *Tropenmed Parasitol*, 34: 233-234.

Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. **2000**. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasitol*, 108: 13-23.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Durand P, Michalakis S, Cestier S, Oury M, Leclerc MC, Tibayrenc M, Renaud F. **2003**. Significant linkage disequilibrium and high genetic diversity in a population of *Plasmodium falciparum* from an area (Republic of the Congo) highly endemic for malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 68: 345-349.

Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S. **2003**. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 424: 957-961.

Edstein MD, Kotecka BM, Anderson KL, Pombo DJ, Kyle DE, Rieckmann KH, Good MF. **2005**. Lenghty antimalarial activity of atovaquone in human plasma following atovaquone-proguanil administration. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 4421-4422.

Edstein MD, Yeo AE, Kyle DE, Looareesuwan S, Wilairatana P, Rieckmann KH. **1996**. Proguanil polymorphism does not affect the antimalarial activity of proguanil combined with atovaquone *in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90: 418-421.

El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X. **2000**. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*, 275: 223-228.

Enosse S, Butcher GA, Margos G, Mendoza J, Sinden RE, Høgh B. **2000**. The mosquito transmission of malaria: the effects of atovaquone-proguanil (Malarone^{TM}) and chloroquine. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94: 77-82.

Ernster L & **Forsmark-Andree P**. **1993**. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin Invest*, 71: S60-S65.

Escalante AA, Freeland DE, Collins WE, Lal AA. **1998**. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome *b* from the linear mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 : 8124-8129.

Fairley NH. **1946**. Researches on Paludrine (M 4888) in Malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 40 : 105-161.

Färnert A, Lindberg J, Gil P, Swedberg G, Berqvit Y, Thapar MM, Lindegardh N, Berezcky S, Björkman A. **2003**. Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria resistant to atovaquone and proguanil hydrochloride : case reports. *Brit Med J*, 326: 628-629.

Faucher JF, Binder R, Missinou MA, Matsiegui PB, Gruss H, Neubauer R, Lell B, Que JU, Miller GB, Kremsner PG. **2002**. Efficacy of atovaquone/proguanil for malaria prophylaxis in children and its effect on the immunogenicity of live oral thyphoid and cholera vaccines. *Clin Infect Dis*, 35: 1147-1154.

Fawaz G & **Haddad FS**. **1951**. The effect of lapinone (M-2350) on *P. vivax* infection in man. *Am J Trop Med Hyg*, 31: 569-571.

Feagin JE. **2000**. Mitochondrial genome diversity in parasites. *Int J Parasitol*, 30: 371-390.

Feagin JE & **Drew ME**. **1995**. *Plasmodium falciparum* : alterations in organelle transcript abundance during the erythrocytic cycle. *Exp Parasitol*, 80: 430-440.

Feagin JE. **1994**. The extrachromosomal DNAs of Apicomplexan parasites. *Annu Rev Microbiol*, 48: 81-104.

Feagin JE. **1992**. The 6-kb element of *Plasmodium falciparum* encodes mitochondrial cytochrome genes. *Mol Biochem Parasitol*, 52: 145-148.

Ferdig MT & **Su XZ**. **2000**. Microsatellite markers and genetic mapping in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*, 16: 307-312.

Ferone R, Burchall JJ, Hitchings GH. **1969**. *Plasmodium berghei* dihydrofolate reductase. Isolation, properties and inhibition by antifolates. *Mol Pharmacol*, 5: 49-59.

Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu ABS, Naude B, Deitsch K, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE. **2000**. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*, 6: 861-71.

Fidock DA & **Wellems TE**. **1997**. Transformation with human dihydrofolate reductase renders malaria parasites insensitive to WR99210 but does not affect the intrinsic activity of proguanil. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 10931-10936.

Field JW & **Edeson JF**. **1949**. Paludrine-resistant *falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 43: 233-236.

Fieser LF, Schirmer JP, Archer S, Lorenz RR, Pfaffenbach PI. **1967**. Naphtoquinone antimalarials. XXIX. 2-hydroxy-3-(omega-cyclohexylalkyl)-1,4-naphtoquinones. *J Med Chem*, 10: 513-517.

Fieser LF, Chang FC, Dauben WG, Heidelberger C, Heymann H, Seligman AM. **1948**. Naphtoquinones antimalarials. XVIII. Metabolic oxidation products. *J Pharmacol Exp Ther*, 94: 85-96.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Fisher N, Castleden CK, Bourges I, Brasseur G, Dujardin G, Meunier B. **2004**. Human disease-related mutations in cytochrome *b* studies in yeast. *J Biol Chem*, 279: 12951-12958.

Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC. **2004**. Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 4097-4102.

Fivelman QL, Butcher GA, Adagu IS, Warhurst DC, Pasvol G. **2002**. Malarone treatment failure and *in vitro* confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malaria J*, 1: 1. Disponible sur : http://www.malariajournal.com/content/1/1/1 (dernière accession le 8 février 2006).

Fleck SL, Pudney M, Sinden RE. **1996**. The effect of atovaquone (566C80) on the maturation and viability of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90: 309-312.

Fohl LM & **Roos DS**. **2003**. Fitness effects of DHFR-TS mutations associated with pyrimethamine resistance in apicomplexan parasites. *Mol Microbiol*, 50: 1319-1327.

Fontanet AL, Johnston DB, Walker AM, Rooney W, Thimasarn K, Sturchler D, McDonald M, Hours M, Wirth DF. **1993**. High prevalence of mefloquine-resistant *falciparum* malaria in Eastern Thailand. *Bull WHO*, 71: 377-383.

Foote SJ, Galatis D, Cowman AF. **1990**. Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 3014-3017.

Fowler RE, Sinden RE, Pudney M. **1995**. Inhibitory activity of the anti-malarial atovaquone (566C80) against ookinetes, oocysts, and sporozoites of *Plasmodium berghei*. *J Parasitol*, 81: 452-458.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W. **1995**. DNA repair and mutagenesis. *Washington DC : ASM press*.

Fry M & **Pudney M**. **1992**. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl)cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem Pharmacol*, 43: 1545-1553.

Fry M & **Beesley JE**. **1991**. Mitochondria of mammalian *Plasmodium spp*. *Parasitology*, 102: 17-26.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B. **2002**. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 419: 498-511.

Gassis S & **Rathod PK**. **1996**. Frequency of drug resistance in *Plasmodium falciparum*: a nonsynergistic combination of 5-fluoroorotate and atovaquone suppresses *in vitro* resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 40: 914-919.

Gay F, Bustos D, Traore B, Jardinel C, Southammavong M, Ciceron L, Danis MM. **1997**. *In vitro* response of *Plasmodium falciparum* to atovaquone and correlation with other antimalarials: comparison between African and Asian strains. *Am J Trop Med Hyg*, 56: 315-317.

Gero AM, Brown GV, O'Sullivan WJ. **1984**. Pyrimidine *de novo* synthesis during the life cycle of the intraerythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. *J Parasitol,* 70: 536-541.

Giao PT, de Vries PJ, le Hung Q, Binh TQ, Nam NV, Kager PA. **2004**. CV8, a new combination of dihydroartemisinin, piperaquine, trimethoprim and primaquine, compared with atovaquone-proguanil against *falciparum* malaria in Vietnam. *Trop Med Int Health*, 9: 209-216.

Giao PT, de Vries PJ, Hung LQ, Binh TQ, Nam NV, Kager PA. **2003**. Atovaquone-proguanil for recrudescent *Plasmodium falciparum* in Vietnam. *Ann Trop Med Parasitol*, 97: 575-580.

Giboda M & **Denis MB**. **1988**. Response of Kampuchean strains of *Plasmodium falciparum* to antimalarials: *in-vivo* assessment of quinine and quinine plus tetracycline; multiple drug resistance *in vitro*. *J Trop Med Hyg*, 91: 205-211.

Gillotin C, Mamet JP, Veronese L. **1999**. Lack of a pharmacokinetic interaction between atovaquone and proguanil. *Eur J Clin Pharmacol*, 55: 311-315.

Golenser J, Marva E, Chevion M. **1991**. The survival of *Plasmodium* under oxidant stress. *Parasitol Today*, 6: 142-146.

Gray MW, Burger G, Lang BF. **1999**. Mitochondrial evolution. *Science*, 283: 1476-1481.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Greenwood B. **2002**. The molecular epidemiology of malaria. *Trop Med Int Health*, 7: 1012-1021.

Gutteridge WE. **1991**. 566C80, an antimalarial hydroxynaphthoquinone with broad spectrum: experimental activity against opportunistic parasitic infections of AIDS patients. *J Protozool,* 38: 141S-143S.

Gutteridge WE & **Trigg PI**. **1970**. Incorporation of radioactive precursors into DNA and RNA of *Plasmodium knwolesi in vitro*. *J Protozool*, 17: 89-96.

Hammond DJ, Burchell JR, Pudney M. **1985**. Inhibition of pyrimidine biosynthesis *de novo* in *Plasmodium falciparum* by 2-(4-t-butylcyclohexyl)-3-hydroxy-1,4-naphtoquinone *in vitro*. *Mol Biochem Parasitol*, 14: 97-109.

Hansen M, Le Nours J, Johansson E, Antal T, Ullrich A, Loffler M, Larsen S. **2004**. Inhibitor binding in a class 2 dihydroorotate dehydrogenase causes variations in the membrane-associated N-terminal domain. *Protein Sci*, 13: 1031-1042.

Harinasuta T, Suntharasamai P, Viravan C. **1965**. Chloroquine-resistant *falciparum* malaria in Thailand. *Lancet*, 2: 657-660.

Hastings IM. **2004**. The origins of antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol*, 20: 512-518.

Hastings IM, Watkins WM, White NJ. **2002**. The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination half-life. *Phil Trans R Soc Lond B*, 357: 505-519.

Hastings IM & **d'Alessandro U**. **2000**. Modelling a predictable disaster : the rise and spread of drug-resistant malaria. *Parasitol Today*, 16: 340-347.

Hay SI, Guerra CA, Snow RW. **2004**. Determination of country populations at malaria risk of different endemicities: report on agreement to perform work (APW) for WHO/Roll Back Malaria. *Oxford : Oxford university*. Disponible sur : http://rbm.who.int/partnership/wg/wg_monitoring/docs/apw_report_oxford.pdf (dernière accession le 05 mai 2006).

Hendlin D & **Cook TM**. **1960**. The reversible inhibition of succinoxidase by naphtoquinones. *Biochem Biophys Res Commun*, 2: 71-75.

Hviid L. **2005**. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in Africa. *Acta Trop*, 95: 270-275.

Høgh B, Clarke PD, Camus D, Nothdurft HD, Overbosch D, Günther M, Joubert I, Kain KC, Shaw D, Roskell NS, Chulay JD. **2000**. Atovaquone-proguanil versus chloroquine-proguanil for malaria prophylaxis in non-immune travellers: a randomised, double-blind study. *Lancet*, 356: 1888-1894.

Hooker SC & **Richardson AP**. **1948**. Naphtoquinone antimalarials. II. Correlation of structure and activity against *P. lophurae* in ducks. *J Am Chem Soc*, 70: 3156-3165.

Hudson AT, Dickins M, Ginger CD, Gutteridge WE, Holdich T, Hutchinson DB, Pudney M, Randall AW, Latter VS. **1991**. 566C80: a potent broad spectrum anti-infective agent with activity against malaria and opportunistic infections in AIDS patients. *Drugs Exp Clin Res*, 17: 427-435.

