



PROJETS TRANSVERSAUX MULTINATIONAUX, EXEMPLE DU RESEAU DE COORDINATION FRANCAISE DES INSTITUTS PASTEUR Karma : étude de la résistance de *Plasmodium falciparum* à l'artémisinine

Eric Legrand, Frederic Arieu, Didier Menard et Odile Mercereau-Puijalon



Déclaration de liens d'intérêt avec les industries de santé en rapport avec le thème de la présentation (loi du 04/03/2002) :

Intervenant : Legrand/Eric

Titre : Intitulé de l'intervention

L'orateur ne souhaite pas répondre

Consultant ou membre d'un conseil scientifique

OUI NON

Conférencier ou auteur/rédacteur rémunéré d'articles ou documents

OUI NON

Prise en charge de frais de voyage, d'hébergement ou d'inscription à des congrès ou autres manifestations

OUI NON

Investigateur principal d'une recherche ou d'une étude clinique

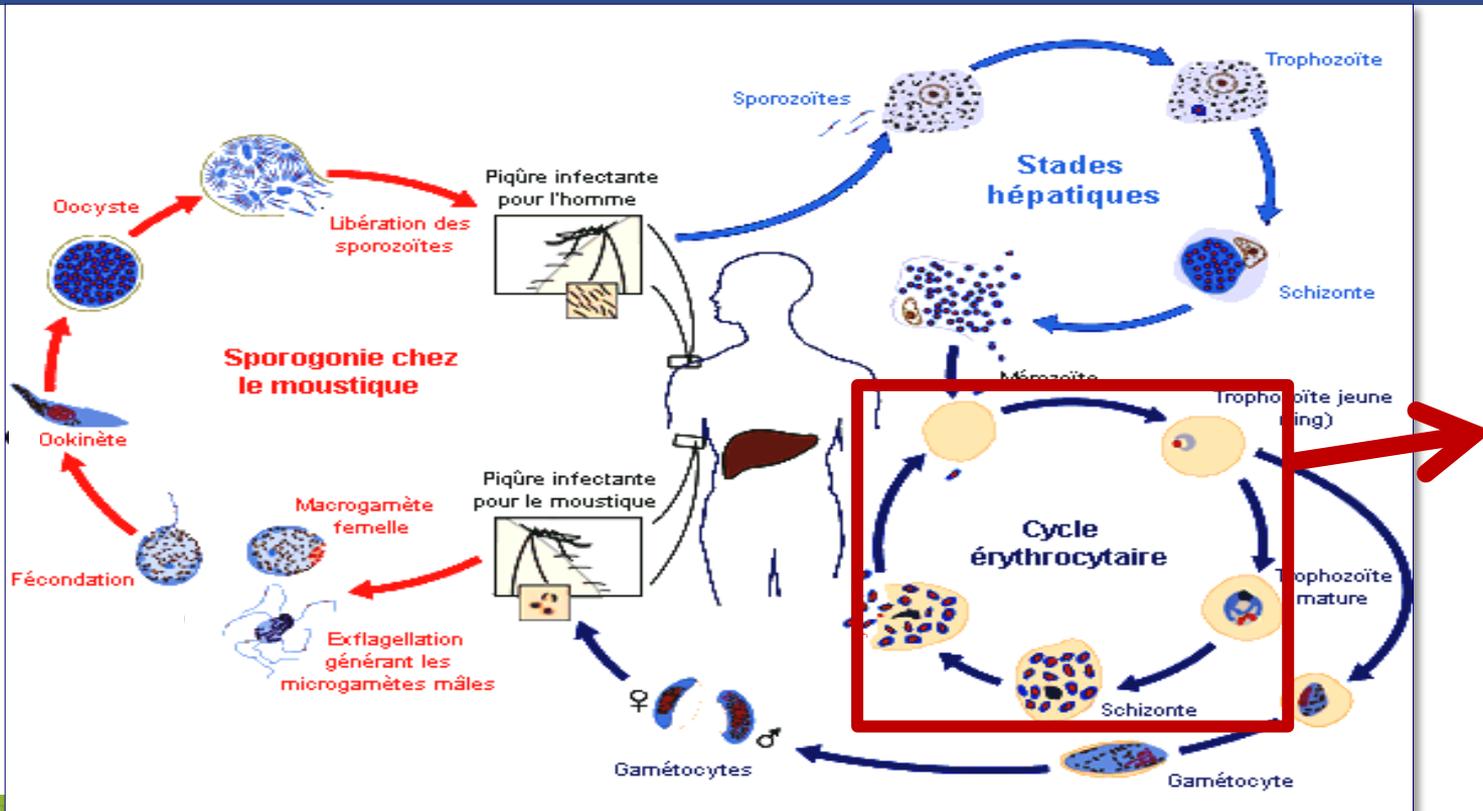
OUI NON

Institut Pasteur et Réseau International des Instituts Pasteur

- Création en 1887
- Fondation privée reconnue d'utilité publique
- Réseau de 33 Instituts



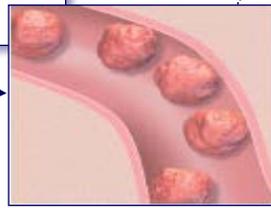
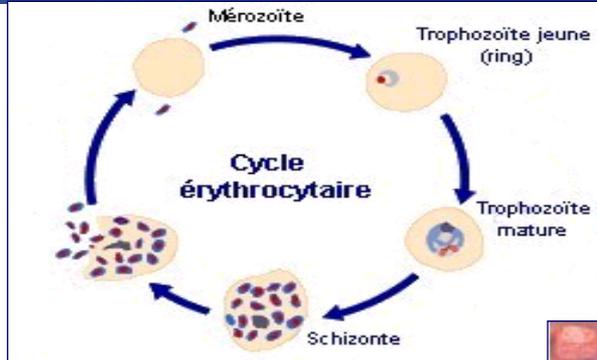
Cycle du paludisme



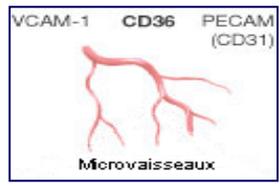
Adapté du CDC 2005

18^{es} JNI, Saint-Malo, du 21 au 23 juin 2017

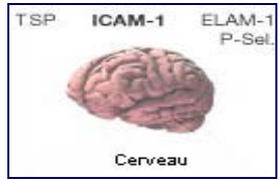
Physiopathologie du paludisme



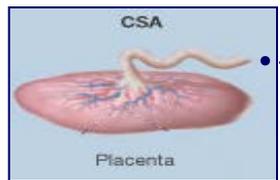
2) Cytoadhérence



- Défaillance polyviscérale
 - Insuffisance rénale
 - œdème pulmonaire



- Anoxie cérébrale
 - Coma



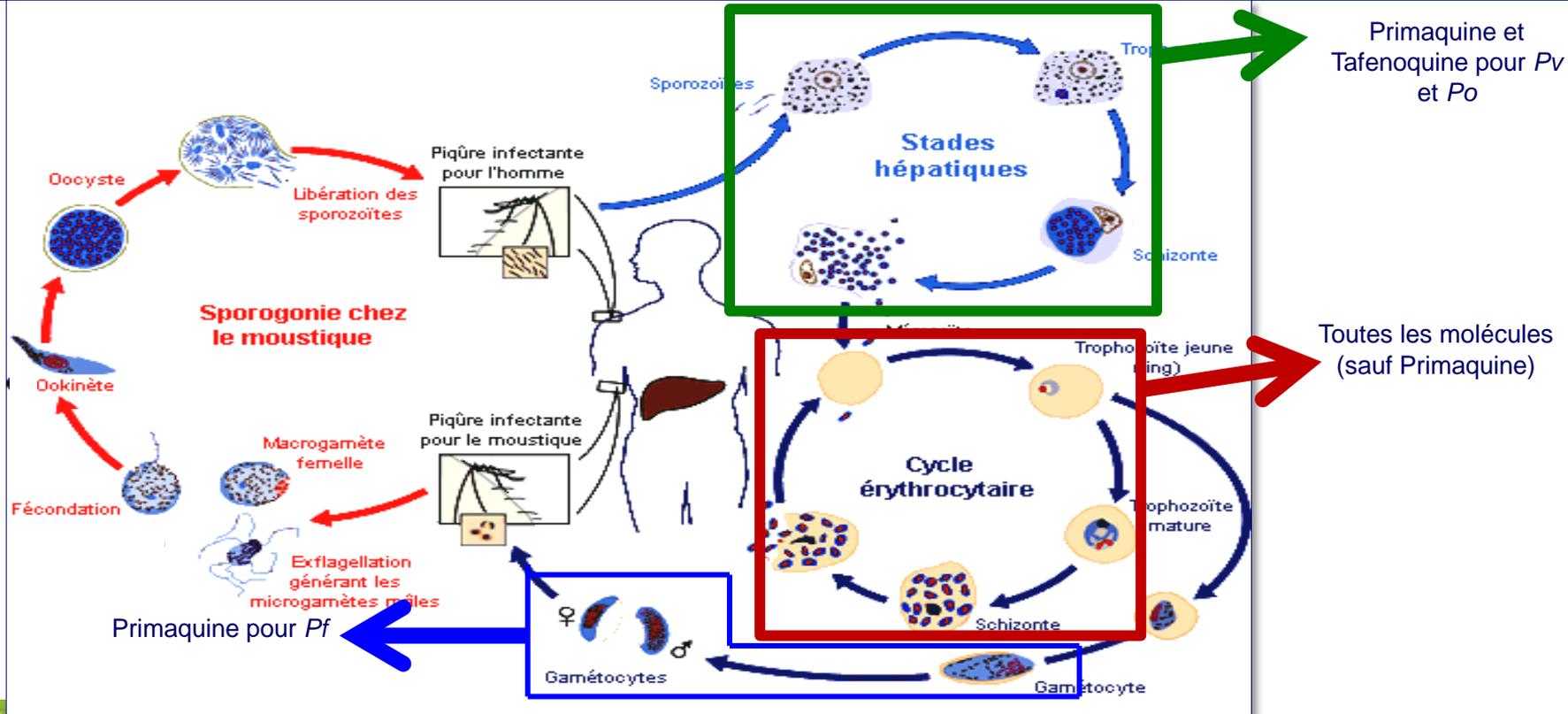
- ↓ échanges placentaires
 - Petit poids de naissance

