

LA SCIENCE NUCLÉAIRE CONTRE LE PALUDISME

LE RÔLE CIBLÉ DES TECHNIQUES RADIOLOGIQUES ET MOLÉCULAIRES

STEFFEN GROTH, BALDIP KHAN,
ALAN ROBINSON ET JORGE HENDRICHS

Le paludisme est la principale maladie transmise par les insectes. On recense dans le monde, chaque année, 300 à 500 millions de cas cliniques de paludisme qui entraînent chaque année deux millions de décès (un toutes les 30 secondes), dont plus de 90 % surviennent en Afrique subsaharienne. Plus de 90 % des personnes touchées sont des enfants de moins de cinq ans. L'impact économique de cette maladie est ressenti de manière disproportionnée par les familles pauvres, qui dépendent parfois un quart de leur revenu annuel pour la prévenir et la combattre. Les agents causaux sont des parasites de type *Plasmodium*, qui ne sont transmis que par les moustiques femelles du type *anophèle*.

La lutte contre le paludisme consiste notamment à surveiller l'efficacité des antipaludiques en observant les niveaux de pharmacorésistance et à réduire les populations de moustiques. Dans cette lutte, les techniques nucléaires peuvent jouer un rôle important. Le présent article décrit les activités de l'AIEA liées au paludisme pharmacorésistant et les avantages que présentent, dans le diagnostic de résistance, les méthodes moléculaires utilisant des isotopes radioactifs. Il présente en outre le programme de recherche envisagé par l'AIEA pour étudier la possibilité de développer, comme méthode complémentaire de

lutte contre le vecteur du paludisme, la technique de l'insecte stérile.

DÉTECTION DU PALUDISME PHARMACORÉSISTANT

Le traitement du paludisme par les médicaments est la clé du traitement des patients et le demeurera probablement longtemps. Dans certaines régions, les parasites ont développé une pharmacorésistance. Ainsi, l'antipaludique peu onéreux qu'est la chloroquine n'agit plus sur de nombreuses sous-espèces du parasite. Cette résistance est le résultat d'évolutions de la membrane du parasite qui fait que lorsqu'elle est exposée à la chloroquine, elle rejette constamment cette substance.

Les patients de ces régions doivent être traités par d'autres médicaments plus onéreux. Comme de nouvelles variétés de parasites évoluent constamment et acquièrent une résistance accrue aux médicaments actuels, une surveillance systématique du développement de résistances est essentielle à tout programme antipaludique. Des données préliminaires en provenance du Kenya indiquent que dans certaines régions, la

résistance – même à des médicaments plus récents – atteint 30 %.

Les méthodes moléculaires facilitent grandement le diagnostic du paludisme pharmacorésistant. L'amplification génique est une méthode moléculaire qui peut être utilisée pour montrer qu'une pharmacorésistance s'est développée. L'utilisation d'isotopes dans la méthode d'hybridation dot blot, associée à l'amplification génique, accroît la sensibilité et la spécificité de la détection de la pharmacorésistance (*voir encadré page 34*).

Ces méthodes moléculaires peuvent démontrer la résistance à certains antipaludiques en quelques heures contre parfois 28 jours – et avec d'importantes équipes de terrain – pour les méthodes traditionnelles.

Transfert de méthodes moléculaires vers les États Membres. Un projet triennal de coopération technique a récemment introduit au Kenya, au Mali, au Soudan, en Tanzanie, en Zambie, au Zimbabwe et en Ouganda des techniques nucléaires permettant de détecter les mutations du parasite et les pharmacorésistances associées.

M. Groth dirige la Division de la santé humaine de l'AIEA, dont Mme Khan est fonctionnaire. M. Robinson dirige l'Unité de l'entomologie aux Laboratoires de l'AIEA à Seibersdorf, et M. Hendrichs dirige la Section de la lutte contre les ravageurs à la Division mixte FAO/AIEA des techniques nucléaires dans l'alimentation et l'agriculture.