Hudson AT, Randall AW, Fry M, Ginger CD, Hill B, Latter VS, McHardy N, Williams RB. **1985**. Novel anti-malarial hydroxynaphtoquinones with potent broad spectrum anti-protozoal activity. *Parasitology*, 90: 45-55.

Hughes WT, Gray VL, Gutteridge WE, Latter VS, Pudney M. **1990**. Efficacy of a hydroxynaphtoquinone, 566C80, in experimental *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Antimicrob Agents Chemother*, 34: 225-228.

Hurwitz ES, Johnson D, Campbell CC. **1981**. Resistance of *Plasmodium falciparum* malaria to sulfadoxine-pyrimethamine ('Fansidar') in a refugee camp in Thailand. *Lancet*, 1: 1068-1070.

Hussein Z, Eaves J, Hutchinson DB, Canfield CJ. **1997**. Population pharmacokinetics of atovaquone in patients with acute malaria caused by *Plasmodium falciparum*. *Clin Pharmacol Ther*, 61: 518-530.

Ittarat I, Asawamahasakda W, Meshnick SR. **1994**. The effects of antimalarials on the *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. *Exp Parasitol*, 79: 50-56.

Jafari S, Le Bras J, Bouchaud O, Durand R. **2004**. *Plasmodium falciparum* clonal population dynamics during malaria treatment. *J Infect Dis*, 189: 195-203.

Johnson DJ, Fidock DA, Mungthin M, Lakshmanan V, Sidhu AB, Bray PG, Ward SA. **2004**. Evidence for a central role for PfCRT in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents. *Mol Cell*, 15: 867-77.

Johnson JA. **2000**. Predictability of the effects of race or ethnicity on pharmacokinetics of drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 38: 53-60.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Jones K & **Ward SA**. **2002**. Biguanide-atovaquone synergy against *Plasmodium falciparum in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46: 2700-2703.

Joseph JT, Aldritt SM, Unnasch T, Puijalon O, Wirth DF. **1989**. Characterization of a conserved extrachromosomal element iolated from the avian malarial parasite *Plasmodium gallinaceum*. *Mol Cell Biol*, 9: 3621-3629.

Joy DA, Feng X, Mu J, Furuya T, Chotivanich K, Krettli AU, Ho M, Wang A, White NJ, Suh E, Beerli P, Su XZ. **2003**. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science*, 300: 318-321.

Kahn SM, Jiang W, Culbertson TA, Weinstein IB, Williams GM, Tomita N, Ronai Z. **1991**. Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant *K-ras* genes via 'enriched' PCR amplification. *Oncogene*, 6: 1079-1083.

Kaneko A, Bergqvist Y, Takechi M, Kalkoa M, Kaneko O, Kobayakawa T, Ishizaki T, Björkman A. **1999**. Intrinsic efficacy of proguanil against *falciparum* and *vivax* malaria independent of the metabolite cycloguanil. *J Infect Dis*, 179: 974-979.

Kannan R, Kumar K, Sahal D, Kukreti S, Chauhan VS. **2005**. Reaction of artemisinin with haemoglobin: implications for antimalarial activity. *Biochem J*, 385: 409-418.

Kessl JJ, Ha KH, Merritt AK, Lange BB, Hill P, Meunier B, Meshnick SR, Trumpower BL. **2005**. Cytochrome *b* mutations that modify the ubiquinol-binding pocket of the cytochrome bc_1 complex and confer anti-malarial drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 280: 17142-17148.

Kessl JJ, Lange BB, Merbitz-Zahradnik T, Zwickers K, Hill P, Meunier B, Pálsdóttir H, Hunte C, Meshnick S, Trumpower BL. **2003**. Molecular basis for atovaquone binding to the cytochrome bc_1 complex. *J Biol Chem*, 278: 31312-31318.

Khan SM & **Bennett JP Jr**. **2004**. Development of mitochondrial gene replacement therapy. *J Bioenerg Biomembr*, 36: 387-393.

Knecht W, Henseling J, Loffler M. **2000**. Kinetics of inhibition of human and rat dihydroorotate dehydrogenase by atovaquone, lawsone derivatives, brequinar sodium and polyporic acid. *Chem Biol Interact*, 124: 61-76.

Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q. **2000**. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome *b* that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother*, 44: 2100-2108.

Kovacs JA. **1992**. Efficacy of atovaquone in treatment of toxoplasmosis in patients with AIDS. The NIAID-Clinical Center Intramural AIDS Program. *Lancet*, 340: 637-638.

Krungkrai J. **2004**. The multiple roles of the mitochondrion of the malarial parasite. *Parasitology*, 129: 511-524.

Krungkrai J, Burat D, Kudan S, Krungkrai S, Prapunwattana P. **1999**. Mitochondrial oxygen consumption in asexual and sexual blood stages of the human malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 30: 636-642.

Krungkrai J, Krungkrai SR, Suraveratum N, Prapunwattana P. **1997**. Mitochondrial ubiquinol-cytochrome *c* reductase and cytochrome *c* oxidase: chemotherapeutic targets in malarial parasites. *Biochem Mol Biol Int*, 42: 1107-1014.

Krungkrai J. **1995**. Purification, characterization and localization of mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase in *Plasmodium falciparum*, human malaria parasite. *Biochim Biophys Acta*, 1243: 351-360.

Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam AG, Wirima JJ, Kazembe PN, Djimde AA, Kouriba B, Taylor TE, Plowe CV. **2003**. Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis*, 187: 1870-1875.

Kuhn S, Gill MJ, Kain KC. **2005**. Emergence of atovaquone-proguanil resistance during treatment of *Plasmodium falciparum* malaria acquired by a non-immune north American traveller to west Africa. *Am J Trop Med* Hyg, 72: 407-409.

Lacy MD, Maguire JD, Barcus MJ, Ling J, Bangs MJ, Gramzinski R, Basri H, Sismadi P, Miller GB, Chulay JD, Fryauff DJ, Hoffman SL, Baird JK. **2002**. Atovaquone/proguanil therapy for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in Indonesians who lack clinical immunity. *Clin Infect Dis*, 35: 92-95.

Latter VS, Hudson AT, Richards WHG, Randall AW. **1984**. Improvements in or relating to antiprotozoal agents. Glaxo Wellcome, UK. European patent n° 0123293.

Le Bras J & **Deloron P**. **1983**. *In vitro* study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* : evaluation of a semi-micro test. *Am J Trop Med Hyg*, 32: 447-451.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Leclerc MC, Durand P, de Meeus T, Robert V, Renaud F. **2002**. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal, investigated from microsatellite and antigen determinant *loci*. *Microbes Infect*, 4: 685-692.

Lell B, Luckner D, Ndjave M, Scott T, Kremsner PG. **1998**. Randomised placebo-controlled study of atovaquone plus proguanil for malaria prophylaxis in children. *Lancet*, 351: 709-713.

Lim P, Chy S, Ariey F, Incardona S, Chim P, Sem R, Denis MB, Hewitt S, Hoyer S, Socheat D, Mercereau-Puijalon O, Fandeur T. **2003**. *pfcrt* polymorphism and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* strains isolated in Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 87-94.

Ling J, Baird JK, Fryauff DJ, Sismadi P, Bangs MJ, Lacy M, Barcus MJ, Gramzinski R, Maguire JD, Kumusunangsih M, Miller GB, Jones TR, Chulay JD, Hoffman SL. **2002**. Randomized, placebo-controlled trial of atovaquone/proguanil for the prevention of *Plasmodium falciparum* or *Plasmodium vivax* malaria among migrants to Papua, Indonesia. *Clin Infect Dis*, 35: 825-833.

Llanos-Cuentas A, Campos P, Clendenes M, Canfield CJ, Hutchinson DB. **2001**. Atovaquone and proguanil hydrochloride compared with chloroquine or pyrimethamine/sulfadoxine for treatment of acute *Plasmodium falciparum* malaria in Peru. *Braz J Infect Dis*, 5: 67-72.

Looareesuwan S, Wilairatana P, Chalermarut K, Rattanapong Y, Canfield CJ, Hutchinson DB. **1999**. Efficacy and safety of atovaquone/proguanil compared with mefloquine for treatment of acute *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 60: 526-532.

Looareesuwan S, Viravan C, Webster HK, Kyle DE, Hutchinson DB, Canfield CJ. **1996**. Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalarial drugs, for treatment of acute uncomplicated malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 54: 62-66.

Lusha X. **1979**. A new drug for malaria. *China Reconstr*, 28: 48-49.

Lynch M, Koskella B, Schaack S. **2006**. Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. *Science*, 311: 1727-1730.

Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, Gibbins BL, Hinrichs DJ. **1993**. Parasite lactate deshydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am J Trop Med Hyg*, 48: 739-741.

Margulis L. **1975**. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*, 29: 21-38.

Mather MW, Darrouzet E, Valkova-Valchanova M, Cooley JW, McIntosh MT, Daldal F, Vaidya AB. **2005**. Uncovering the molecular mode of action of the antimalarial drug atovaquone using a bacterial system. *J Biol Chem*, 280: 27458-27465.

McGready R, Ashley EA, Moo E, Cho T, Barends M, Hutagalung R, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F. **2005**. A randomized comparison of artesunate-atovaquone-proguanil versus quinine in treatment for uncomplicated *falciparum* malaria during pregnancy. *J Infect Dis*, 192: 846-853.

McIntosh MT, Srivastava R, Vaidya AB. **1998**. Divergent evolutionary constraints on mitochondrial and nuclear genomes of malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 95: 69-80.

McKeage K & **Scott LJ**. **2003**. Atovaquone/proguanil, a review of its use for the prophylaxis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Drugs*, 63: 597-623.

Mitchell P. **1979**. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science*, 206: 1148-1159.

Mosig G. **1998**. Recombination and recombination-dependent DNA replication in bacteriophage T4. *Annu Rev Genet*, 32: 379-413.

Muehlen M, Schreiber J, Ehrhardt S, Otchwemah R, Jelinek T, Bienzle U, Mockenhaupt FP. **2004**. Prevalence of mutations associated with resistance to atovaquone and to the antifolate effect of proguanil in *Plasmodium falciparum* isolates from northern Ghana. *Trop Med Int Health*, 9: 361-363.

Mulenga M, Sukwa TY, Canfield CJ, Hutchinson DB. **1999**. Atovaquone and proguanil versus pyrimethamine/sulfadoxine for the treatment of acute *falciparum* malaria in Zambia. *Clin Ther*, 21: 841-852.

Murphy AD & **Lang-Unnasch N**. **1999**. Alternative oxidase inhibitors potentiate the activity of atovaquone against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 651-654.

Murphy AD, Doeller JE, Hearn B, Lang-Unnasch N. **1997**. *Plasmodium falciparum*: cyanide-resistant oxygen consumption. *Exp Parasitol*, 87: 112-120.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Na-Bangchang K, Manyando C, Ruengweerayut R, Kioy D, Mulenga M, Miller GB, Konsil J. **2005**. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of atovaquone and proguanil for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in third-trimester pregnant women. *Eur J Clin Pharmacol*, 61: 573-582.

Nabarro DN & **Tayler EM**. **1998**. The "Roll Back Malaria" campaign. *Science*, 280: 2067-2068.