- 1) Libération d'hémozöine
 - Accès fébriles rythmés

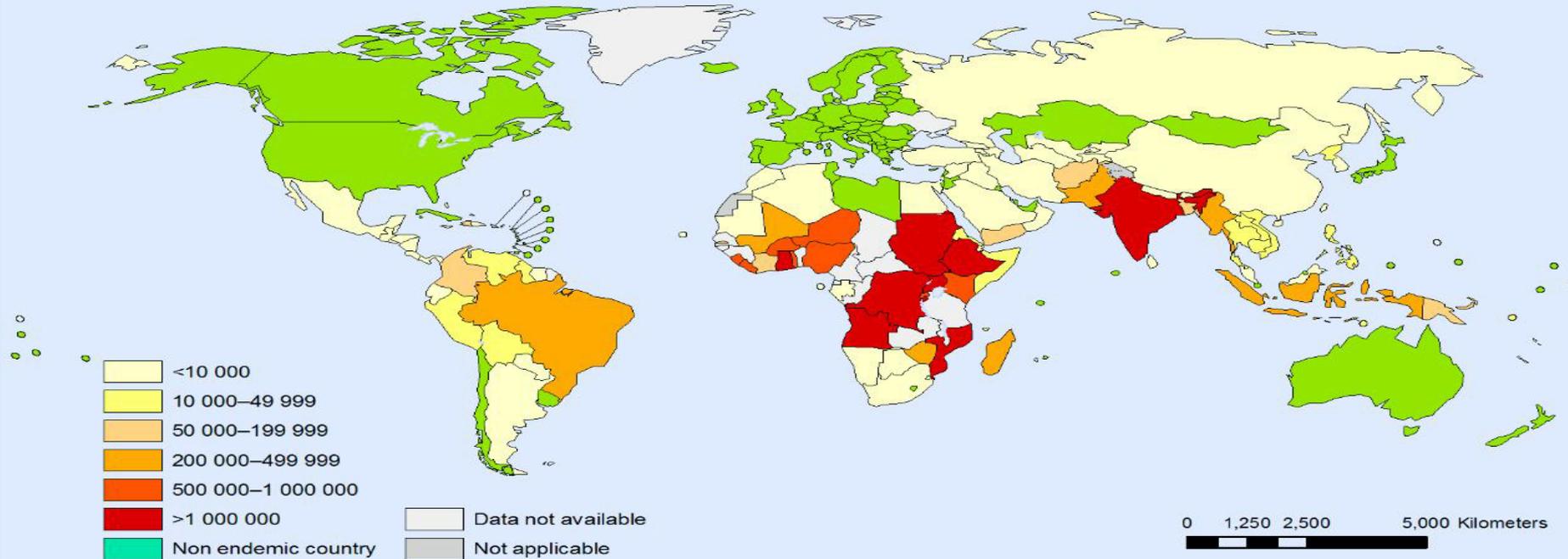
Plasmodium falciparum : Traitements avant 2000

- **Avant 2000**
 - Chloroquine
 - Mefloquine
 - Quinine
 - Quinine + Doxycycline
 - Sulfadoxine + Pyrimethamine
 - Halofantrine

Cible des antipaludiques



Répartition des cas de paludisme en 2010



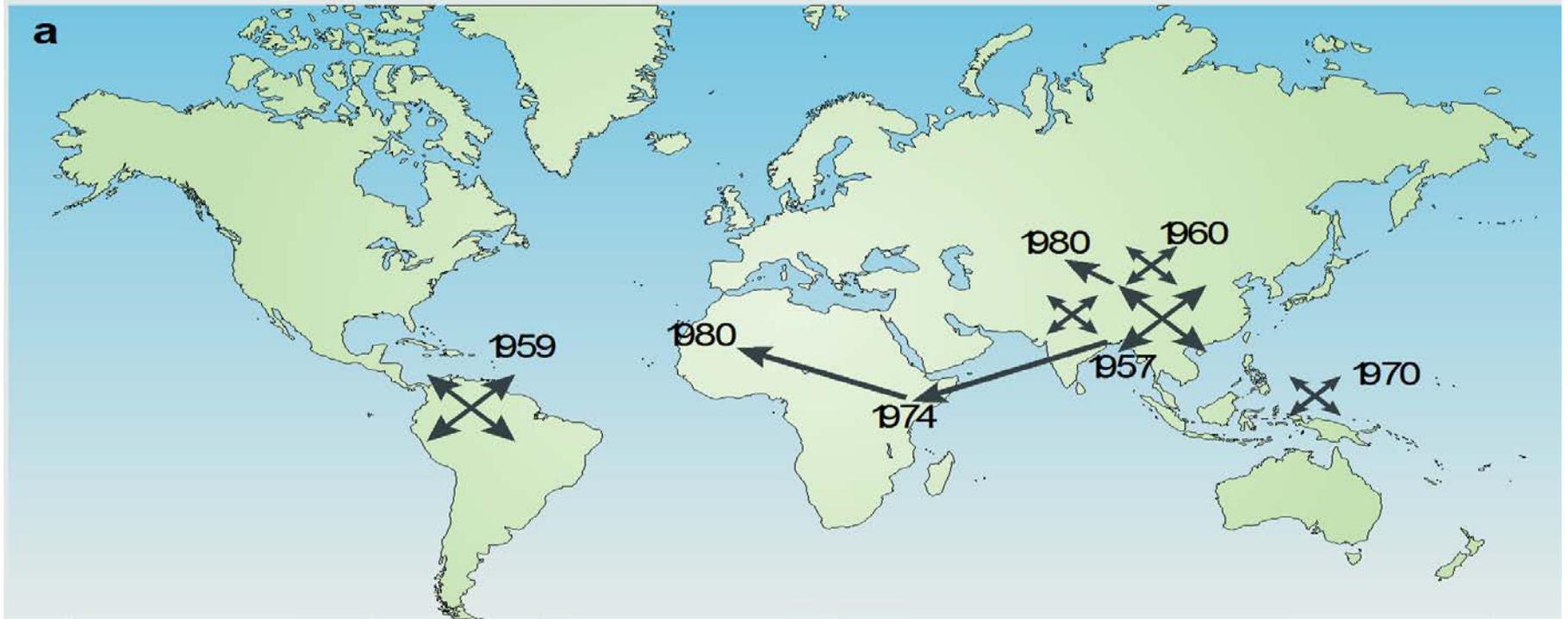
The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: World Health Organization
Map Production: Public Health Information
and Geographic Information Systems (GIS)
World Health Organization

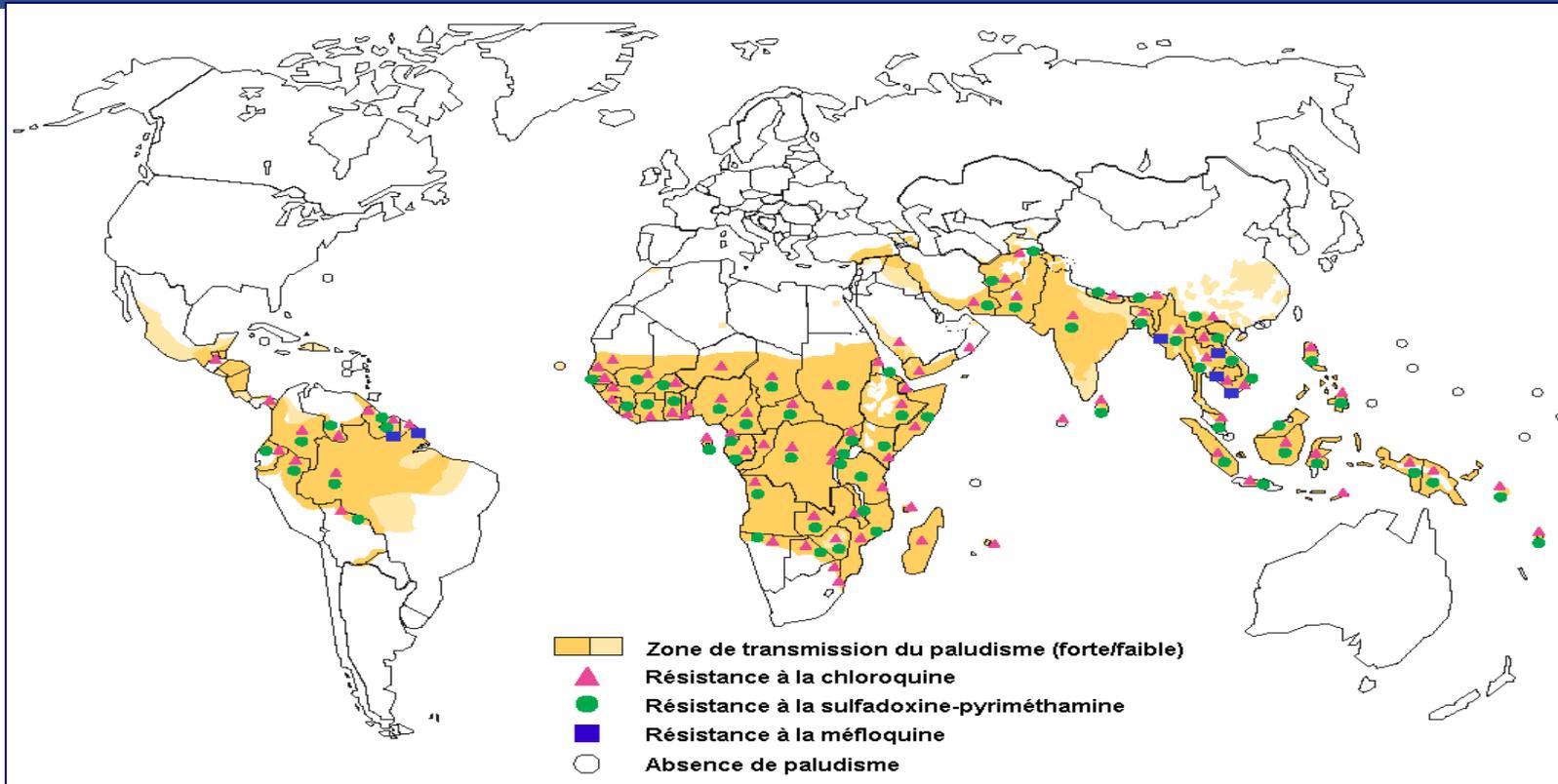


© WHO 2012. All rights reserved.

Historique des résistances (exemple: la chloroquine)



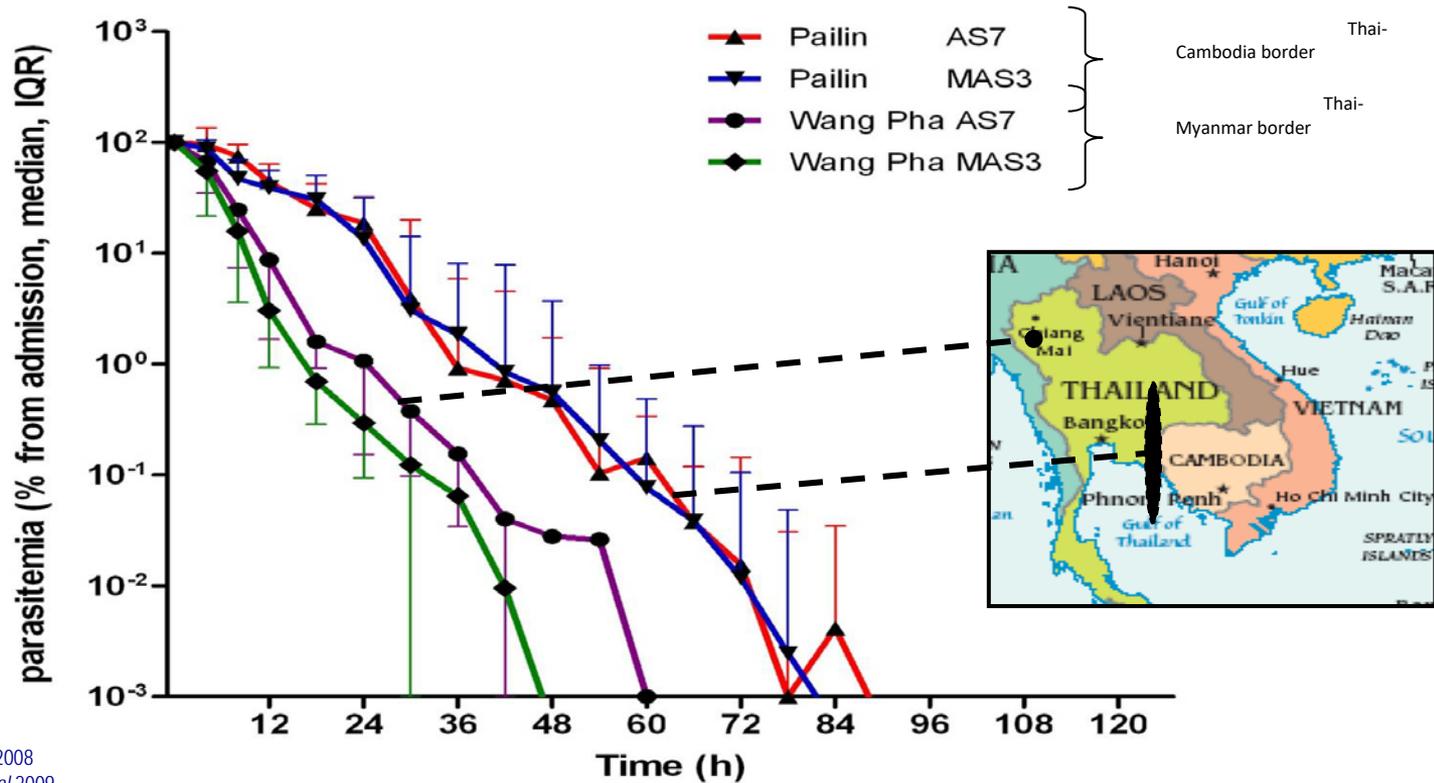
Carte de la résistance aux antipaludiques (2005)