MÉTHODES MOLÉCULAIRES DE LUTTE CONTRE LE PALUDISME

L'amplification génique. Le principe de l'application diagnostique de cette méthode est qu'en présence d'un fragment d'ADN donné, celui-ci est multiplié, par exemple, un million de fois par la réaction, produisant tellement de substance qu'il peut être détecté facilement. On commence par chauffer le fragment d'ADN pour le diviser en deux brins. On ajoute ensuite une enzyme appelée ADN polymérase, qui copie l'ADN pour créer deux copies complètes du fragment initial. En répétant ce processus, on peut produire rapidement des millions de copies du fragment initial d'ADN. Des sondes d'acide nucléique radiomarqué, qui s'attachent aux fragments d'ADN, peuvent alors être utilisées pour identifier le fragment d'ADN. Cette méthode très sensible et précise n'exige qu'un petit échantillon sérologique.

Hybridation dot blot à base d'amplification génique. Cette méthode peut être utilisée pour caractériser les mutations d'ADN du parasite. L'ADN est extrait de sang infecté déposé sur papier-filtre et amplifié. L'ADN "tache" directement la membrane nylon. Pour visualiser les résultats, on utilise l'hybridation – à l'aide de sondes d'ADN radiomarquées – et l'autoradiographie – par exposition du film radio. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'analyser simultanément les taches produites par de nombreux échantillons. Un autre avantage est que l'on peut retirer la sonde radioactive et en introduire une nouvelle pour détecter une autre mutation. On peut ainsi détecter successivement plusieurs mutations. Cette méthode permet de détecter, dans des échantillons dont nombre comportent des parasites à la fois résistants et sensibles, une population résistante minoritaire.

Ce projet a également soutenu l'élaboration et l'exécution de programmes de surveillance de la pharmacorésistance nécessaires à une prise en charge efficace du paludisme. Dans le cadre de ce projet, 10 000 patients ont été traités, 3 000 d'entre eux ont participé à des études et l'on a analysé 1 500 échantillons sérologiques recueillis sur papier-filtre par piqûre du doigt. L'analyse a montré qu'il existait une relation indéniable entre la prévalence des mutations du parasite et la résistance de ce dernier au Fansidar et à la chloroquine.

Les résultats ont montré que la fréquence de mutation était très faible dans les pays (Mali et Soudan) où la résistance au

Fansidar est faible (2,5 %). En ce qui concerne la chloroquine, une fréquence élevée de la mutation et une résistance parallèlement élevée ont été observées au Kenya, au Mali et en Tanzanie.

Résultats concrets sur le terrain. Au Mali, des tests de la chloroquine et du Fansidar ont été menés pendant une épidémie de paludisme. En l'absence d'installations d'analyse microscopique, un dosage rapide a été réalisé à l'aide d'échantillons sérologiques recueillis sur papier-filtre par piqûre du doigt. En quelques jours (contre 28 jours pour le test traditionnel), les résultats ont fait apparaître des mutations résistantes à la chloroquine dans 75 % des échantillons,

mais aucune résistance au Fansidar. Ce dernier a donc été utilisé et s'est révélé très efficace pour combattre l'épidémie.

Grâce à ces activités, on dispose maintenant d'un outil rapide et fiable de surveillance à grande échelle de la résistance à la chloroquine – ce qui n'était pas possible auparavant en raison du coût élevé en temps, en argent et en personnel des études cliniques nécessaires. On va pouvoir échantillonner des populations plus importantes, ce qui fournira aux administrateurs de programmes antipaludiques des informations dont ils ne disposaient pas auparavant.

Développer l'assistance.

Outre le transfert de technologie vers l'Afrique, le programme a noué des liens avec d'autres programmes antipaludiques internationaux et régionaux, dont le programme "Faire reculer le paludisme" de l'OMS, l'Initiative antipaludique multilatérale et le Réseau est-africain de surveillance des traitements antipaludiques.

Dans ce contexte, le correspondant de l'AIEA en Tanzanie a été chargé de génotyper des échantillons de paludisme de neuf pays africains associés à un projet multicentres. Ce projet étudie l'efficacité d'une polychimiothérapie antipaludique soutenue par le Groupe spécial de l'OMS sur la résistance aux antipaludiques et sur l'action à mener dans ce domaine. On espère que l'administration combinée de deux antipaludiques – le Fansidar et l'artémisinine – retardera l'apparition d'une résistance aux deux médicaments. Pour génotyper les échantillons, on utilise la même technologie moléculaire.

laire que dans le projet régional africain.