Nair S, Williams JT, Brockman A, Paiphun L, Mayxay M, Newton PN, Guthmann JP, Smithuis FM, Hien TT, White NJ, Nosten F, Anderson TJ. **2003**. A selective sweep driven by pyrimethamine treatment in Southeast Asian malaria parasites. *Mol Biol Evol*, 20: 1526-1536.

Naoshima-Ishibashi Y, Iwagami M, Kawazu S, Looareesuwan S, Kano S. **2005**. Analysis of cytochrome *b* mutations in *Plasmodium falciparum* isolates in Thai-Myanmar border. *Abstract* n° P18 of the 1st international conference of the journal of travel medicine, 10th-11th November 2005, London (UK).

Nasveld PE, Edstein MD, Litchener SJ, Rieckmann KH. **2000**. Comparison of the effectiveness of atovaquone/proguanil combination and doxycycline in the chemoprophylaxis of malaria in Australian Defense Force personnel. *Abstract* n°139 of the 49th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine ang Hygiene, 29th October - 2nd November 2000, Houston (USA).

Newbold CI, Boyle DB, Smith CC, Brown KN. **1982**. Stage specific protein and nucleic acid synthesis during the asexual stage of the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Mol Biochem Parasitol*, 5: 33-44.

Noedl H, Wernsdorfer WH, Miller RS, Wongsrichanalai C. **2002**. Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob Agents Chemother*, 46: 1658-1664.

Nzila-Mounda A, Mberu EK, Sibley CH, Plowe CV, Winstanley PA, Watkins WM. **1998**. Kenyan *Plasmodium falciparum* field isolates: correlation between pyrimethamine and chlorcycloguanil activity *in vitro* and point mutations in the dihydrofolate reductase domain. *Antimicrob Agents Chemother*, 42: 164-169.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). **11 mai 2006**. WHO announces pharmaceutical companies agree to stop marketing single-drug artemisinin malaria pills. *Geneva*: *World Health Organization*. Disponible sur : http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr23/en/index.html (dernière accession le 22 mai 2006).

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). **2005**. World malaria report 2005. *Geneva*: *World Health Organization*. Disponible sur : http://www.rbm.who.int/wmr2005/pdf/WMReport_lr.pdf (dernière accession le 05 mai 2006).

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). **2003a**. Africa malaria report. *Geneva*: *World Health Organization.* Disponible sur : http://rbm.who.int/amd2003/amr2003/pdf/amr2003.pdf (dernière accession le 05 mai 2006).

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). **2003b**. Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria. WHO/HTM/RBM/2003.50. *Geneva*: *World Health Organization*. Disponible sur : http://www.who.int/malaria/docs/ProtocolWHO.pdf (dernière accession le 19 janvier 2006).

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). **1979**. Comité OMS d'experts du paludisme. Dix-septième rapport. Série de Rapports techniques n°640. *Genève: Organisation Mondiale de la Santé*. Disponible sur : http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_640.pdf (dernière accession le 22 mai 2006).

Osei-Akoto A, Orton L, Owusu-Ofosi SP. **2005**. Atovaquone-proguanil for treating uncomplicated malaria. *Cochrane Database Syst Rev*, 19: CD004529.

Overbosch D, Schilthuis H, Bienzle U, Behrens RH, Kain KC, Clarke PD, Toovey S, Knobloch J, Nothdurft HD, Shaw D, Roskell NS, Chulay JD. **2001**. Atovaquone-proguanil versus mefloquine for malaria prophylaxis in nonimmune travelers: results from a randomized, double-blind study. *Clin Infect Dis*, 33: 1015-1021.

Paget-McNicol S & **Saul A**. **2001**. Mutation rates in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 122: 497-505.

Palsdottir H, Lojero CG, Trumpower BL, Hunte C. **2003**. Structure of the yeast cytochrome bc_1 complex with a hydroxyquinone anion Q_0 site inhibitor bound. *J Biol Chem*, 278: 31303-31331.

Pampana E. **1963**. A texbook of malaria eradication. *London, New York*: *Oxford Univ Press*.

Pelletier P & **Caventou J**. **1820**. Recherche chimique sur les quinquinas. *Ann Chim Phys*, 15: 289-318 et 337-367.

Peters JM, Chen N, Gatton M, Korsinczky M, Fowler EV, Manzetti S, Saul A, Cheng Q. **2002**. Mutations in cytochrome *b* resulting in atovaquone resistance are associated with loss of fitness in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46: 2435-2441.

Peters W. **1987**. Chemotherapy and drug resistance in malaria, 2nd edition. *London*: Academic Press.

Peterson DS, Milhous WK, Wellems TE. **1990**. Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA,* 87: 3018-3022.

Peterson DS, Walliker D, Wellems TE. **1988**. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 9114-9118.

Peterson E. **2003**. The safety of atovaquone/proguanil in long-term malaria prophylaxis of nonimmune adults. *J Travel Med*, 10: S13-S15.

Pfefferkorn ER, Borotz SE, Nothnagel RF. **1993**. Mutants of *Toxoplasma gondii* resistant to atovaquone (566C80) or decoquinate. *J Parasitol*, 79: 559-564.

Pimentel S, Nogueira F, Benchimol C, Quinhentos V, Bom J, Varandas L, do Rosario V, Bernardino L. **2006**. Detection of atovaquone-proguanil resistance conferring mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome *b* gene in Luandan, Angola. *Malar J*, 5: 30. Disponible sur http://www.malariajournal.com/content/5/1/30 (dernière accession le 08 avril 2006).

Porter TH & **Folkers K**. **1974**. Antimetabolites of coenzyme Q. Their potential application as antimalarials. *Angew Chem Int Ed Engl*, 13: 559-569.

Preiser PR, Wilson RJ, Moore PW, McCready S, Hajibagheri MA, Blight KJ, Strath M, Williamson DH. **1996**. Recombination associated with replication of malarial mitochondrial DNA. *EMBO J*, 15: 684-693.

Price RN, Cassar C, Brockman A, Duraisingh M, van Vugt M, White NJ, Nosten F, Krishna S. **1999**. The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the Western border of Thailand. *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 2943-2949.

Pudney M, Pearce JL, Matthews PJ, Dickens M, Doig MV. **1988**. Biological characterization of a new antimalarial hydroxynaphtoquinone 566C80. *Abstract* of the XIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, *Amsterdam, The Nederlands*, Excerpta Medica, Oxford.

Radloff PD, Philipps J, Nkeyi M, Hutchinson D, Kremsner PG. **1996**. Atovaquone and proguanil for *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*, 347: 1511-1514.

Rathod PK, McErlean T, Lee PC. **1997**. Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum. Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 9389-9393.

Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. **2000**. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 403: 906-909.

Rietz PJ, Skelton FS, Folkers K. **1967**. Occurrence of ubiquinone-8 and -9 in *Plasmodium lophurae*. *Int Z Vitaminforsch*, 37: 405-411.

Roberts H, Choo WM, Smith SC, Marzuki S, Linnane AW, Porter TH, Folkers K. **1978**. The site of inhibition of mitochondrial electron transfer by coenzyme Q analogues. *Arch Biochem Biophys*, 191: 306-315.

Rolan PE, Mercer AJ, Tate E, Benjamin I, Posner J. **1997**. Disposition of atovaquone in humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 1319-1321.

Rolan PE, Mercer AJ, Weatherley BC, Holdich T, Meire H, Peck RW, Ridout G, Posner J. **1994**. Examination of some factors responsible for a food-induced increase in absorption of atovaquone. *Br J Clin Pharmacol*, 37: 13-20.

Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, Anderson TJ. **2004**. Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science*, 305: 1124.

Roper C, Pearce R, Bredenkamp B, Gumede J, Drakeley C, Mosha F, Chandramohan D, Sharp B. **2003**. Antifolate antimalarial resistance in Southeast Africa: a population-based analysis. *Lancet*, 361: 1174-1181.

Rudzinska MA & **Trager W**. **1957**. Intracellular phagotrophy by malaria parasites : an electron microscope study of *Plasmodium lophurae*. *J Protozool*, 4: 190.

Sachs JD. **2001**. Macroeconomics and health: investing in health for economic development. Report of the Commission on Macroeconomics and Health. Geneva, World Health Organization. Disponible sur : http://www.emro.who.int/cbi/pdf/CMHReportHQ.pdf (dernière accession le 25 avril 2006).

Sabchareon A, Attanath P, Phanuaksook P, Chanthavanich P, Poonpanich Y, Mookmanee D, Chongsuphajaisiddhi T, Sdaler BM, Hussein Z, Canfield CJ, Hutchinson DB. **1998**. Efficacy and pharmacokinetics of atovaquone and

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

proguanil in children with multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 92: 201-206.

Scheibel LW, Ashton HS, Trager W. **1979**. *Plasmodium falciparum*: microaerophilic requirements in human red blood cells. *Exp Parasitol*, 47: 410-418.

Schwartz E, Bujanover S, Kain KC. **2003**. Genetic confirmation of atovaquone-proguanil-resistant *Plasmodium falciparum* malaria acquired by a nonimmune traveler to East Africa. *Clin Infect Dis*, 37: 450-451.

Schwarz E & **Neupert W**. **1994**. Mitochondrial protein import : mechanism, components and energetics. *Biochim Biophys Acta*, 1187: 270-274.

Schwöbel B, Alifrangis M, Salanti A, Jelinek T. **2003**. Different mutation patterns of atovaquone resistance to *Plasmodium falciparum in vitro* and *in vivo* : rapid detection of codon 268 polymorphisms in the cytochrome *b* as potential in vivo resistance marker. *Malar J*, 2: 5. Disponible sur http://www.malariajournal.com/content/2/1/5 (dernière accession le 21 mars 2006).

Seymour KK, Lyons SD, Phillips L, Rieckmann KH, Christopherson RI. **1994**. Cytotoxic effects of inhibitors of *de novo* pyrimidine biosynthesis upon *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry,* 33: 5268-5274.

Shanks GD, Ragama BO, Oloo AJ. **1999**. Time to reappearance of malaria parasites following various drug treatment regimens in a holoendemic area of western Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93: 304-305.

Shanks GD, Gordon DM, Klotz FW, Aleman GM, Oloo AJ, Sadie D, Scott TR. **1998**. Efficacy and safety of atovaquone/proguanil as suppressive prophylaxis for *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Infect Dis*, 27: 494-499.

Shapiro TA, Ranasinha CD, Kumar N, Barditch-Crovo P. **1999**. Prophylactic activity of atovaquone against *Plasmodium falciparum* in humans. *Am J Trop Med Hyg*, 60: 831-836.

Sherman IW. **1979**. Biochemistry of *Plasmodium*. *Microbiol Rev*, 43: 453-495.

Shretta R, Brugha R, Robb A, Snow RW. **2000**. Sustainability, affordability, and equity of corporate drug donations: the case of Malarone. *Lancet*, 355: 1718-1720.

Sidhu ABS, Verdier-Pinard D, Fidock DA. **2002**. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcrt* mutations. *Science*, 298: 210-213.

Skelton FS, Pardini RS, Heidker JC, Folkers K. **1968**. Inhibition of coenzyme Q systems by chloroquine and other antimalarials. *J Am Chem Soc*, 90: 5334-5336.

Skelton FS, Rietz PJ, Folkers K. **1970**. Coenzyme Q. CXXII. Identification of ubiquinone-8 biosynthesized by *Plasmodium knowlesi*, *P. cynomolgi*, and *P. berghei*. *J Med Chem*, 13: 602-606.