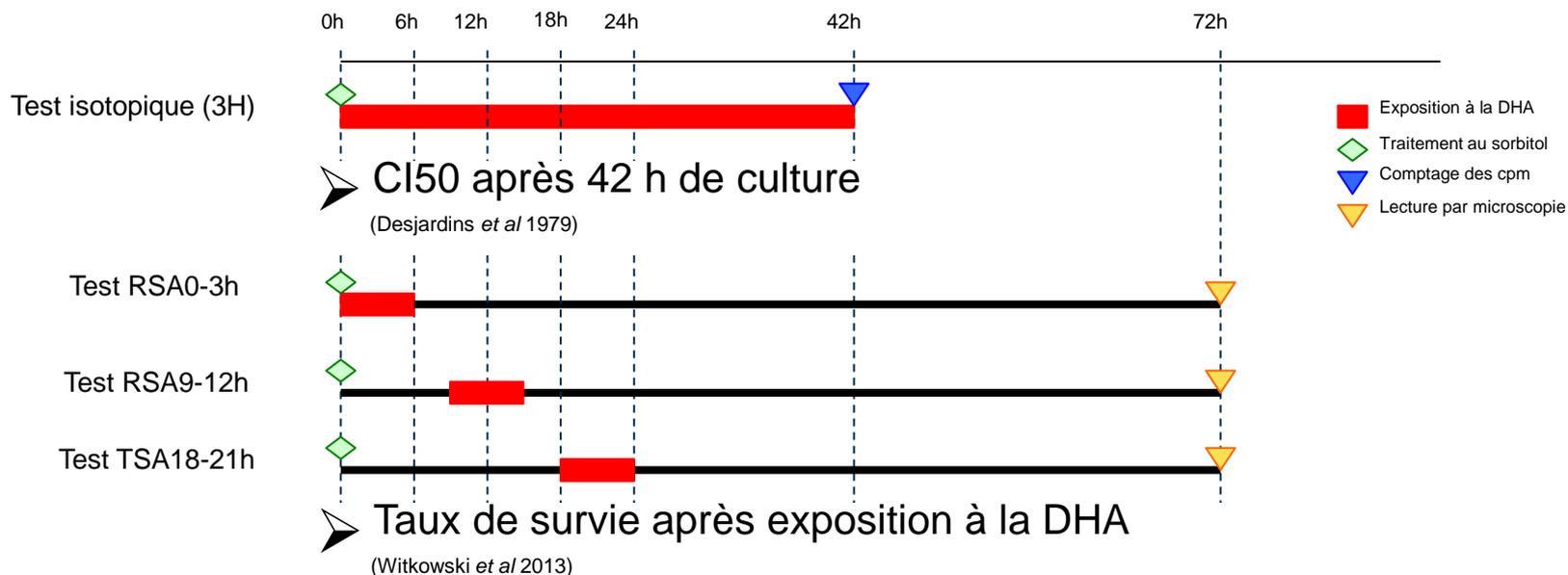
Traitements depuis 2000

- L'OMS recommande l'utilisation des ACT (Artemisinin-based Combination Therapy)
 - Artesunate + mefloquine
 - artemether + lumefantrine
 - artemisinine + piperaquine
 - artemisinine + amodiaquine

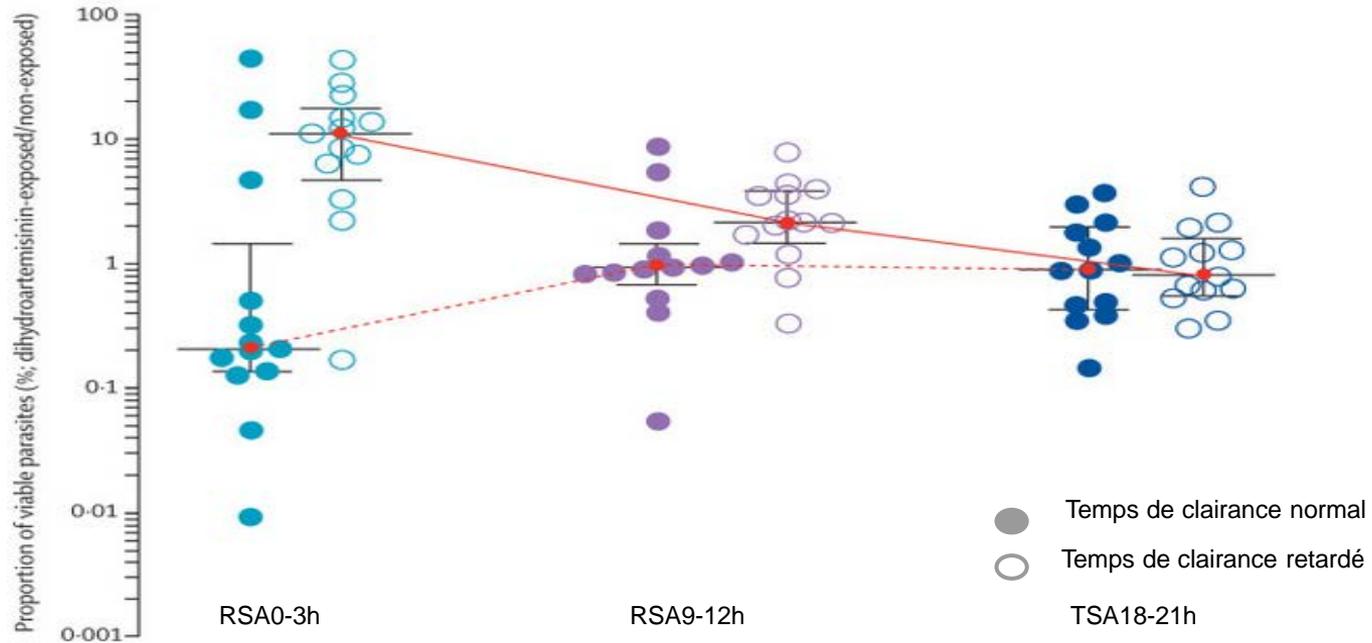
2008 Première description d'échec clinique à l'artésunate



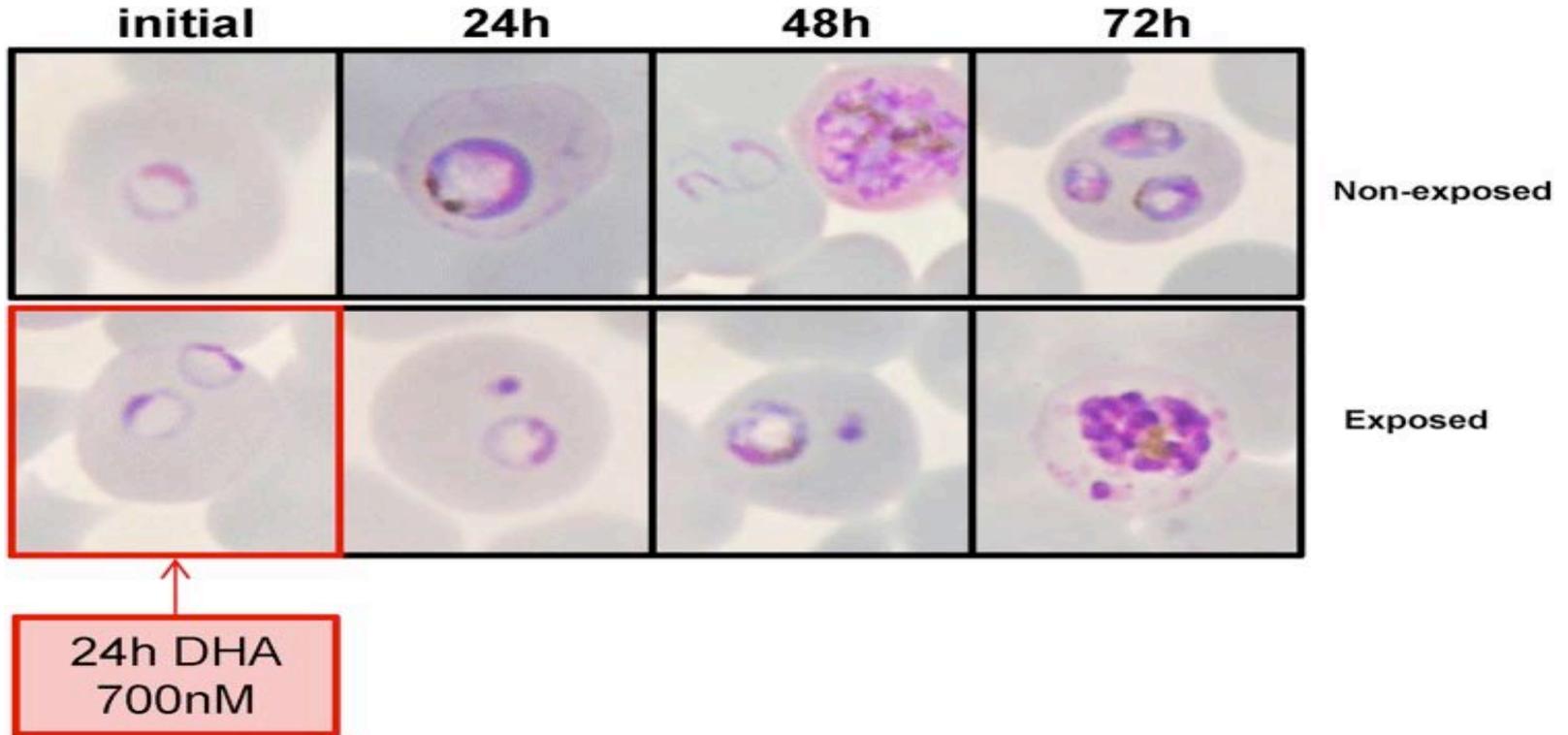
2013 Phénotype *in vitro* de la résistance à l'artémisinine