Prochaines étapes. Suite à la mise en place réussie d'installations de biologie moléculaire, l'AIEA a décidé, en décembre 2000, d'étendre le projet et d'inclure dans un programme régional élargi d'autres pays africains compte tenu des propositions faites par certains d'entre eux (Ouganda, Zambie, Soudan) et de l'intérêt manifesté par d'autres, dont le Nigeria et le Ghana. Ce projet a été mis sur pied pour que des instituts avancés et expérimentés aident des établissements moins expérimentés de la région.

Alors que des moyens permanents d'éradication du paludisme – vaccins et lutte antivectorielle – sont à l'étude, les méthodes proposées de détection rationnelle des pharmacorésistances aideront à prendre efficacement en charge les malades, ce qui est l'une des priorités de l'initiative "Faire reculer le paludisme" de l'OMS. Ce projet s'inspirera de la Déclaration d'Abuja, qui appelle notamment à mettre au point des mécanismes facilitant la fourniture, aux épidémiologistes, d'informations fiables permettant aux autorités sanitaires de concevoir des stratégies appropriées de lutte et de surveillance.

Le but est de faire en sorte que les techniques isotopiques de base aident les établissements à acquérir une confiance et une aptitude leur permettant d'utiliser des techniques avancées, automatisées et, éventuellement, non isotopiques pour résoudre d'importants problèmes sanitaires. À cette fin, le projet sera administré en étroite collaboration avec l'OMS.

TECHNIQUE DE L'INSECTE STÉRILE

Depuis les années 50, il est démontré que les ravageurs peuvent être combattus ou éradiqués par une méthode de "contrôle des naissances" appelée technique de l'insecte stérile. Cette technique consiste à coloniser et à élever en masse, dans de vastes installations, les ravageurs visés, à les stériliser par des rayonnements ionisants, puis à les relâcher dans la nature de façon soutenue et en nombre suffisant pour submerger les insectes sauvages. Après accouplement à un mâle stérile, les femelles sauvages n'auront pas de progéniture, ce qui réduira la population naturelle du ravageur.

Un aspect essentiel de l'application de cette méthode est le concept de zone dans laquelle la population totale du ravageur doit être combattue. La technique de l'insecte stérile n'est pas, non plus, une technique autonome; pour être efficace, elle doit s'intégrer à un ensemble de méthodes. Fait remarquable, cependant : son rendement s'accroît avec la diminution de la densité de la population cible, ce qui peut permettre d'envisager une éradication si on l'applique systématiquement et dans toute la zone sur plusieurs générations. C'est également la méthode la plus respectueuse de l'environnement, car elle est absolument *spécifique* : la stérilité touche exclusivement les espèces visées, ne nuisant qu'à la population de ravageurs.

Expériences de terrain contre les moustiques. On a tenté plusieurs fois, par le passé, d'employer la technique de l'insecte stérile contre les moustiques, avec un succès variable. Ces expériences ont été les suivantes :

<i>Culex fatigans</i>	Inde, 1962
<i>C. pipiens quinquefasciatus</i>	Floride, États-Unis, 1970
<i>C. p. fatigans</i>	Inde, 1975
<i>C. tarsalis</i>	Californie, États-Unis, 1965
<i>C. tarsalis</i>	Californie, États-Unis, 1980
<i>Aedes aegypti</i>	Floride, États-Unis, 1962
<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	Floride, États-Unis, 1962
<i>Anopheles albimanus</i>	El Salvador, 1975

LA LUTTE CONTRE LES MOUSTIQUES

La technique de l'insecte stérile s'est montrée très efficace pour combattre et/ou éradiquer certains ravageurs clés dont la mouche tsé-tsé, vecteur de la trypanosomiase animale. C'est pourquoi des États Membres ont demandé de façon répétée, au cours de la décennie écoulée, que cette technique soit développée afin d'être appliquée aux moustiques vecteurs de paludisme.

On a tenté plusieurs fois, par le passé, d'appliquer aux mous-

tiques anophèles la technique de l'insecte stérile, avec des degrés de réussite variables. De nombreux enseignements peuvent être tirés de ces expériences ainsi que des importantes améliorations qui ont été apportées à cette technique depuis les premiers essais de terrain. Deux rapports d'experts commandés par l'AIEA ont recommandé plusieurs espèces d'anophèles susceptibles d'être soumises à la technique de l'insecte stérile ainsi que des sites éventuels d'essais sur le terrain. Les rapports ont

cependant souligné qu'il fallait, avant ce stade, lever d'importants obstacles techniques concernant certains aspects clés de la technique de l'insecte stérile.