Slomianny C & **Prensier G**. **1986**. Application of the serial sectioning and tridimensional reconstruction techniques to the morphological study of *Plasmodium falciparum* mitochondrion. *J Parasitol*, 72: 595-598.

Sluse FE & **Jarmuszkiewicz W**. **1998**. Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation and role. *Braz J Med Biol Res*, 31: 733-747.

Smeijsters LJ, Zijlstra NM, de Vries E, Franssen FF, Janse CJ, Overdulve JP. **1994**. The effect of (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine on nuclear and organellar DNA synthesis in erythrocytic schizogony in malaria. *Mol Biochem Parasitol*, 67: 115-124.

Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. **2005**. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 434: 214-217.

Srivastava IK, Morrisey JM, Darrouzet E, Daldal F, Vaidya AB. **1999**. Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome *b* in malaria parasites. *Mol Microbiol*, 33: 704-711.

Srivastava IK & **Vaidya AB**. **1999**. A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 1334-1339.

Srivastava IK, Rottenberg H, Vaidya AB. **1997**. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J Biol Chem*, 272: 3961-3966.

Su XZ, Kirkman LA, Fujioka H, Wellems TE. **1997**. Complex polymorphisms in a ~330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant P. *falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell*, 91: 593-603.

Sucharit F, Tiewcharoen S, Chintana T, Suphadtanaphongs V, Sucharit S. **1985**. *In vitro* studies on the sensitivities of *Plasmodium falciparum* in Thailand to pyrimethamine and proguanil. *Ann Trop Med Parasitol*, 79: 375-377.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Sullivan DJ Jr, Matile H, Ridley RG, Goldberg DE. **1998**. A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. *J Biol Chem*, 273: 31103-31107.

Suplick K, Morrisey J, Vaidya AB. **1990**. Complex transcription from the extrachromosomal DNA encoding mitochondrial functions of *Plasmodium yoelii*. *Mol Cell Biol*, 10: 6381-6388.

Suraveratum N, Krungkrai SR, Leangaramgul P, Prapunwattana P, Krungkrai J. **2000**. Purification and characterization of *Plasmodium falciparum* succinate dehydrogenase. *Mol Biochem Parasitol*, 105: 215-222.

Sukwa TY, Mulenga M, Chisdaka N, Roskell NS, Scott TR. **1999**. A randomized, double-blind, placebo-controlled field trial to determine the efficacy and safety of Malarone® (atovaquone/proguanil) for the prophylaxis of malaria in Zambia. *Am J Trop Med Hyg*, 60: 521-525.

Suswam E, Kyle D, Lang-Unnasch N. **2001**. *Plasmodium falciparum*: the effects of atovaquone resistance on respiration. *Exp Parasitol*, 98: 180-187.

Syafruddin D, Siregar JE, Marzuki S. **1999**. Mutations in the cytochrome *b* gene of *Plasmodium berghei* conferring resistance to atovaquone. *Mol Biochem Parasitol*, 104: 185-194.

Takashima E, Takamiya S, Takeo S, Mi-ichi F, Amino H, Kita K. **2001**. Isolation of mitochondria from *Plasmodium falciparum* showing dihydroorotate dependent respiration. *Parasitol Int*, 50: 273-278.

Takemori S & **King TE**. **1964**. Coenzyme Q: reversal of inhibition of succinate cytochrome *c* reductase by lipophilic compounds. *Science*, 144: 852-853.

Thapar MM, Gil JP, Björkman A. **2005**. *In vitro* recrudescence of *Plasmodium falciparum* parasites suppressed to dormant state by atovaquone alone and in combination with proguanil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 99: 62-70.

Thapar MM, Gupta S, Spindler C, Wernsdorfer WH, Björkman A. **2003**. Pharmacodynamic interactions among atovaquone, proguanil and cycloguanil against *Plasmodium falciparum in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 97: 331-337.

Thapar MM, Ashton M, Lindegardh N, Bergqvist Y, Nivelius S, Johansson I, Björkman A. **2002**. Time-dependent pharmacokinetics and drug metabolism of atovaquone plus proguanil (Malarone) when taken as chemoprophylaxis. *Eur J Clin Pharmacol*, 58: 19-27.

Thybo S, Gjørup I, Ronn AM, Meyrowitsch D, Bygberg IC. **2004**. Atovaquone-proguanil (Malarone): an effective treatment for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in travelers from Denmark. *J Travel Med*, 11: 220-224.

Trape JF. **2001**. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 64: 12-17.

Triglia T, Wang P, Sims PF Hyde JE, Cowman AF. **1998**. Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. *EMBO J*, 17: 3807-3815.

Triglia T, Menting JG, Wilson C, Cowman AF. **1997**. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13944-13949.

Uhlemann AC, Yuthavong Y, Fidock DA. **2005**. Mechanisms of antimalarial drug action and resistance. Molecular approaches to malaria. p.229-261. *Washington DC* : *ASM Press*.

Vaidya AB, Lashgari MS, Pologe LG, Morrisey J. **1993**. Structural features of *Plasmodium* cytochrome *b* that may underlie susceptibility to 8-aminoquinolines and hydroxynaphthoquinones. *Mol Biochem Parasitol*, 58: 33-42.

Vaidya AB, Akella R, Suplick K. **1989**. Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA tandemly arrayed 6-kilobase-pair DNA of a malarial parasite. *Mol Biochem Parasitol*, 35: 97-108, Corrigendum: *Mol Biochem Parasitol*, 1990. 39: 295-296.

Vaidya AB & **Arasu P**. **1987**. Tandemly arranged gene clusters of malarial parasites that are highly conserved and transcribed. *Mol Biochem Parasitol*, 22: 249-257.

van der Berg JD, Duvenage CS, Roskell NS, Scott TR. **1999**. Safety and efficacy of atovaquone and proguanil hydrochloride for the prophylaxis of *Plasmodium falciparum* malaria in South Africa. *Clin Ther*, 21: 741-749.

van Dooren GG, Marti M, Tonkin CJ, Stimmler LM, Cowman AF, McFadden GI. **2005**. Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*, 57: 405-419.

van Dyke K, Tremblay GC, Lantz CH, Szustkiewicz C. **1970**. The source of purines and pyrimidines in *Plasmodium berghei*. *Am J Trop Med Hyg*, 19: 202-208.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

van Vugt M, Leonardi E, Phaipun L, Slight T, Thway KL, McGready R, Brockman A, Villegas L, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F. **2002**. Treatment of uncomplicated multidrug-resistant *falciparum* malaria with artesunate-atovaquone-proguanil. *Clin Infect Dis*, 35: 1498-1504.

Vanlerberghe GC & **McIntosh L**. **1997**. Alternative oxidase: from gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48: 703-734.

Verdrager J. **1986**. Epidemiology of emergence and spread of drug-resistant *falciparum* malaria in Southeast Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 17: 111-118.

Vertzoni M, Dressman J, Butler J, Hempenstall J, Reppas C. **2005**. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the *in vivo* dissolution of lipophilic compounds. *Eur J Pharm Biopharm*, 60: 413-417.

Walker DJ, Wakefield AE, Dohn MN, Miller RF, Baughman RP, Hossler PA, Bartlett MS, Smith JW, Kazanjian P, Meshnick SR. **1998**. Sequence polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* cytochrome *b* gene and their association with atovaquone prophylaxis failure. *J Infect Dis*, 178: 1767-1775.

Walliker D, Hunt P, Babiker H. **2005**. Fitness of drug-resistant malaria parasites. *Acta Trop*, 94: 251-259.

Walliker D, Carter R, Sanderson A. **1975**. Genetic studies on *Plasmodium chadaudi*: recombination between enzyme markers. *Parasitology*, 70: 19-24.

Watkins WM, Sixsmith DG, Chulay JD. **1984**. The activity of proguanil and its metabolites, cycloguanil and p-chlorophenylbiguanide, against *Plasmodium falciparum in vitro*. *Ann Trop Med Parasitol*, 78: 273-278.

Wattanagoon Y, Taylor RB, Moody RR, Ochekpe NA, Looareesuwan S, White NJ. **1987**. Single dose pharmacokinetics of proguanil and its metabolites in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 24: 775-780.

Wellems TE & **Plowe CV**. **2001**. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis*, 184: 770-776.

Wellems TE, Walker-Jonah A, Panton LJ. **1991**. Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 3382-3386.

Wendell WB. **1946**. The influence of naphtoquinones upon the respiratory and carbohydrate metabolism of malarial parasites. *Fed Proc*, 5: 406-407.

White NJ. **2004**. Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest*, 113: 1084-1092.

White NJ & **Pongtavornpinyo W**. **2003**. The *de novo* selection of drug-resistant malaria parasites. *Proc Biol Sci*, 270: 545-554.

White NJ. **1998.** Preventing antimalarial drug resistance through combinations. *Drug Resis Updates*, 1: 3-9.

Wibrand F, Ravn K, Schwartz M, Rosenberg T, Horn N, Vissing J. **2001**. Multisystem disorder associated with a missense mutation in the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Ann Neurol*, 50: 540-543.

Wichmann O, Muehleberger N, Jelinek T, Alifrangis M, Peyerl-Hoffmann G, Mühlen M, Grobusch MP, Gascon J, Matteelli A, Laferl H, Bisoffi Z, Ehrhardt S, Cuadros J, Hatz C, Gjørup I, McWhinney P, Beran J, da Cunha S, Schulze M, Kollaritsch H, Kern P, Fry G, Richter J and the European Network on Surveillance of Imported Infectious Diseases. **2004a**. Screening for mutations related of atovaquone/proguanil resistance in treatment failures and other imported isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe. *J Infect Dis*, 190: 1541-1546.

Wichmann O, Muehlen M, Gruss H, Mockenhaupt FP, Suttorp N, Jelinek T. **2004b**. Malarone treatment failure not associated with previously described mutations in the cytochrome *b* gene. *Malar J*, 3: 14. Disponible sur http://www.malariajournal.com/content/3/1/14 (dernière accession le 22 mars 2006).

Williamson DH, Preiser PR, Wilson RJ. **1996**. Organelle DNAs: The bit players in malaria parasites DNA replication. *Parasitol Today*, 12: 357-362.

Wilson RJ & **Williamson DH**. **1997**. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61: 1-16.

Wootton JC, Feng X, Ferdig MT, Cooper RA, Mu J, Baruch DI, Magill AJ, Su XZ. **2002**. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 418: 320-323.

Wu Y, Kirkman LA, Wellems TE. **1996**. Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 1130-1134.

Annexes

Annexe 1..... 124
Tests isotopiques de chimiosensibilité *in vitro* à l'atovaquone.

Annexe 2..... 126
Méthode de génotypage du gène de la dihydroorotate déshydrogénase, *pfdhod*.

Annexe 3..... 128
Méthode génotypique de détection des mutants PfCYT*b* Y268S et Y268C de *P. falciparum* par "enrichissement".