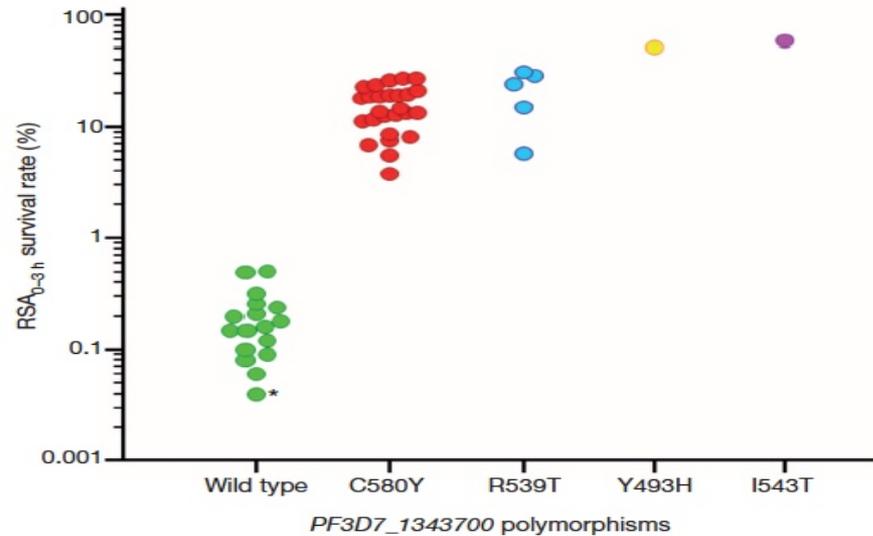
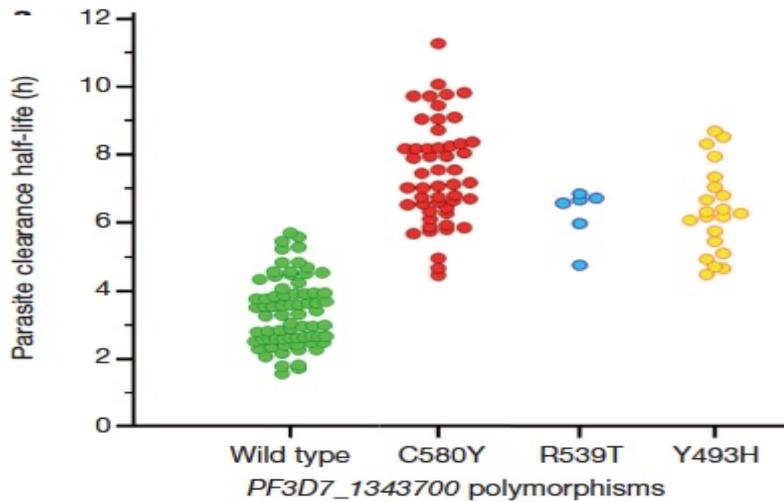
Phénotype *in vitro* de la résistance à l'artémisinine



Phénomène de la dormance



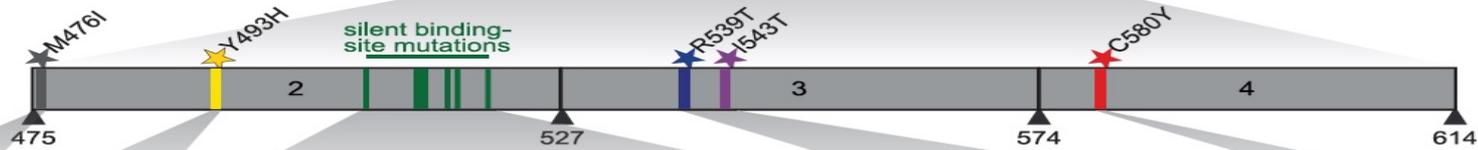
2014 Génotype de la résistance à l'artémisinine K13-Kelch Propeller



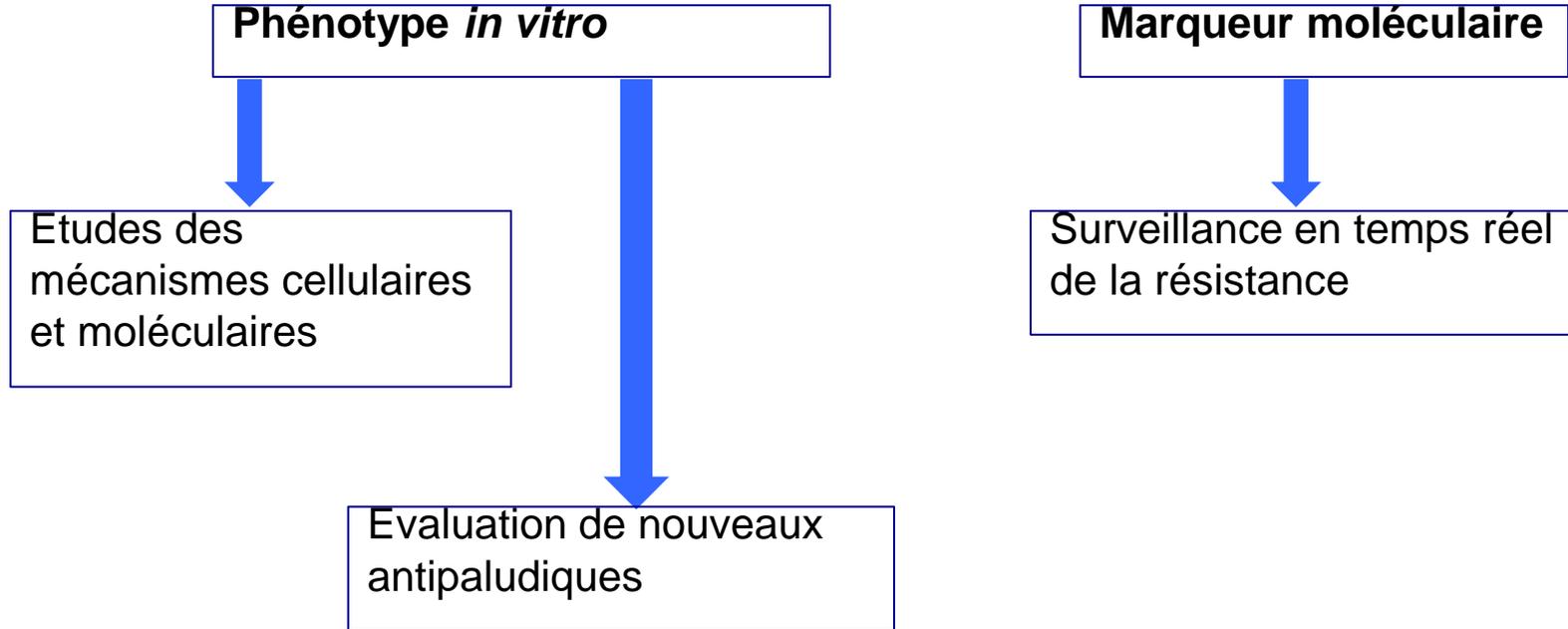
Ariey *et al* 2014



Strainer *et al* 2015



Outils pour détecter les parasites résistant à l'artémisinine



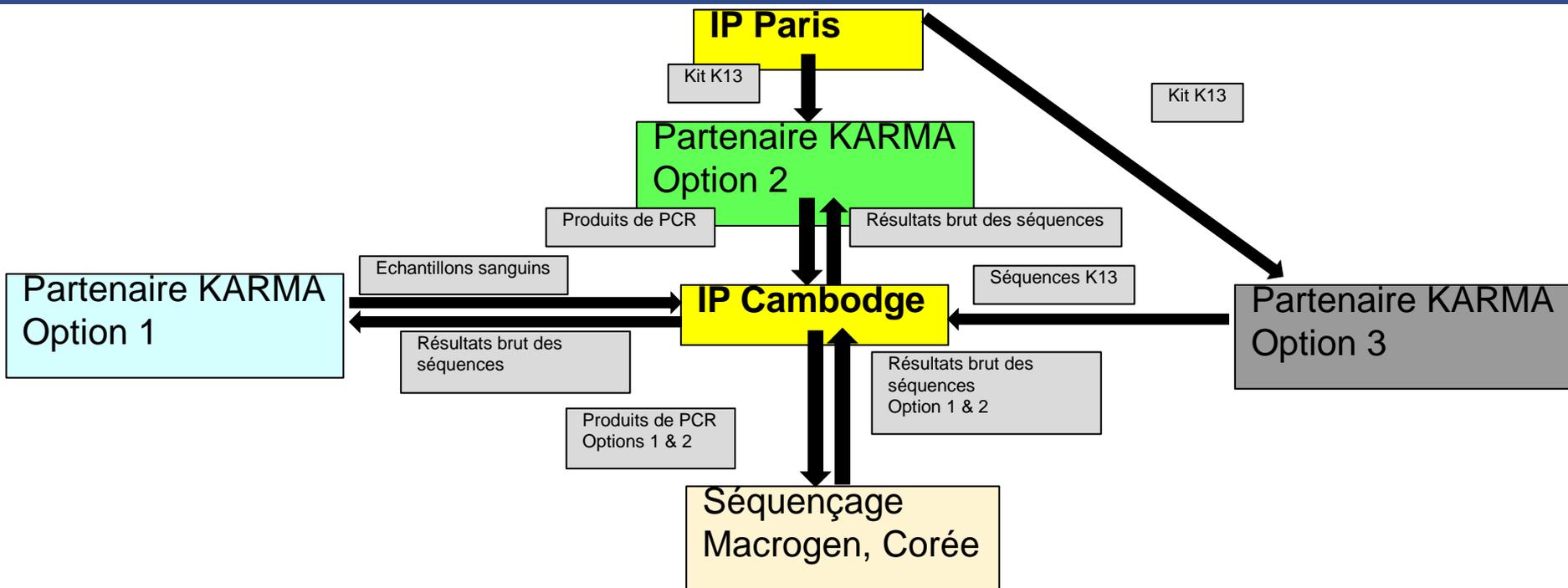
Le projet KARMA (K13 Artemisinin Resistance Multicenter Assessment)

- Objectif de l'étude :
 - Cartographier le polymorphisme de la partie propeller du gène K13
 - Y a-t-il une diffusion de la résistance en Afrique et/ou en Amérique ?
 - Nombre de foyer d'émergence de la résistance ?
- Durée de l'étude : mai à décembre 2014
- Les échantillons ont été recueillis auprès de 41 partenaires
- A partir de sang veineux ou des DBS recueillis entre 2012 et 2013

Le projet KARMA (K13 Artemisinin Resistance Multicenter Assessment)