À cette fin, l'AIEA a décidé, à la demande de nombreux États Membres et conformément à la résolution 44/24 (septembre 2000) de la Conférence générale, d'étudier la possibilité d'appliquer la technique de l'insecte stérile à un important vecteur du paludisme. Cette étude portera dans un premier temps sur l'*Anopheles arabiensis*, important facteur de paludisme et seul vecteur de la maladie dans de nombreuses régions d'Afrique.

Étude de faisabilité. L'étude portera sur les contraintes techniques suivantes :

■ **Élaboration de méthodes efficaces d'élevage de masse.** La technique de l'insecte stérile repose sur une production de masse efficace d'insectes de qualité en vue de leur stérilisation et de leur libération. Pour l'anophèle, d'importantes améliorations vont devoir être apportées à l'élevage des larves et à la collecte des pupes. Ces deux phases sont aquatiques et ne se prêtent pas facilement à la production de masse.

L'entretien de nombreux moustiques adultes pour la production d'œufs ne devrait pas poser de problème important, et l'on dispose déjà de systèmes d'alimentation à membrane.

■ **Amélioration des méthodes de stérilisation, de manipulation et de libération.** Des procédures d'irradiation vont devoir être mises au point pour produire des moustiques mâles stériles de qualité. Par le passé, cette activité a parfois posé des

problèmes; il faudra donc innover pour stériliser efficacement les pupes ou les adultes mâles. Pour combattre les moustiques dans une zone donnée, il faudra disperser des insectes stériles à grande échelle par voie aérienne. Il reste à savoir si cela est possible avec des insectes fragiles tels que les moustiques ou s'il faudra envisager des techniques consistant à libérer des pupes stérilisées.

■ **Mise au point de méthodes génétiques ou moléculaires de production de moustiques mâles.** Pour lutter contre les moustiques, il faudra libérer seulement des mâles afin de prévenir toute transmission par des femelles stériles, seules les femelles pouvant transmettre le paludisme. Dans les années 70, des systèmes génétiques (génétique mendélienne classique) de détermination du sexe ont été conçus pour de nombreuses espèces d'anophèle; l'expérience de la mouche méditerranéenne des fruits, *Ceratitis capitata*, a montré que cette méthode pouvait s'appliquer à la production en masse d'insectes mâles. Des méthodes moléculaires de conception de systèmes génétiques de détermination du sexe d'anophèles sont en cours d'élaboration dans plusieurs laboratoires; à ce jour, cependant, aucune méthode n'a fait ses preuves. Sans système fiable de ce type, le recours à la technique de l'insecte stérile serait gravement compromis.

■ **Intégration de la technique de l'insecte stérile à d'autres méthodes de lutte contre l'anophèle.** La technique de l'insecte stérile n'est pas une méthode autonome; elle doit s'intégrer à d'autres méthodes de réduction de la population. Des filets

traités à l'insecticide préconisés par l'OMS sont actuellement largement déployés pour combattre les moustiques; leur efficacité et leur coût font l'objet d'importantes améliorations. Ces filets forment un obstacle fatal entre les humains et les anophèles femelles. Cette méthode visant les moustiques femelles, elle est parfaitement compatible avec la libération de mâles stériles, les deux interventions se complétant. Même la vaporisation des maisons vise les moustiques femelles; elle peut donc aussi s'accompagner d'une libération de mâles stériles.

Les perspectives. La recherche, en vue de remplacer leur population, de moustiques génétiquement manipulés incapables de transmettre le paludisme est, malgré le scepticisme des entomologistes médicaux, l'une des priorités de nombreuses organisations, dont l'OMS. Il est proposé d'effectuer ce remplacement en ensemençant une population cible au moyen d'un nombre relativement faible de moustiques génétiquement manipulés, qui pourraient ensuite propager activement les caractéristiques réfractaires dans la population.

Il n'existe, à ce jour, aucun mécanisme éprouvé capable d'accomplir ce remplacement et il faudra probablement libérer en masse des moustiques féconds. Les méthodes d'élevage et de libération décrites dans le présent article joueront alors un rôle essentiel.

On envisage aussi sérieusement d'utiliser des moustiques femelles stériles pour administrer des vaccins. Ici encore, un élevage et une libération en masse seraient requis. □