Annexe 4..... 131
Etude de cinq marqueurs microsatellites de *P. falciparum* par une méthode multiplexée.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Annexe 1
Tests isotopiques de chimiosensibilité *in vitro* à l'atovaquone

A. Principe

Le semi-microtest isotopique permet de déterminer la sensibilité *in vitro* d'une souche de *Plasmodium falciparum* à un principe actif (Le Bras & Deloron, 1983). Ce test mesure et quantifie la capacité de doses croissantes d'un antipaludique à inhiber la croissance parasitaire au stade trophozoïtes jeunes et âgés en empêchant la formation des schizontes mûrs. L'activité antipaludique d'une molécule est appréciée à la fin du test en mesurant le pourcentage d'inhibition de l'incorporation d'hypoxanthine tritiée (un précurseur de l'acide nucléique) par le principe actif. Ainsi, un isolat de *P. falciparum* est mis en culture à une parasitémie comprise entre 0,05 % et 0,5 %, dans un milieu de culture (RPMI + 10 % sérum humain) à un hématocrite de 1,5% en présence d'hypoxanthine tritiée. La suspension est distribuée dans chacune des cupules d'une plaque contenant des doses croissantes de médicament puis mise en culture à 37°C 42 heures en incubateur sous 5% d'O_2, 10% de CO_2 et 95% d'humidité. A la fin du test, la radioactivité émise par les formes matures du parasite, directement proportionnelle au pourcentage d'inhibition de *P. falciparum* par le médicament, est évaluée à l'aide d'un compteur à scintillation. On en déduit ainsi les concentrations inhibitrices 50% (CI_{50}) et 90% (CI_{90}) qui permettent de décrire le niveau de sensibilité des parasites et de préciser l'éventuelle résistance *in vitro* de la souche au principe actif considéré. Le seuil de résistance à l'atovaquone est compris entre 40 et 1900 nM (cf article 1).

A. Test gamme basse à l'aide de plaque 24 puits prédosées en atovaquone

Préparation des plaques 24 puits prédosées

La préparation des plaques se fait en condition stérile, sous une hotte à flux laminaire.
La gamme utilisée est la suivante (exposant = nombre de cupules à la concentration indiquée) :

0^3 - $0{,}32^3$ - $0{,}64^3$ - $1{,}6^3$ - $3{,}2^3$ - $6{,}4^3$ - 24^3 - 96^2 - 384^1 nM

Une solution mère (SM) d'atovaquone à 3.10^5 nM est préparée en méthanol dans une fiole jaugée, aliquotée puis conservée à -80°C pendant un an. Au moment de réaliser chaque lot de plaques (50 plaques), trois solutions filles sont préparées en méthanol à partir d'un aliquot de SM : une solution fille (SF) à 3000 nM (SM au $1/100^{ème}$), une première solution petite-fille (SPF_1) à 300 nM (SF au $1/10^{ème}$) et une SPF_2 à 30 nM (SF au $1/100^{ème}$). Chaque solution est agitée environ 5 minutes entre chaque dilution.
Les différentes solutions sont distribuées par volume variable dans chaque puits au moyen d'un diluteur volumétrique programmable Microlab® 510B de manière à obtenir les concentrations finales souhaitées sachant que le volume de suspension parasitaire dans chaque puits sera de 750 µl. Ainsi il ne faut rien distribuer dans les trois premières cupules témoins puis sont distribués : $8\mu l^3$ de SPF_2 pour obtenir après ajout du milieu de culture 0,32 nM ; $16\mu l^3$ de SPF_2 pour 0,64 nM ; $4\mu l^3$ de SPF_1 pour 1,6 nM ; $8\mu l^3$ de SPF_1 pour 3,2 nM ; $16\mu l^3$ de SPF_1 pour 6,4 nM ; $6\mu l^3$ de SF pour 24 nM ; $24\mu l^2$ de SF pour 96 nM et enfin $96\mu l^1$ de SF pour obtenir 384 nM.
Les plaques sont ensuite séchées à température ambiante sous une hotte à flux laminaire puis conservées à température ambiante (25°C) à l'abri de la lumière et de l'humidité. Un contrôle de qualité de chaque lot est réalisé à l'aide de deux clones de référence de chimiosensibilité connue, synchronisés au stade anneaux (> 90%). Les valeurs de CI_{50} attendues sont de 1,7 ± 0,8 nM pour 3D7 (souche sensible) et de 175 ± 20 nM pour PAV50 (souche de sensibilité diminuée).

Réalisation du test

Toutes les manipulations doivent être effectuées stérilement. Le test est réalisé au moyen d'une plaque de 24 puits par isolat. Les hématies parasitées préalablement lavées (trois fois en RPMI) sont mises en culture dans du RPSH (RPMI + 10% de sérum humain) à un hématocrite de 1,5%. La parasitémie par cupule doit être ajustée entre 0,05 et 0,5% à l'aide d'hématies saines. Il faut ainsi préparer une suspension érythrocytaire contenant 19 ml de RPSH, 0,65 ml d'une solution d'hypoxanthine à 7,7 $MBq.ml^{-1}$ et 0,4 ml de globules rouges parasités entre 0,05 et 0,5%. La suspension est homogénéisée et distribuée à raison de 750 µl dans chaque puits. La plaque est agitée 5 minutes environ pour permettre la redissolution des principes actifs puis mise en culture à 37°C sous 5% d'O_2, 10% de CO_2 et 95% d'humidité. Après 42 heures de culture, la plaque est congelée à -80°C pendant quatre heures au minimum pour permettre la lyse des hématies et la libération des parasites. Après décongélation des plaques, les parasites sont collectés sur des papiers filtres spécifiques au moyen d'un collecteur. Les pastilles de papier filtre sont disposées dans des tubes, dans lesquels est ajoutée de l'huile à scintillation permettant la mesure de la radioactivité (en coup par minute, cpm) à l'aide d'un compteur à scintillation Wallac® 1410.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

B. Test extemporané gamme haute en plaque 24 puits

La caractérisation de la sensibilité *in vitro* d'une souche résistante à l'atovaquone-proguanil (TM90C2b) a permis de constater que la résistance à l'atovaquone-proguanil était liée à une nette diminution de la sensibilité (CI_{50} = 8060 ± 45 nM). Pour évaluer la sensibilité de telles souches, nous avons donc mis en place un test semblable au précédent mais en utilisant des plaques prédosées avec une gamme de concentration d'atovaquone beaucoup plus haute de 0 à 25600 nM. Cependant, nous nous sommes rendu compte qu'aucune inhibition de croissance de TM90C2b était observée avec ce type de plaque. L'atovaquone étant une molécule très peu soluble dans l'eau (< 2.10^{-4} $mg.ml^{-1}$), nous avons émis l'hypothèse que l'atovaquone, au moment de l'ajout de la suspension parasitaire ne se redissolvait pas correctement. Nous avons donc évalué la redissolution de l'atovaquone dans le milieu de culture en évaluant par dosage CLHP la quantité de principe actif présent dans le milieu de culture de chaque cupule reconstituée. Les résultats de ces dosages nous ont permis de mettre en évidence que l'atovaquone n'était redissoute qu'à moitié au-delà de 386 nM et au dixième seulement au-delà de 1600 nM. Cette redissolution partielle nous permet donc d'expliquer l'absence d'inhibition de la souche TM90C2b observée avec l'utilisation de plaques prédosées.

Nous avons donc été obligé, pour obtenir une gamme de 0 à 25600 nM, d'ajouter l'atovaquone en solution dans le méthanol, de façon extemporanée, directement dans le milieu de culture de chaque cupule. Pour considérer l'effet du méthanol sur les parasites, 4 des 24 cupules de la plaque seront réalisées en ajoutant du méthanol seul pour corriger l'inhibition obtenue par l'action de l'atovaquone et du méthanol dans les cupules 12800 et 25600 nM. En effet, d'après nos données, l'ajout de 3 µl de méthanol par cupule de 750 µl de culture inhibe d'environ 10% la croissance parasitaire. La gamme utilisée est donc la suivante:

0^3 - 100^2 - 400^2 - 1600^3 - 3200^3 - 6400^3 - 12800^2 - 25600^2 nM d'atovaquone,
$4{,}5^2$ - 9^2 µl de méthanol

Réalisation du test

Toutes les manipulations qui suivent doivent être effectuées stérilement sous une hotte à flux laminaire. Une solution mère (SM) d'atovaquone à 2126,3 µM (à la limite de solubilité) est préparée dans une fiole jaugée dans du méthanol, aliquotée puis conservée à -80°C pendant un an. Au moment de réaliser chaque test, deux solutions filles sont préparées dans du RPSH à partir d'un aliquot de SM, dans des tubes en verre pour éviter l'adhésion de l'atovaquone au plastique. Il faut ainsi préparer une solution fille (SF) à 6000 nM (40 µl de SM + 3960 µl de RPSH) et une solution petite-fille (SPF) à 1500 nM (80 µl de SF + 3920 µl de RPSH) en agitant au moins 5 minutes entre chaque dilution.
Dans le même temps, préparer une suspension érythrocytaire contenant 12,7 ml de RPSH, 0,65 ml d'une solution d'hypoxanthine à 7,7 $MBq.ml^{-1}$ et 0,4 ml de globules rouges parasités entre 0,05 et 0,5%. La suspension est homogénéisée et distribuée à raison de 500 µl dans chaque cupule de la plaque.
Une fois les solutions prêtes, distribuer dans les différents puits à l'aide de pipettes et de cônes stériles les solutions comme suit :

Cupule	Concentrations	Solutions (µl)		RPSH
1, 2, 3	0 nM	Rien		250 µl
4, 5	100 nM	SPF	175	75 µl
6, 7	400 nM	SF	14	236 µl
8, 9, 10	1600 nM		56	194 µl
11, 12, 13	3200 nM		112	138 µl
14, 15, 16	6400 nM		225	25 µl
17, 18	12800 nM	SM	4,5	250 µl
19, 20	25600 nM		9	250 µl
21, 22		Méthanol	4,5	250 µl
23, 24			9	250 µl

La plaque est ensuite agitée 5 minutes puis mise en culture sous 5% d'O_2, 10% de CO_2 et 95% d'humidité. Après 42 heures de culture, la plaque est congelée à -80°C pendant quatre heures au minimum pour permettre la lyse des hématies et la libération des parasites. Après décongélation des plaques, les parasites sont collectés sur des papiers filtres spécifiques au moyen d'un collecteur. Les pastilles de papier filtre sont disposées dans des tubes, dans lesquels est ajoutée de l'huile à scintillation permettant la mesure de la radioactivité (en coup par minute, cpm) à l'aide d'un compteur à scintillation Wallac® 1410. Avec cette méthode, nous avons pu fixer à 8060 ± 45 nM la CI_{50} de la souche résistante à l'atovaquone TM90C2b.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Annexe 2
Méthode de génotypage du gène de la dihydroorotate déshydrogénase, *pfdhod*

Principe

L'objectif de cette méthode est de séquencer la totalité du gène codant pour la dihydroorotate déshydrogénase, une enzyme impliquée dans la synthèse des pyrimidines de *P. falciparum*.