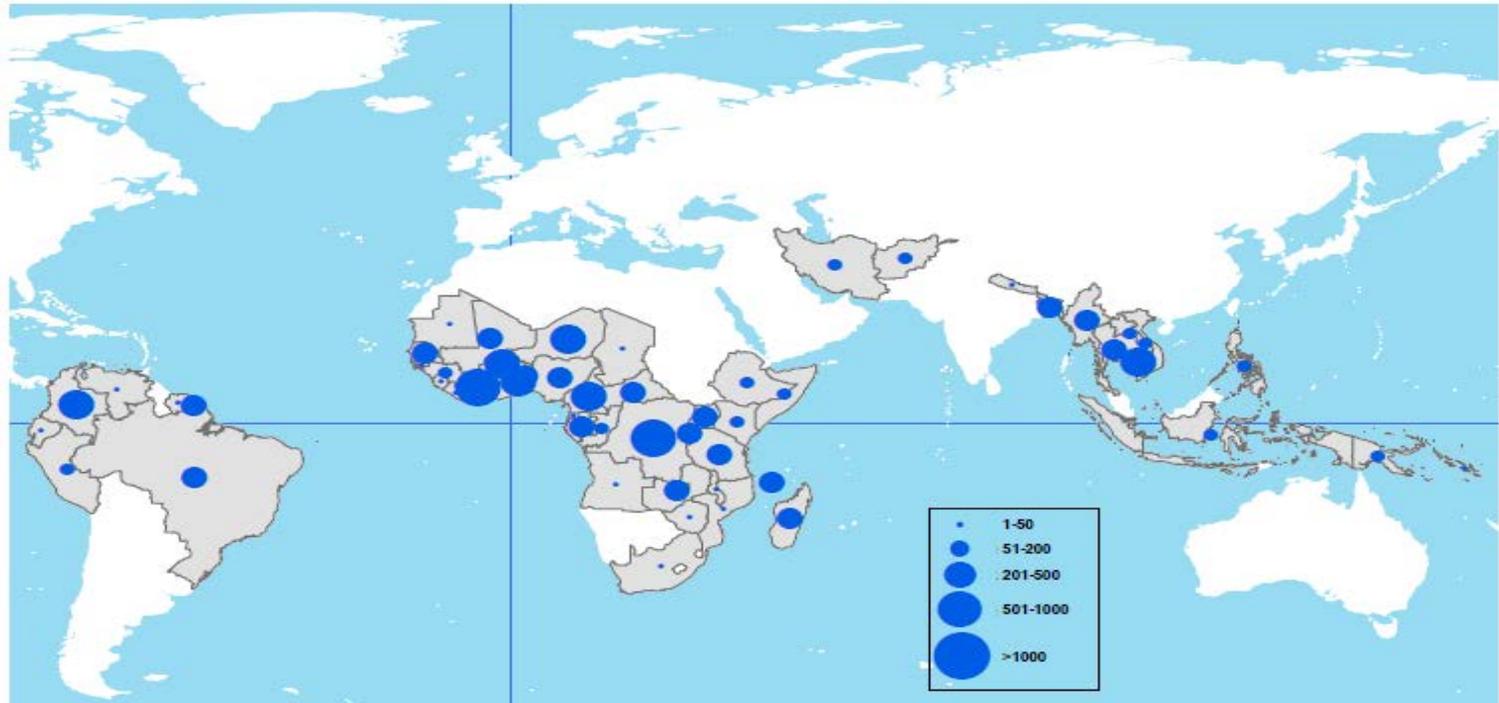
- Porteurs asymptomatiques et symptomatiques et infectés par *P. falciparum*
- Echantillons récoltés sur des sites sentinelles impliqués dans des enquêtes sur la résistance aux antipaludiques et sites effectuant des études d'efficacité thérapeutique
- Trois centres de référence en France et Royaume-Uni, voyageurs revenant en Europe avec un paludisme
- Accord des comités d'éthiques

Organisation du projet KARMA



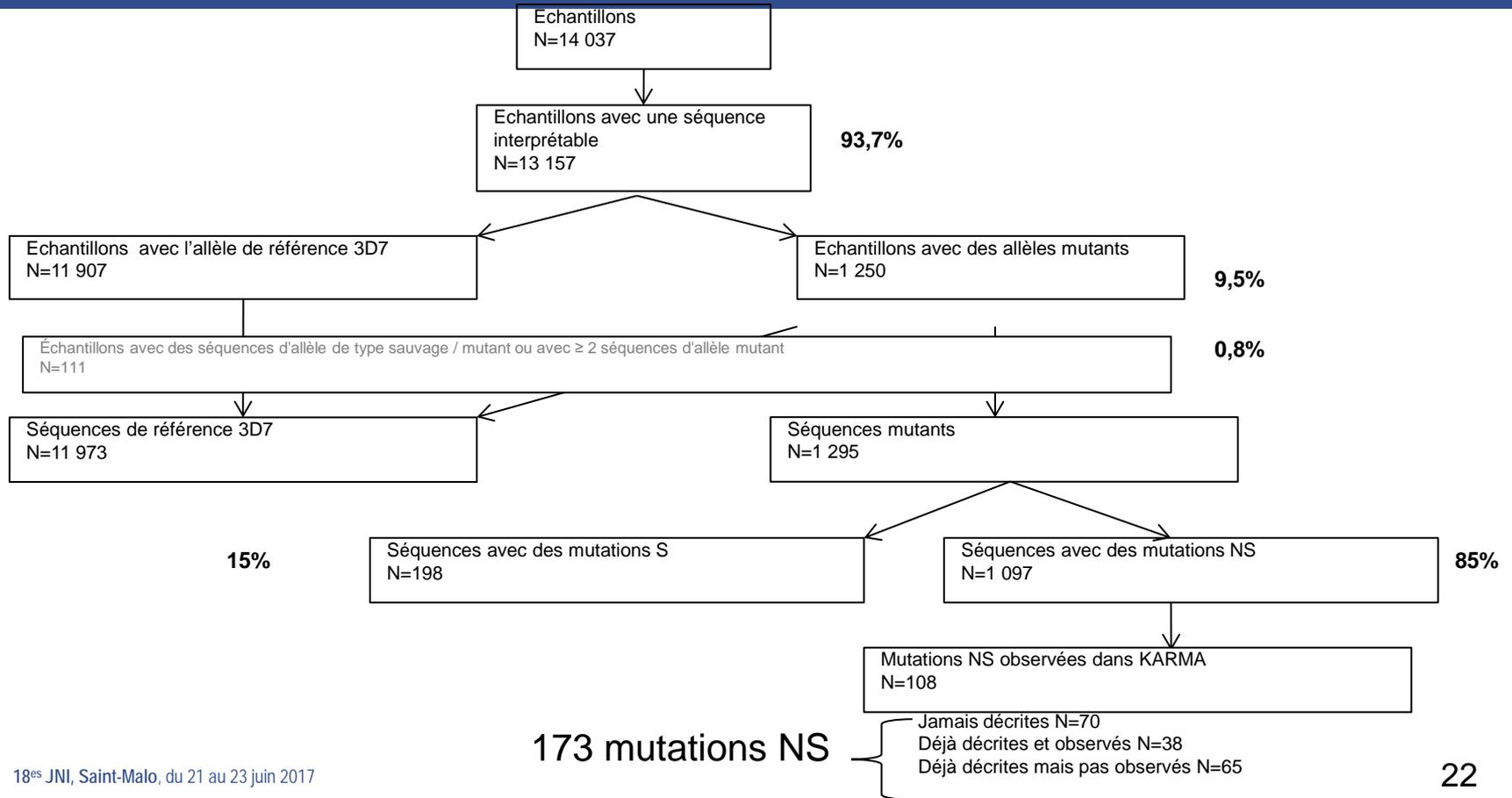
- kit K13 : Les contrôles qualités, protocoles et réactifs ont été fournis par l'IP Paris
- Amplification du domaine K13 (codons 440 – 780, 720pb)
- Les séquences ont été analysés sur les deux brins en utilisant la séquence K13 de la souche 3D7 (PF3D7_1343700) comme référence

Echantillonnage



- 14 037 échantillons de 59 pays (163 sites)
- 11 854 (84,5%) d'échantillons de patients symptomatiques, 2450 (17,5%) issus d'études sur l'efficacité thérapeutique
- 951 (6,8%) échantillons de voyageurs

Polymorphisme de la séquence K13-propeller

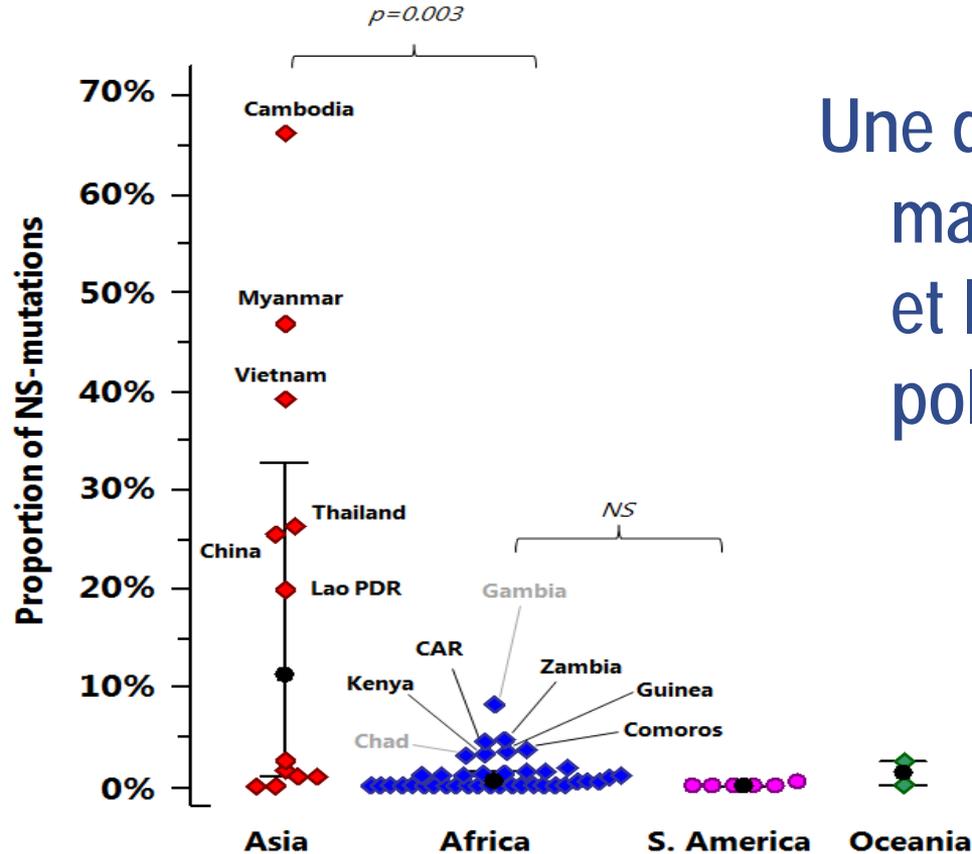


Polymorphisme de la séquence K13-propeller

NS mutation	No. samples		continent				country (No. samples)
	Total (%)						
		Africa	Asia	Oceania	South America		
C580Y	602 (54.9%)	-	602	-	-	Cambodia (515)/ Vietnam (34)/ Thailand (33)/ Lao PDR (17)/ Myanmar (3)	
F446I	154 (14.0%)	-	154	-	-	Myanmar (116)/ China (38)	
R539T	43 (3.9%)	-	43	-	-	Cambodia (35)/ Lao PDR (6)/ Myanmar (2)	
A578S	42 (3.8%)	41	1	-	-	Thailand (1)/ Benin (1)/ Burkina Faso (1)/ Cameroon (4)/ CAR (1)/ Chad (1)/ Comoros (7)/ Congo DR (3)/ Guinea (2)/ Ivory Coast (3)/ Kenya (5)/ Mali (1)/ Niger (4)/ Togo (4)/ Uganda (3)/ Zambia (1)	
Y493H	32 (2.9%)	-	32	-	-	Cambodia (24)/ Vietnam (8)	
P574L	23 (2.1%)	-	23	-	-	Myanmar (10)/ Thailand (9)/ China (4)	
P553L	21 (1.9%)	-	21	-	-	China (3)/ Myanmar (3)/ Cambodia (2)/ Thailand (1)/ Vietnam (12)	
N458Y	16 (1.5%)	-	16	-	-	Myanmar (8)/ Thailand (8)	
R561H	14 (1.3%)	1	13	-	-	Myanmar (13)/ Congo DR (1)	

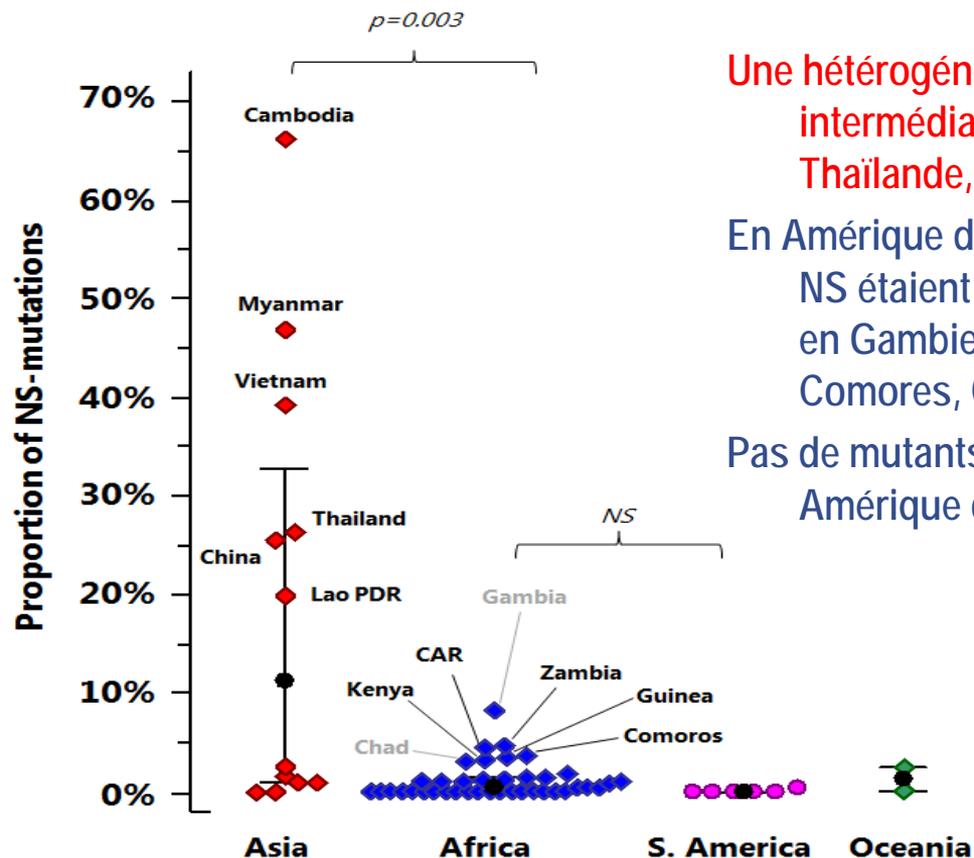
- 9 mutations NS ont une fréquence > 1%
 - 2 allèles ont été observés en Afrique (A578S et R561H)
- 72 allèles ont été observés une fois

Distribution par continent et proportion des mutations NS de k13-propeller



Une disparité géographique marquée dans la proportion et la distribution des polymorphismes de K13

Distribution par continent et proportion des mutations NS de k13-propeller

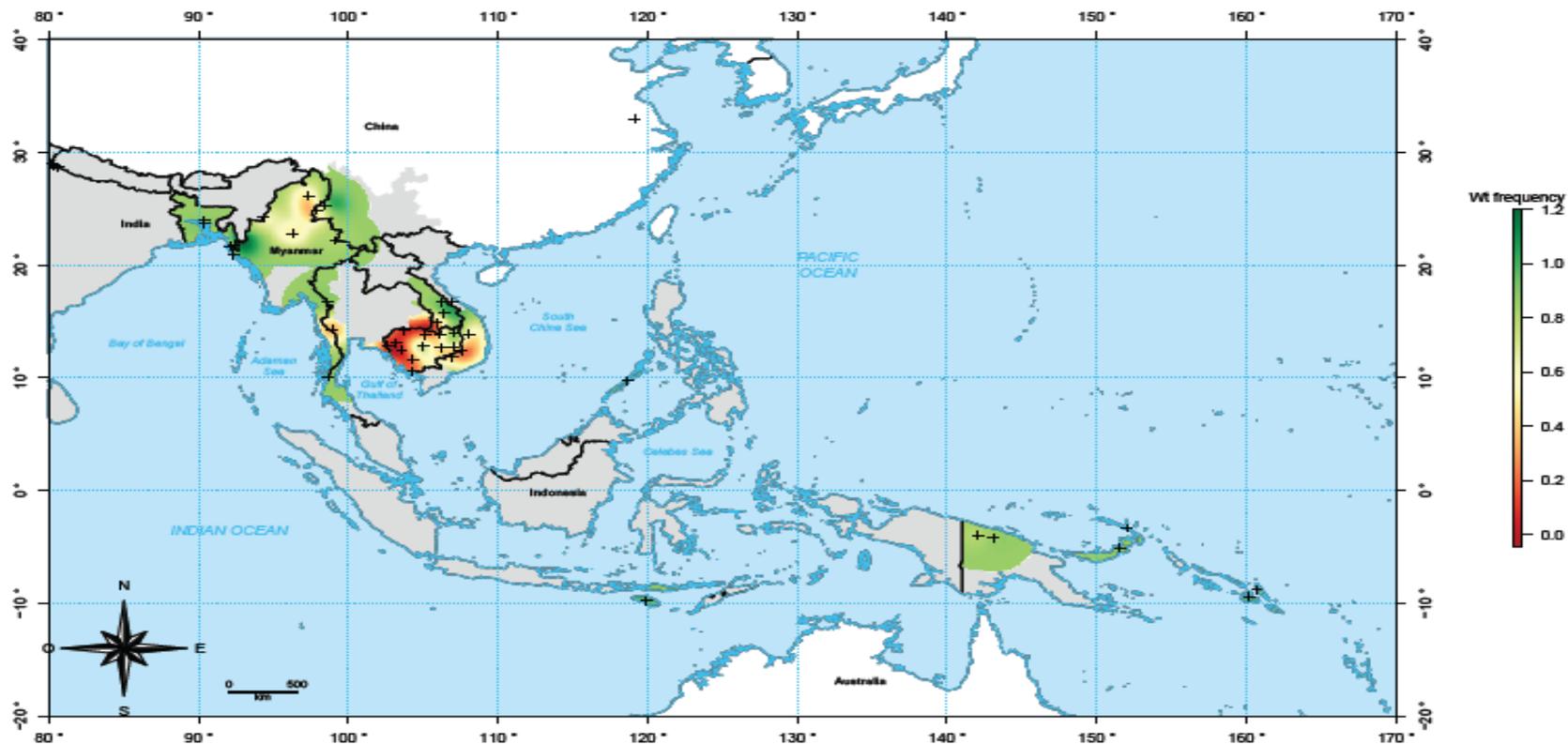


Une hétérogénéité en Asie : Fixé et très élevé au Cambodge, intermédiaire au Myanmar et Vietnam, modéré en Thaïlande, Chine et RDP Laos, faible à nulle ailleurs

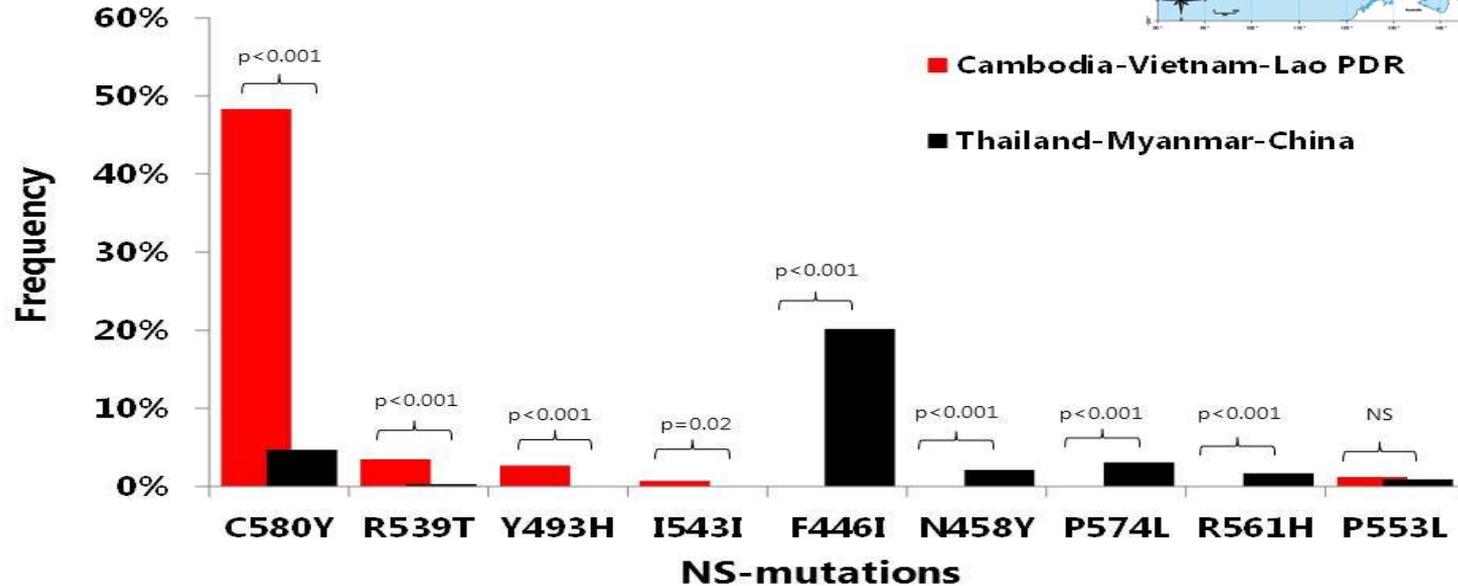
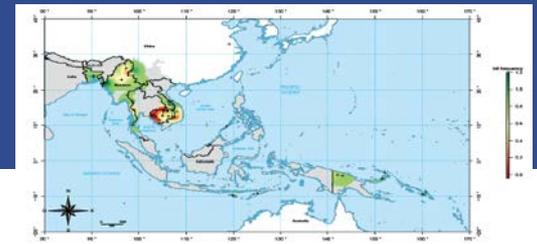
En Amérique du Sud, en Océanie et en Afrique, les mutants NS étaient rares, à l'exception de 7 pays africains (> 3% en Gambie, République Centrafricaine, Zambie, Comores, Guinée, Kenya et Tchad).

Pas de mutants NS dans 27 pays (19 en Afrique, 5 en Amérique du Sud, 2 en Asie 1 en Océanie)

Cartographie des isolats résistants en Asie

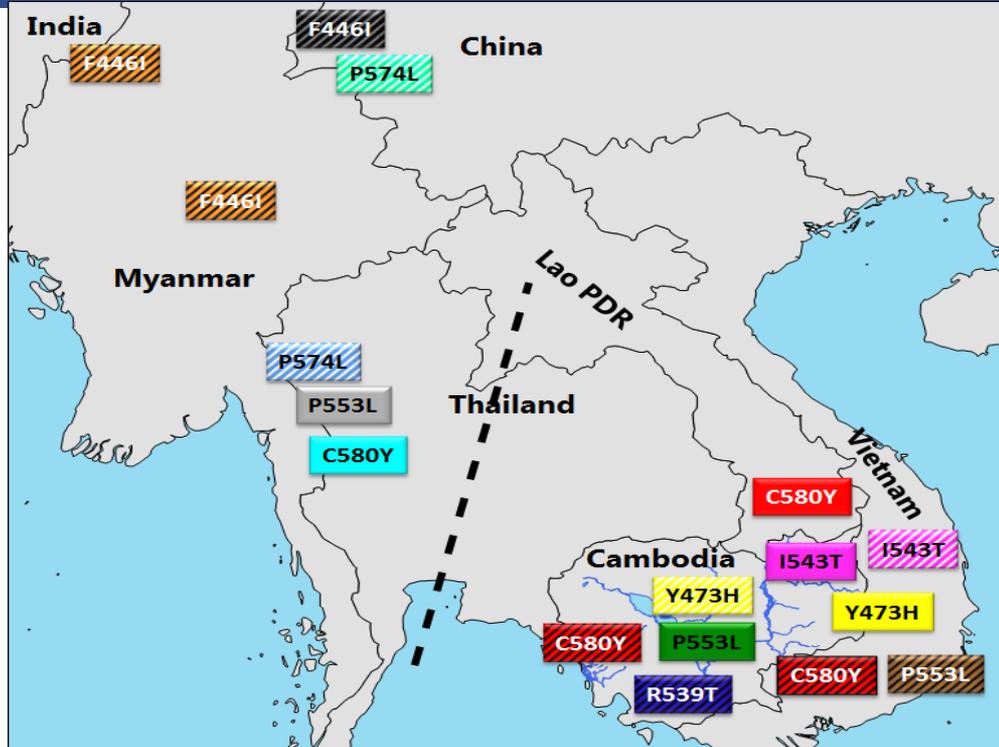


Répartition des mutations en Asie



- Deux régions ont été identifiées : **Cambodge-Vietnam-RDP Laos** où les mutations **C580Y**, **R539T**, **Y493H** et **I543T** sont fréquentes ou spécifiques et **Thaïlande-Chine-Myanmar** où les mutations **F446L**, **N458Y**, **P574L** et **R561H** sont spécifiques