Séquence

Ce gène est localisé au niveau du brin complémentaire du chromosome 6 région 180 000 à 182 500 pb de *P. falciparum* (Genbank MAL6P1). Sa séquence est la suivante, les régions adjacentes sont en gras, les amorces soulignées (couple A) ou encadrées (couple B) :

GTTTTTTTTAATACGATACCTAATATAGATAAAATTTATATTATTGTATTTTTTTATAAAGAAAAATATATAAATATATATATGTATATATTTATTT
ATTATTTTATGTTAGAATTGTTAGGTGGTCAAAAAGGAGAAAAAAAAAAGTCAGTATTTTATGTGATGCATAATATATATATAGTAATATTTTGAAA
GCGAAAAAAAAATTATATACATATATTAATATATATATATATATAATATATATAAATGTATTTAAAAATTTTATGTTTATAAAAATTATAT
GAAATAAAAATAATAATTGAAGGGCCATATATATTATTTTTTTTGAAAATTCCCATTTTGTATATAATTATTTAATATATATATATATATATATA
TAATTCATTTATATATTTAAGAATTGTGTGATAGATAGCTCCAGTCGATTTCT**TGTTACGATGATAATATTTTTAAAAA**ATGATCTCTAAATTGAAA
CCTCAATTTATGTTTTTACCAAAGAAACATATTTTAAGTTATTGTAGAAAGGATGTTTTAAATTTGTTTGAACAGAAGTTTTATTATACTAGCAAAC
GGAAAGAAAGTAATAATATGAAGAATGAATCTTTATTAAGATTAATTAATTATAATAGATATTATAATAAGATAGATTCTAATAATTATTATAATGG
TGGAAAAATATTAAGTAATGATAGGCAATATATATATTCACCATTATGTGAATATAAAAAGAAAATAAATGATATATCATCATATGTATCTGTACCT
TTTAAGATTAATATAAGAAATTTAGGTACTTCCAATTTTGTAAATAATAAGAAGGATGTACTTGATAATGATTATATTTATGAAAATATTAAAAAAG
AAAAATCTAAGCATAAAAAAATAATATTTTTATTATTTGTTTCATTATTTGGATTATATGGTTTTTTTGAATCTTATAATCCTGAATTTTTTTTATA
TGATATATTTTTAAAATTCTGTTTAAAATATATTGATGGTGAAATATGTCATGACCTTTTTTTATTACTAGGAAAATATAATATATTACCATATGAT
ACTAGTAATGATAGTATATATGCATGTACAAATATTAAACATCTTGATTTTATAAATCCATTCGGTGTTGCTGCAGGATTTGATAAAAACGGTGTAT
GTATAGATAGCATATTAAAATTAGGGTTTTCGTTTATCGAAATTGGTACCATAACCCCAAGGGGCCAAACGGGTAATGCAAAACCACGTATTTTTAG
AGACGTTGAATCTAGAAGTATTATAAATTCATGTGGCTTTAATAATATGGGTTGTGACAAAGTTACAGAAAATTTAATACTTTTTCGTAAAAGACAA
GAAGAAGATAAATTGTTAAGTAAACATATTGTAGGTGTCAGTATAGGTAAGAATAAAGATACTGTTAATATTGTAGATGATCTAAAATATTGTATTA
ATAAAATAGGAAGATACGCTGATTATATAGCTATTAATGTAAGCTCCCCTAATACACCTGGGTTAAGAGATAATCAAGAAGCTGGGAAGTTAAAAAA
TATAATTTTAAGTGTAAAAGAAGAAATAGATAATTTAGAAAAGAATAATATTATGAATGATGAAAGTACTTATAATGAAGATAATAAAATAGTAGAA
AAAAAAAATAATTTTAATAAAAATAATAGTCACATGATGAAAGATGCTAAGGATAACTTCTTATGGTTTAATACAACAAAAAAGAAGCCCTTGGTTT
TTGTTAAGTTAGCTCCAGATCTTAATCAAGAACAGAAAAAAGAAATTGCTGATGTATTACTTGAAACTAATATAGATGGTATGATTATTTCTAATAC
TACGACACAAATAAATGACATAAAAAGTTTTGAAAATAAAAAAGGAGGTGTTAGCGGAGCAAAACTAAAAGATATATCTACAAAATTTATATGTGAA
ATGTATAATTATACAAATAAACAAATACCCATTATTGCATCAGGAGGGATATTTAGTGGATTGGATGCTTTAGAAAAAATTGAAGCAGGTGCTTCAG
TTTGTCAATTATATTCTTGTTTGGTTTTTAATGGTATGAAATCAGCTGTACAAATAAAAAGAGAATTGAATCACTTGCTATATCAAAGAGGATATTA
CAATTTAAAGGAGGCCATTGGCCGAAAGCATAGCAAAAGTTAA**TTAAACACGGGCGACACATAAGTGCGCAAAAAAAAAAAAAATATATATATATATA**
CATTTATATATTTTTTTTTTATGATGATATAATGAATTAATAATGTAAAAATGTTTTGGGGCTTAAATGTAATAGCCTTATTTTTAAATATTACACA
AATGTATATATATATATATATATATATATATATGTATATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATGTTCGTGGATTTATTAAACAACTTGTCGTGT
TTAACAACTTGGAACATTTTCAATTCCTGTAATTCATGTTATGGTTATTTTTTATTTTCCCTTGCTTGGGCATATG

Méthode

Pour séquencer l'ensemble du gène, deux PCR ont été nécessaires.

1) PCR A

Amorces utilisées : - DHOD1b sens 5'-ATAGATAGCTCCAGTCGATTTCT-3'
- DHOD1b antisens 5'-CTTGATTATCTCTTAACCCAGGT-3'
- Taille du fragment obtenu, 1115 pb.

Mélange réactionnel :

	[réactifs]	[tube PCR]	Volume
Tampon	10X	1X	2,5 µl
dNTP	2,5 mM	200 µM	2 µl
$MgCl_2$	25 mM	3 mM	3 µl
Amorce sens	75 µM	0,3 µM	0,1 µl
Amorce antisens	75 µM	0,3 µM	0,1 µl
***Taq* polymérase**	5U.µl^{-1}	1,25 U	0,25 µl
Eau ppi			14,6 µl
ADN			2,5 µl
Volume total			25 µl

Programme d'amplification :

Dénaturation	95°C	10 min	
Amplification	95°C	30 sec	35 cycles
	60°C	30 sec	
	72°C	70 sec	
Elongation	72°C	10 min	

Après analyse des produits de PCR en gel d'agarose à 1%, les produits d'amplification sont séquencés dans un sens avec l'amorce sens puis dans l'autre avec l'amorce antisens.

2) <u>PCR B</u> :

Amorces utilisées : - DHOD2b sens 5'-TAAGCTCCCCTAATACACCTGG-3'
- DHOD2b antisens 5'-CTTATGTGTCGCCCGTGTTTA-3'
- Taille du fragment obtenu, 705 pb.

Mélange réactionnel :

	[réactifs]	[tube PCR]	Volume
Tampon 10X	10X	1X	2,5 µl
dNTP	2,5 mM	200 µM	2 µl
$MgCl_2$	25 mM	3 mM	3 µl
Amorce sens	75 µM	0,3 µM	0,1 µl
Amorce antisens	75 µM	0,3 µM	0,1 µl
***Taq* polymérase**	$5U.\mu l^{-1}$	1,25 U	0,25 µl
Eau ppi			16 µl
ADN			1 µl
Volume total			25 µl

Programme d'amplification :

Dénaturation	95°C	10 min	
Amplification	95°C	30 sec	35 cycles
	60°C	30 sec	
	72°C	70 sec	
Elongation	72°C	10 min	

Après analyse des produits de PCR en gel d'agarose à 1%, les produits d'amplification obtenus sont séquencés avec l'amorce sens uniquement.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Annexe 3

Méthode génotypique de détection des mutants PfCYT*b* Y268S et Y268C de *P. falciparum* par "enrichissement"

Principe

L'objectif de cette méthode est d'arriver à identifier les mutations du cytochrome *b* de *P. falciparum* Y268S et Y268C minoritaires dans un isolat polyclonal. Ces mutations sont les marqueurs moléculaires de la résistance à l'atovaquone-proguanil. Cette méthode a été adaptée d'une méthode utilisée en cancérologie pour le diagnostic précoce des cancers liés à des mutations ponctuelles (Figure 18 ; Kahn, 1991).

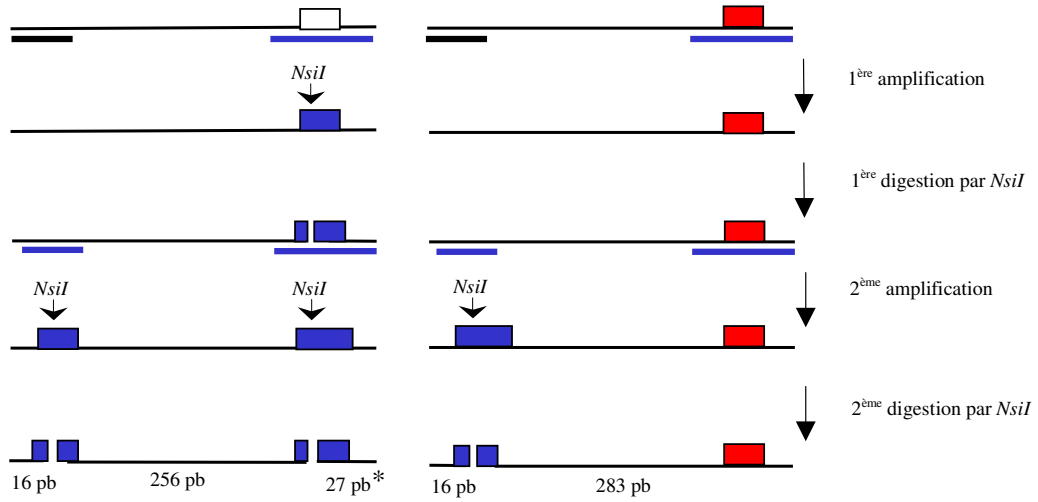


Figure 18 : Principe de détection d'une mutation minoritaire par "enrichissement".
En blanc est représenté la position sauvage, la position mutante est en rouge. La première amplification permet l'insertion d'un site de digestion par l'enzyme *NsiI* au niveau de la séquence sauvage (bleu). La première digestion entraîne ainsi la neutralisation du brin sauvage pour les amplifications futures. La deuxième amplification/digestion utilise en fait la même amorce antisens que pour la première PCR mais c'est l'amorce sens qui cette fois introduit un site de coupure au niveau des brins mutants restants.
*En cas de digestion partielle du brin sauvage il y a donc insertion d'un deuxième site de coupure et nous pouvons observer sur le gel une bande de 27pb.

Séquence

Les mutations sont localisées au niveau du gène mitochondrial codant le cytochrome *b* (Genbank M99416). La position mutante est en gras, la subtitution du A par un C donne Y268S et du A par un G donne Y268C. Pour la deuxième amplification, l'amorce sens (noir) n'est raccourcie que de trois nucléotides du côté 3' et modifée au niveau de la 15ème base pour permettre l'insertion du site de coupure contrôle. La même amorce antisens est utilisée pour les deux amplifications (soulignement plus épais), le mesappariement au niveau de la deuxième base de l'extrémité 3' combiné avec le génotype sauvage permet l'insertion du site de coupure.