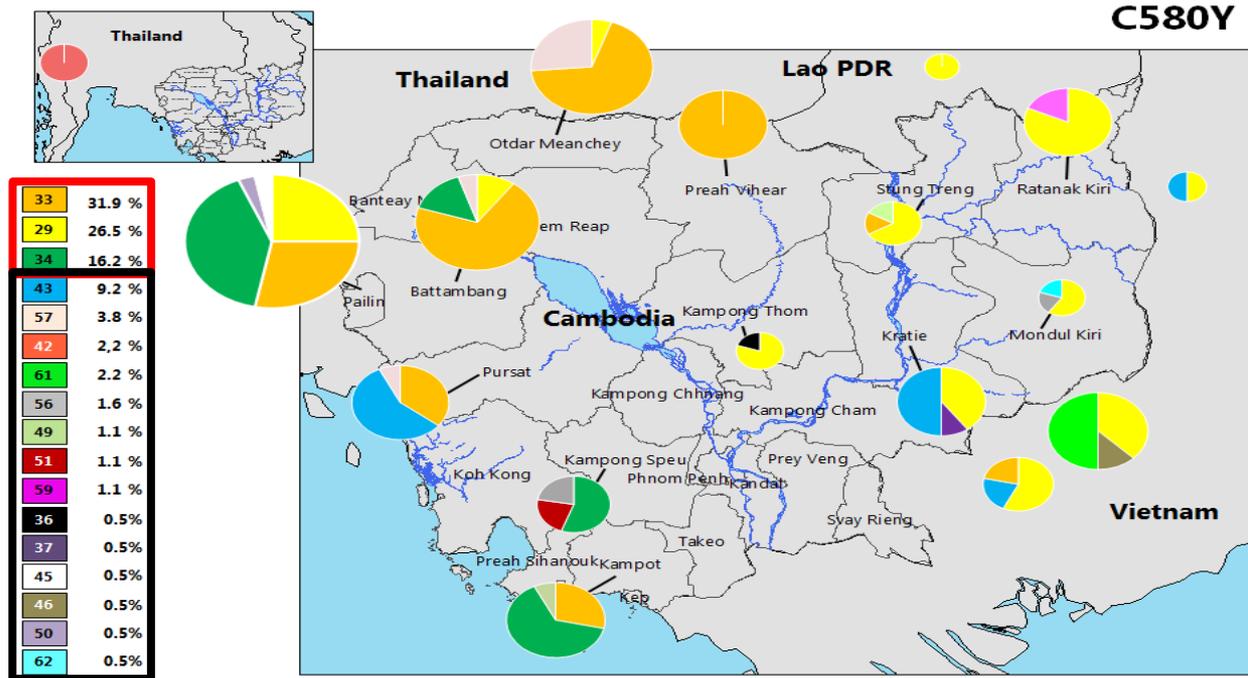
Répartition des mutations en Asie



• Pas de diffusion de souches entre les deux foyers d'émergence de la résistance

Plusieurs émergences ou dissémination ?

Relation génétique entre les isolats hébergeant la mutation C580Y



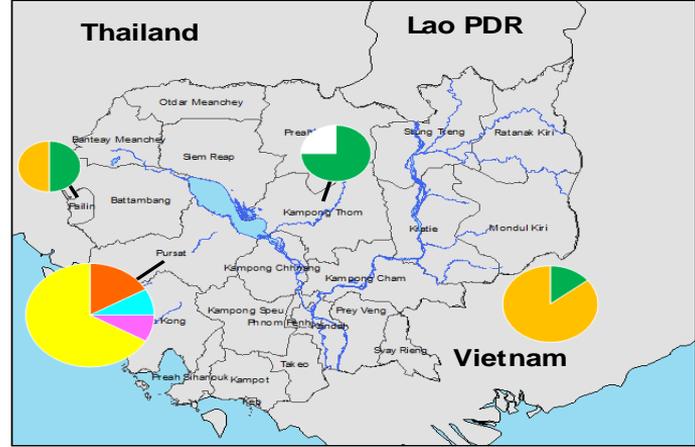
Nombreux événements d'émergence et diffusion de quelques mutants de résistance à l'artémisinine

3 haplotypes communs répartis entre le Cambodge, le Vietnam et la RPD du Laos et 14 dans des régions spécifiques du Cambodge, de la Thaïlande ou du Vietnam.

Plusieurs émergences ou dissémination ?

Relation génétique entre les isolats hébergeant les mutations Y493H, I543T et R539T

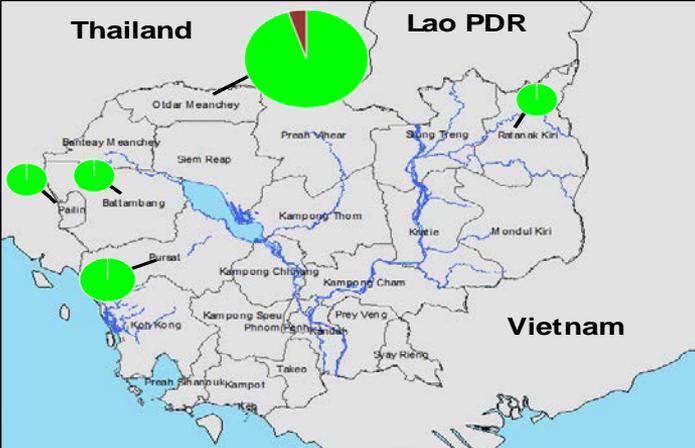
Y493H



I543T



R539T

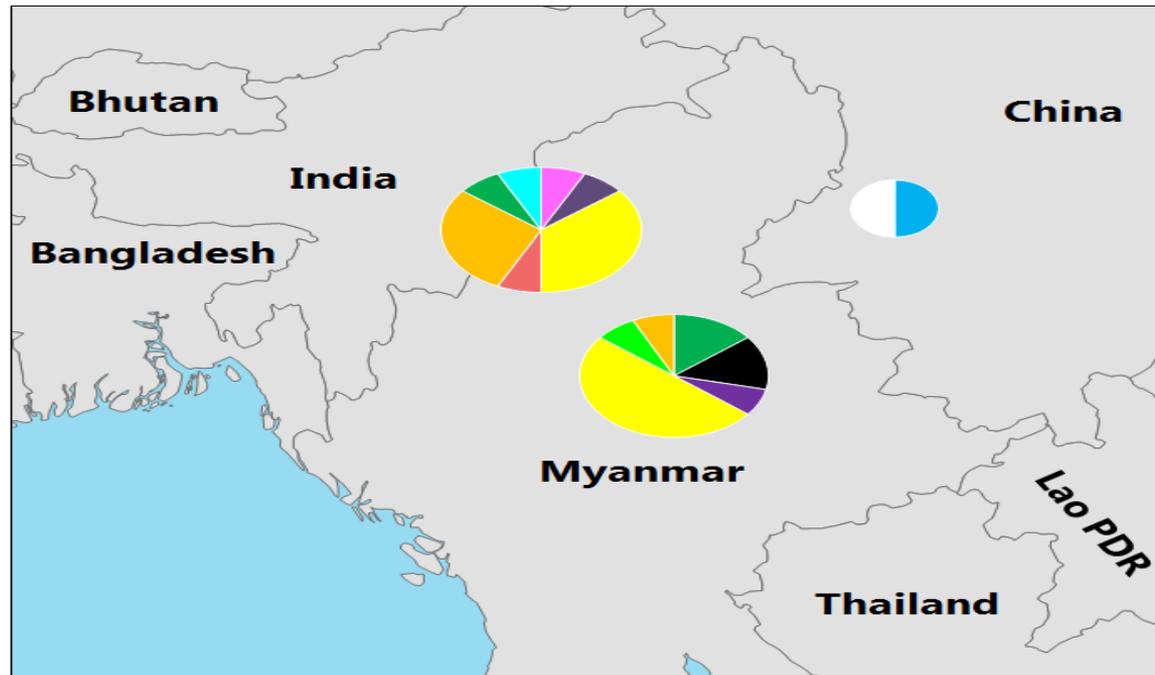


- Plusieurs évènements d'émergence
- Diffusion probable de l'Ouest vers l'Est pour les mutants Y493H et R539T
- Diffusion probable du Vietnam vers l'Est du Cambodge pour le mutant I543T

Plusieurs émergences ou dissémination ?

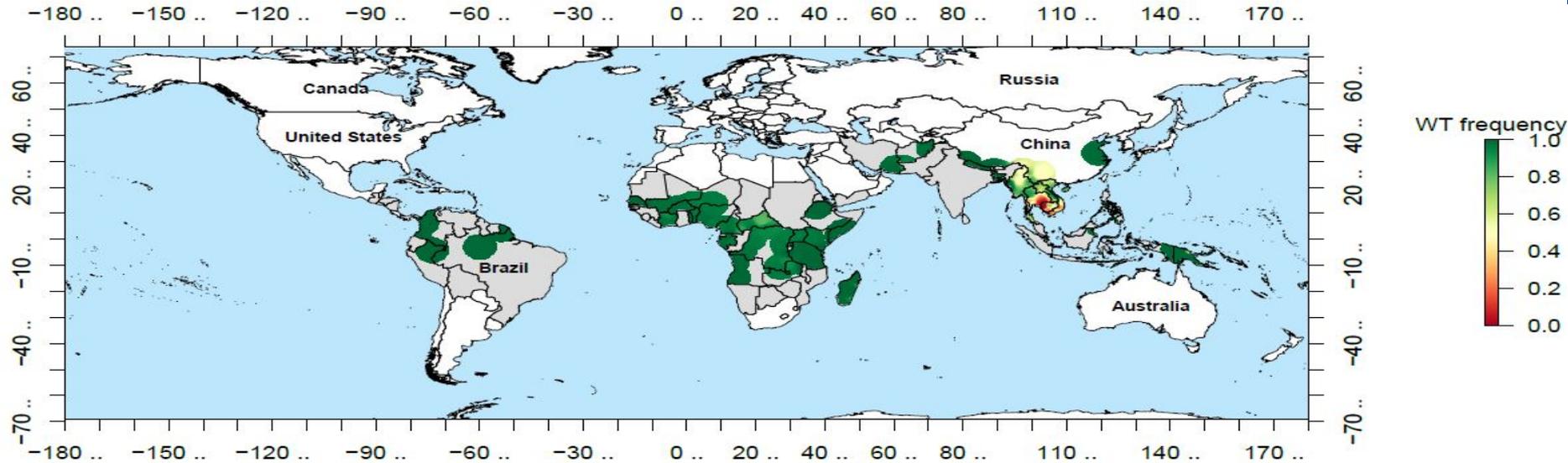
Relation génétique entre les isolats hébergeant la mutations F446I

73	40.0 %
77	16.7 %
71	10.0 %
27	9.2 %
69	6.7 %
80	6.7 %
19	2.2 %
75	1.1 %
32	0.5 %
72	0.5 %
79	0.5 %



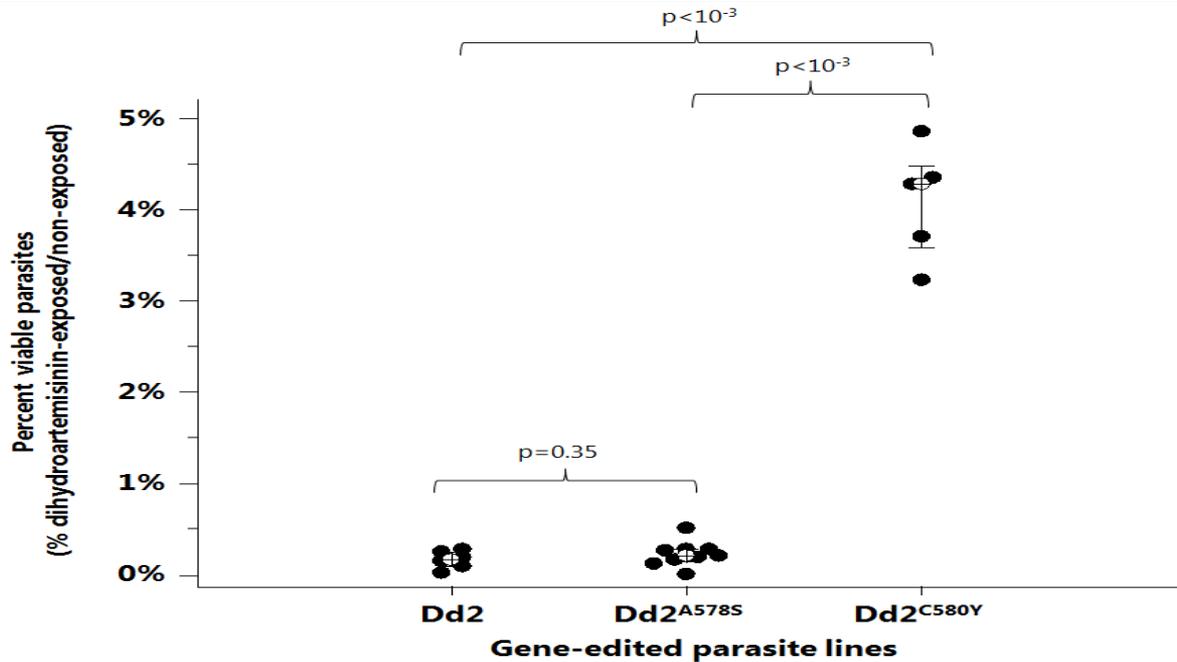
- **Les 3 haplotypes majoritaires** sont répartis sur l'ensemble du Myanmar
- **8 haplotypes** sont spécifiques de Chine ou au Myanmar

Distribution des mutants dans le reste du monde



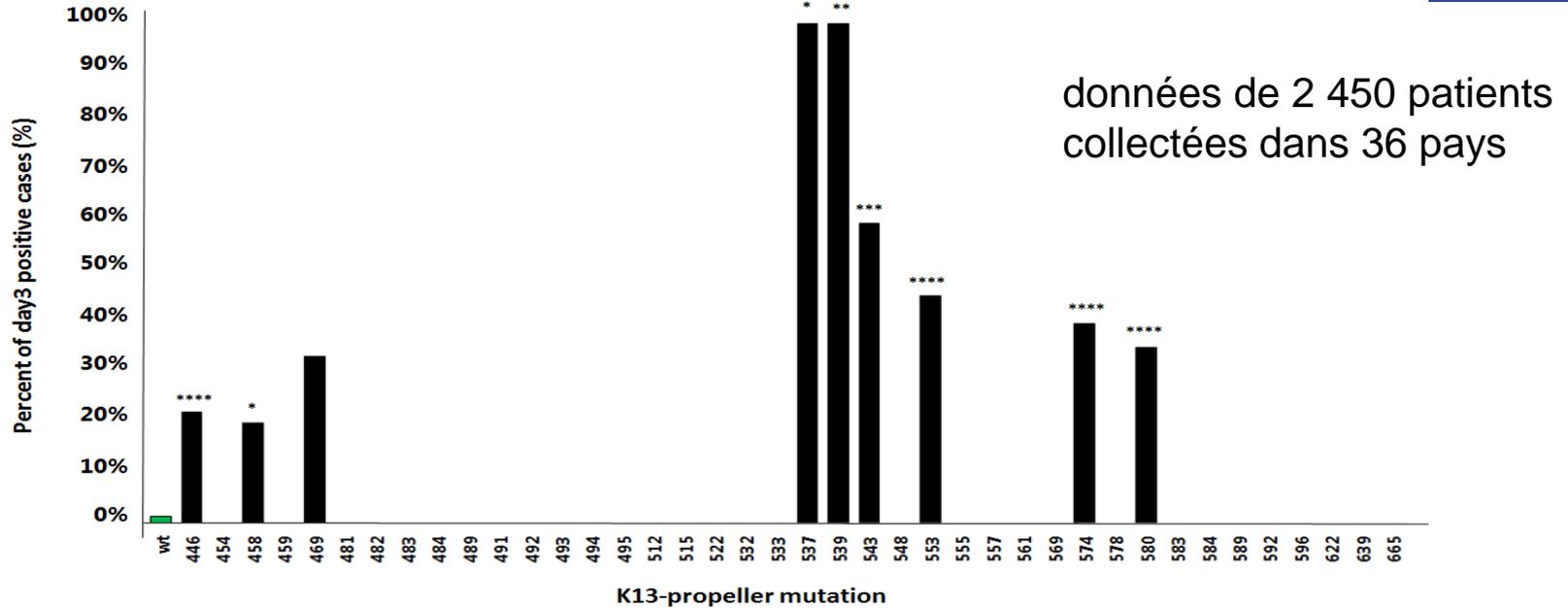
- Absence de mutant en Amérique du Sud et en Océanie
- Afrique : Pas de présence de mutants Asiatique résistant à l'artémisinine (9 542 séquences analysées), 150 allèles distinct (92% présent chez 1 ou 2 isolats)

Impact de la Mutation A578S sur la résistance ?



- Introduction de la mutation A578S dans la souche Dd2
- Introduction de la mutation C580Y dans la souche Dd2 (contrôle positif)
- Dd2^{A578S} sensible et Dd2^{C580Y} résistante au RSA^{0-3h}
- La mutation **A578S** n'a pas d'impact sur la résistance à l'artémisinine

Association entre les mutations NS de K13 et les échecs cliniques

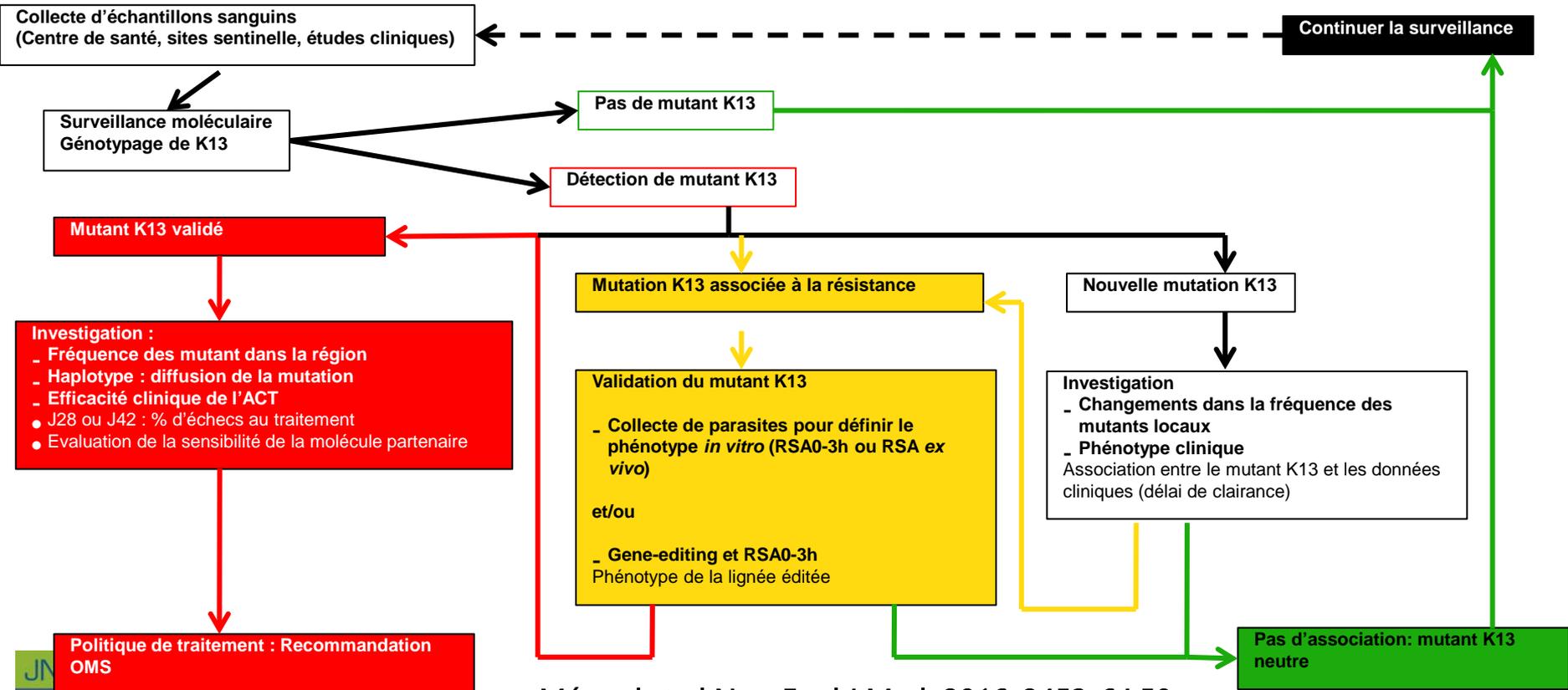


- 8 mutations NS présentes en Asie du Sud Est et en Chine sont associées à des patients positifs à J3 (F446I, N458Y, N537D, R539T, I543T, P553L, P574L et C580Y)
- Pas de parasites circulant dans le sang des patients à J3 en Afrique (1 533 patients dans 25 pays)
- 9 patients Africains ayant l'allèle A578S à J0 -> clairance parasitaire à J3

Conclusions

- La **résistance** à l'artémisinine est **confinée à l'Asie du Sud Est et la Chine** (2 foyers principaux d'émergence)
- Amérique du Sud, Océanie, Philippine et l'Asie central/sud n'ont **pas de parasites mutant NS**
- En Afrique: fréquence **faible** de mutants **NS Pas d'association** entre les parasites mutants et **des échecs cliniques, Pas d'invasion d'isolats asiatiques de *P. falciparum* résistant à l'artémisinine**
- **Tous les mutants K13 ne sont pas associés à la résistance** (seul 13 mutations sont validées et les nouveaux allèles doivent être validés)
- **La surveillance de K13** peut assister les futures études de surveillance de la résistance aux dérivés de artémisine

Comment organiser la surveillance de la résistance à l'artémisinine



Ménard et al New Engl J Med 2016, 2453-64:50



Remerciements

- **Institut Pasteur**
 - Frédéric Arieu
 - Johann Beghain
 - Jean-Christophe Barale
 - Odile Mercereau-Puijalon
- **Université de Columbia, NY**
 - David A Fidock
- **Institut Pasteur du Cambodge**
 - Didier Ménard
 - Nimol Khim
 - Benoit Witkowski
- **OMS**
 - Pascal Ringwald
- **Consortium Karma**

Merci