ATGAACTTTTACTCTATTAATTTAGTTAAAGCACACTTAATAAATTACCCATGTCCATTGAACATAAACTTTTTATGGAATTACGG
ATTCCTTTTAGGAATAATATTTTTTATTCAAATTATAACAGGTGTATTTTTAGCAAGTCGATATACACCAGATGTTTCATATGCAT
ATTATAGTATACAACACATTTTAAGAGAATTATGGAGTGGATGGTGTTTTAGATACATGCACGCAACAGGTGCTTCTCTTGTATTT
TTATTAACATATCTTCATATTTTAAGAGGATTAAATTACTCATATATGTATTTACCATTATCATGGATATCTGGATTGATTTTATT
TATGATATTTATTGTAACTGCTTTCGTTGGTTATGTCTTACCATGGGGTCAAATGAGTTATTGGGGTGCAACTGTAATTACTAACT
TGTTATCCTCTATTCCAGTAGCAGTAATTTGGATATGTGGAGGATATACTGTGAGTGATCCTACAATAAAACGATTTTTTGTACTA
CATTTTATCTTACCATTTATTGGATTATGTATTGTATTTATACATATATTTTTCTTACATTTACATGGTAGCACAAATCCTTTAGG
GTATGATACAGCATTAAAAATACCCTTTTATCCAAATCTATTAAGTCTTGATGTTAAAGGATTTAATAATGTTATAATTTTATTTC
TAATACAAAGTTTATTTGGAATTATACCTTTATCACATCCTGATAATGCTATCGTAGTAAATACATATGTTACTCCATCTCAAATT
GTACCTGAATGGTACTTTCTACCATTTT**A**TGCAATGTTAAAAACTGTTCCAAGTAAACCAGCTGGTTTAGTAATTGTATTATTATC
ATTACAATTATTATTCTTATTAGCAGAACAAAGAAGTTTAACAACTATAATTCAATTTAAAATGATTTTTGGTGCTAGAGATTATT
CTGTTCCTATTATATGGTTTATGTGTGCATTCTATGCTTTATTATGGATTGGATGTCAATTACCACAAGATATATTCATTTTATAT
GGTCGATTATTTATTGTATTATTTTTCTGTAGTGGTTTATTTGTACTTGTTCATTATAGACGAACACATTATGATTACAGCTCCCA
AGCAAACATATAA

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Méthode

1) PCR 1

Amorces utilisées : - Enr1 sens 5'-TTTATTGGATTATGTATTGTATTTATAC-3'
- Enr1-2 antisens 5'-TTACTTGGAACAGTTTTTAACA**A**T-3'
- Taille du fragment obtenu 299 pb.

Mélange réactionnel :

	[réactifs]	[tube PCR]	Volume
Tampon 10X	10X	1X	2,5 µl
dNTP	2,5 mM	200 µM	2 µl
$MgCl_2$	25 mM	4 mM	4 µl
Amorce sens	7,5 nM	2,58 ng	0,4 µl
Amorce antisens	7,5 nM	2,52 ng	0,46 µl
***Taq* polymérase**	$5U.\mu l^{-1}$	1,25 U	0,25 µl
Eau ppi			13,39 µl
ADN			2 µl
Volume total			25 µl

Programme d'amplification :

Dénaturation	95°C	10 min	
Amplification	95°C	30 sec	15 cycles
	55°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
Elongation	72°C	7 min	

2) Première digestion enzymatique

Les produits d'amplification sont alors digérés grâce à l'enzyme *NsiI* à 37°C.
Site de coupure *NsiI* :

5'-…..ATGCAT….-3'
3'-…..TACGTA….-5'

Un tube de digestion contient :
- 10 µl de produits d'amplification de la PCR1,
- 0,2 µl d'enzyme soit 2U,
- 4 µl de tampon 10X,
- 25,8 µl d'eau.

Le mélange doit être recouvert d'une goutte d'huile avant d'être mis dans le bain-marie. Au bout de 2 heures, rajouter 2U d'enzyme soit 2 µl contenant 1,8 µl de tampon 1X et 0,2 µl d'enzyme.

Taille des fragments obtenus : séquence sauvage 272 + 27 pb ; séquence mutante 299 pb.

3) PCR 2

Amorces utilisées : - Enr1 sens 5'-TTTATTGGATTATG**C**ATTGTATTTA-3'
- Enr1-2 antisens idem à la PCR1 5'-TTACTTGGAACAGTTTTTAACA**A**T-3'
- Amplification du mutant uniquement, taille du fragment obtenu, 299 pb.

Mélange réactionnel :

	[réactifs]	[tube PCR]	Volume
Tampon 10X	10X	1X	5 µl
dNTP	2,5 mM	200 µM	4 µl
$MgCl_2$	25 mM	4 mM	8 µl
Amorce sens	75 µM	150 ng	0,26 µl
Amorce antisens	75 µM	147 ng	0,27 µl
***Taq* polymérase**	$5U.\mu l^{-1}$	1,25 U	0,5 µl
Eau ppi			21,97 µl
ADN dig. 1			10 µl
Volume total			50 µl

Programme d'amplification :

Dénaturation	95°C	10 min	
Amplification	95°C	30 sec	35 cycles
	55°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
Elongation	72°C	7 min	

4) <u>Deuxième digestion enzymatique</u>

Les produits d'amplification sont aussi digérés grâce à l'enzyme *NsiI* à 37°C.
Un tube de digestion contient :

- 16 µl de produits d'amplification de la PCR1,
- 0,2 µl d'enzyme soit 2U,
- 5 µl de tampon 10X,
- 39,8 µl d'eau.

Le mélange doit être recouvert d'une goutte d'huile avant d'être mis dans le bain-marie. Au bout de 2 heures, rajouter 2U d'enzyme soit 2 µl contenant 1,8 µl de tampon 1X et 0,2 µl d'enzyme.

<u>Taille des fragments obtenus</u> : séquence mutante 283 + 16 pb (299 pb en cas de digestion partielle lors de la deuxième digestion), séquence sauvage 16 + 256 pb (27 pb en cas de digestion partielle lors de la première digestion, 272 pb en cas de digestion partielle lors de la deuxième digestion).

5) <u>Analyse des produits de digestion par migration</u>

Les produits de digestion sont analysés en gel de polyacrylamide à 10% en tampon TBE 1X. Quinze microlitres de chaque produit de digestion sont déposés. La migration dure environ 4 heures à 250 V.

Un fragment de 283 pb est visible si les mutations Y268S ou Y268C sont présentes. La bande à 256 pb caractérise le génotype sauvage. Les bandes liées à des digestions partielles ont une taille de 272 et 299pb.

<u>Limite de sensibilité de la méthode</u> :

La limite de détection de notre technique est de une copie mutante parmi 10^3 copies sauvages (Figure 19).

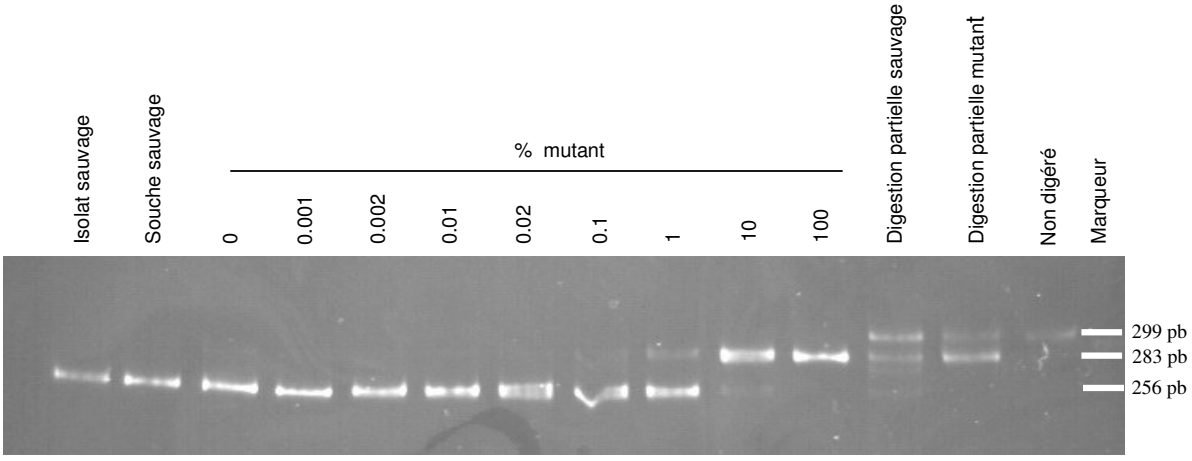


Figure 19 : Photo de gel montrant la limite de détection de la mutation Y268S du cytochrome *b* par la méthode "d'enrichissement".

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Annexe 4

Etude de cinq marqueurs microsatellites de *Plasmodium falciparum* par une méthode multiplexée

Principe

L'objectif de cette méthode est d'analyser cinq marqueurs microsatellites à partir d'une amplification multiplexée d'ADN. Ces marqueurs ont été choisis en fonction de leur degré de polymorphisme en Afrique (Durand, 2003 ; Anderson, 1999 ; Anderson, 2000).

Séquence

- **TAA81**

Ce microsatellite est localisé au niveau du brin complémentaire du chromosome 5 de *P. falciparum* (Genbank AF010510). Les régions adjacentes de ce marqueur microsatellite sont représentées ci-dessous, les amorces sont soulignées, la séquence microsatellite est en gras :

TTTAATTTACATTCTTCATCTAGTCTTTTATTAAGTTCTTTAATTTTATTTTCATACATTTCACACAACACAGGATTATTACCATC
ACCATTAATGTTATCATTCCTTGTA**TTATTATTATTATTATTATTATTATTA**TGTTTGATTTGGTTATCATCTTTATCCTTTCCCA
TTTGTCCAGCTTGTTCATTTGTGTCATCCTTTTTGTCCTTTTCCTCACCTTCCCTTATTTCTTCATTTTTCAATACTTTAAATTTT
TGCTGTAATTCTTCATACTTGTCTGATAACTTTTGAAAATTA

- **TAA87**

Ce microsatellite est localisé au niveau du brin complémentaire du chromosome 6 de *P. falciparum* (Genbank AF010571). Les régions adjacentes de ce marqueur microsatellite sont représentées ci-dessous, les amorces sont soulignées, la séquence microsatellite est en gras :

TACAATTCTGTTCGTTCAGGATATTCTCTAGAAAGCTTTTATCGCCGAAGGGATGTATATTCGTCGAATTATTATTACTGTTCATA
CTACTGTTCATGTTATTGTTAAATCCATTTAAAGTGATGGGCCCACTAGAAGGTCCTAAATTATTCAACATGTTCATATTACTCAC
CACA**TTATTATTATTATTATTA**TTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTAGGTGGTTGAATGGTGTTGCCATTTATCG
ACATTGAAACATTTGGAAATAATTCATTCAACACATTTTGCT

- **ARA2**

Ce microsatellite est localisé au niveau du brin complémentaire du chromosome 11 de *P. falciparum* (Genbank X17484). Les régions adjacentes de ce marqueur microsatellite sont représentées ci-dessous, les amorces sont soulignées, la séquence microsatellite est en gras :

TTTTTGGTCAAGTGGTACAGATCTTTTTTTCAGAATTAATTTTTTTCTTTGTTCTGTTCCGCTTTGAGTATTATTAATATTG**TTAT**
TATTATTATTATTATTATTATTATTATCAGCAATACTTTGTTTATTCATATGATTATTATTTAGATAATTCTGGTTTTTAAAATTA
AAAGCATTATTATTCATTTTATCATTTAACATATTATTTTGTTGGTGATTCATATGTACATTTGAACCTCCTACTTGTTGATTATT
ATTTAAATAACTTCCTTTGATATTATTATAGTTAAAATTTTG

- **PfPK2**

Ce microsatellite est localisé au niveau du brin complémentaire du chromosome 12 de *P. falciparum* (Genbank X63648). Les régions adjacentes de ce marqueur microsatellite sont représentées ci-dessous, les amorces sont soulignées, la séquence microsatellite est en gras :

AGAACCTGAAGTGAAAATAATAGTACAAACATCATTAAGATTACCTTTATTTTTTTTTATTTGTTTCATTAAATAGTTATTCCTTT
CATCGATACTACGATTATTTGTATTCATTTTTTGAATATTATTATTATTGTTATTATTGTTGTTATTATTGTTATTGTTGTTGTTA
TTATTATTATTATTGTTATTACTA**TTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTA**GTATAATCTGCTTGTTCCTTCTTTAGCTT
ATCATAAAAAGCATTATTCGGATTATGTTCTTTATGAAAATC

- **TAA60**

Ce microsatellite est localisé au niveau du brin complémentaire du chromosome 13 de *P. falciparum* (Genbank AF010556). Les régions adjacentes de ce marqueur microsatellite sont représentées ci-dessous, les amorces sont soulignées, la séquence microsatellite est en gras :

GGTAAAAAAAGGAGGATAAATACATATTATTATTATAAGATATA**TTATTATTATTATTATTATTATTATTA**TTTTTTGTCAACATC
GTTACTACTTAGAACAATATTATTATTATTATTACTAATACTTTTGTTTATCATTATATTATTACTATTATTACTTACATTTACTT
TTATCATATTAAAACTTGAATTATTTCTCTTTGAGGATCGCTTTCTCTTGGTTTTACTTAAATGCACTTCAAATAATATAGTCCAA
ATATTTCGTTCTTTCTTAGATGTTT

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Méthode

Amorces utilisées :

- TAA81 sens 5'-CATTTCACACAACACAGGATT-3'
- TAA81 antisens 5' Fam-GAAATAAGGGAAGGTGAGGA-3'
- Taille attendue des fragments, entre 163 et 190 pb

- TAA87 sens 5'-ACATGTTCATATTACTCACCA-3'
- TAA87 antisens 5' Fam-CATTCAACCACCTAACAAC-3'
- Taille attendue des fragments, entre 68 et 113 pb

- ARA2 sens 5'-TCCGCTTTGAGTATTATTA-3'
- ARA2 antisens 5' Hex-TTAAAAACCAGAATTATCTAA-3'
- Taille attendue des fragments, entre 95 et 125 pb

- PfPK2 sens 5'-ATTCCTTTCATCGCTACTAC-3'
- PfPK2 antisens 5' Hex-AAAGAAGGAACAAGCAGA-3'
- Taille attendue des fragments, entre 156 et 192 pb

- TAA60 sens 5'-GGTAAAAAAAGGAGGATAAAT-3'
- TAA60 antisens 5' Ned-AAGTAGTAACGATGTTGACAAA-3'
- Taille attendue des fragments, entre 71 et 98 pb

Pour permettre leur détection en fin de migration, les amorces antisens sont fluorescentes, marquées à la 6-carboxy-fluorescéine (Fam), à l'hexacloro-6-carboxy-fluorescéine (Hex) ou à la trichloro-6-carboxy-fluorescéine (Ned).

Mélange réactionnel :

	[réactifs]	[tube PCR]	Volume
Tampon	10X	1X	2,5 µl
dNTP	2,5 mM	200 µM	2 µl
$MgCl_2$	25 mM	5 mM	5 µl
TAA81 sens	7,5 µM	0,039 µM	0,13 µl
TAA81 antisens*	7,5 µM	0,013 µM	0,045 µl
TAA81 antisens	7,5 µM	0,026 µM	0,09 µl
TAA87 sens	7,5 µM	0,039 µM	0,13 µl
TAA87 antisens*	7,5 µM	0,013 µM	0,045 µl
TAA87 antisens	7,5 µM	0,026 µM	0,09 µl
ARA2 sens	75 µM	0,3 µM	0,1 µl
ARA2 antisens*	75 µM	0,3 µM	0,1 µl
PfPK2 sens	7,5 µM	0,12 µM	0,4 µl
PfPK2 antisens*	7,5 µM	0,024 µM	0,08 µl
PfPK2 antisens	7,5 µM	0,096 µM	0,32 µl
TAA60 sens	75 µM	0,3 µM	0,1 µl
TAA60 antisens*	75 µM	0,15 µM	0,05 µl
TAA60 antisens	75 µM	0,15 µM	0,05 µl
***Taq* polymérase**	5U.µl^{-1}	1,25 U	0,25 µl
Eau ppi			12,52 µl
ADN			1 µl
Volume total			25 µl

* Amorces antisens fluorescentes

Programme d'amplification :

Dénaturation	95°C	10 min	
Amplification	95°C	30 sec	35 cycles
	55°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
Elongation	72°C	15 min	

Les produits d'amplification sont ensuite dénaturés (1 µl de produits d'amplification avec 18,5 µl de formamide désionisé et 0,5 µl de marqueur de taille ROX 500 marqué à la 6-carboxy-rhodamine) cinq minutes à 95°C, puis placés dans la glace cinq minutes. L'analyse s'effectue ensuite dans un séquenceur Abi Prism® 310 selon les paramètres suivants : gel de migration Pop® 4, temps d'injections des produits d'amplification cinq secondes, voltage d'injection 15 kV, voltage d'électrophorèse 15 kV, temps de migration 25 minutes à 60°C. L'analyse de la fluorescence est effectuée avec le filtre D.

→ Exemple de profils page suivante

Exemples de profils :

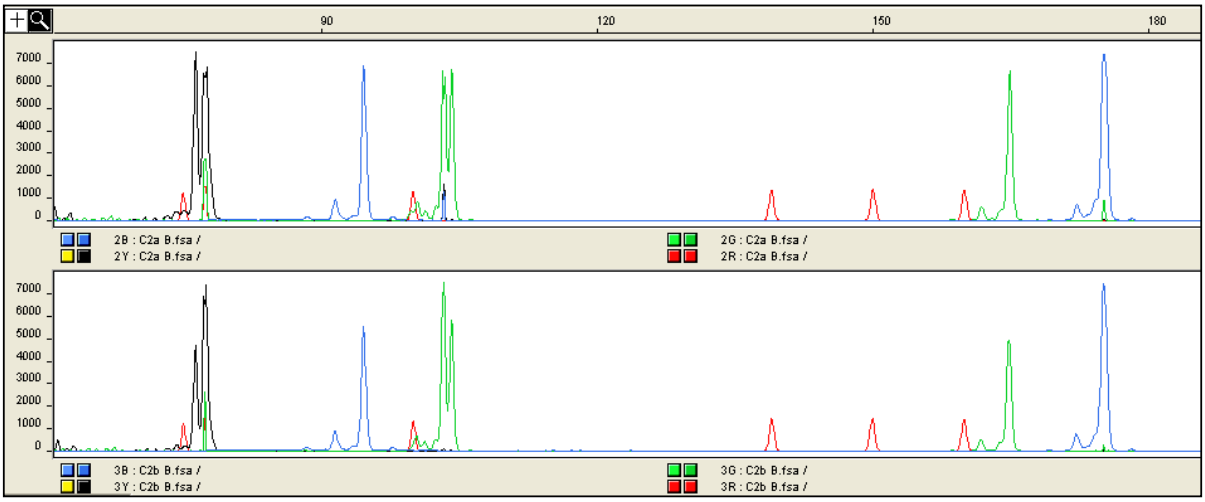


Figure 20 : Profils microsatellites de souches isolées avant (TM90C2a, *pfcytb* sauvage) et après (TM90C2*b*, PfCYT*b* Y268S) échec thérapeutique par atovaquone-proguanil.

L'axe des abscisses représente la taille des fragments d'amplification en paire de base (pb). L'axe des ordonnées représente l'intensité de fluorescence des produits d'amplification selon une unité arbitraire. TAA87 (95 pb) et TAA81 (175 pb) marqués à la 6-carboxy-fluorescéine (Fam) fluorescent en bleu, ARA2 (103,5 pb) et PfPK2 (165 pb) marqués à l'hexacloro-6-carboxy-fluorescéine (Hex) fluorescent en vert et TAA60 marqué à la triclhoro-6-carboxy-fluorescéine fluoresce en noir (Ned). Le marqueur de taille ROX 500 marqué à la 6-carboxy-rhodamine fluoresce en rouge.

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

tel-00130030, version 1 - 8 Feb 2007

Contribution à l'étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* à l'atovaquone-proguanil

L'apparition récurrente de *Plasmodium falciparum* résistant aux antipaludiques est un obstacle majeur au contrôle du paludisme. Introduite en 2000, une nouvelle association très bien tolérée, l'atovaquone-proguanil est rapidement devenue le traitement de choix des accès palustres simples dans certains hôpitaux français. Ce travail de recherche avait pour objectif d'approfondir les connaissances sur la résistance à cette association. Nous n'avons détecté aucune résistance naturelle à l'atovaquone-proguanil en Afrique de l'Ouest et dans l'Océan Indien parmi 477 isolats. La majorité des rechutes précoces sont liées à une malabsorption des principes actifs alors que les échecs tardifs sont liés à la présence de parasites hautement résistants *in vitro* présentant, au moment de la rechute, une mutation au niveau du codon 268 du cytochrome *b* (Y268S ou Y268C) sans augmentation du nombre de copies de ce gène, évalué par PCR en temps réel à 16 ± 9 copies par parasite. Le séquençage du génome mitochondrial et l'analyse de marqueurs microsatellites chromosomiques des parasites isolés avant et après la rechute parasitaire montrent que la mutation associée à cette résistance est apparue indépendamment chez chacun des six patients en échec étudiés. L'atovaquone-proguanil est efficace pour le traitement des voyageurs avec moins de 0,1% de résistance. Le risque actuel de dispersion des résistances est négligeable puisqu'elles émergent chez des patients traités hors de zone de transmission. Par contre, si cette association devait être déployée en zone d'endémie, il serait indispensable de la combiner avec d'autres molécules.

Mots clés : *Plasmodium falciparum*, résistance, atovaquone, proguanil, Malarone, cytochrome *b*.

Contribution to the study of *Plasmodium falciparum* resistance to atovaquone-proguanil

The recurrent emergence and spread of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* delays the control of malaria. Since 2000, a safe and efficient new combination, atovaquone-proguanil, has rapidly became the first line antimalarial drug in most European infectious diseases wards. This work aimed to better understand *falciparum* resistance to atovaquone-proguanil. The copy number of the cytochrome *b* gene, *pfcytb*, the main atovaquone-proguanil target, was evaluated by real-time PCR at 16 ± 9 copies per parasite. No natural resistance to atovaquone/proguanil was detected by *in vitro* phenotyping in West African and Indian Ocean isolates although therapeutic failures were observed. The majority of early therapeutic failures were linked to poor drug absorption while late therapeutic failures were associated with day failure parasites highly resistant *in vitro* and carrying a *pfcytb* mutation (Y268S or Y268C) without any amplification of *pfcytb* gene. Mitochondrial genome sequencing associated with microsatellite marker analysis of parasites from before and after parasite recrudescence show that these mutations had appeared independently within each of the six patients experiencing a therapeutic failure. With *falciparum* resistance being less than 0.1%, atovaquone-proguanil is efficient for treatment of travellers experiencing malaria. As resistance emerged within patient without risk of transmission, resistance spread has not begun. Combination with an antimalarial drug having a different target should be a prerequisite of deployment in endemic areas.

Key words : *Plasmodium falciparum*, resistance, atovaquone, proguanil, Malarone, cytochrome *b*.

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie
Hôpital Bichat-Claude Bernard
46, rue Henri Huchard
75877 Paris Cedex 18

EA 209 : Eucaryotes pathogènes, transports membranaires et chimiorésistances
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris V
4, avenue de l'Observatoire
75270 Paris cedex 06