



Chimiosensibilité du paludisme importé en France en 2001 et 2002

Pascal Ralaimazava¹, Bruno Pradines², Annick Keundjian², Rémy Durand¹, Jacques Le Bras¹

Centre national de référence de la chimiosensibilité du paludisme

¹Centre nord, Hôpital Bichat Claude-Bernard, Paris

²Centre sud, Institut de médecine tropicale du service de santé des armées, Marseille

INTRODUCTION

La France est l'un des pays qui rapporte le plus grand nombre de cas de paludisme, parmi les pays de l'Union européenne, avec environ 7 000 cas estimés par an [1]. *Plasmodium falciparum* est l'espèce qui pose le plus de problèmes en terme de sensibilité. Le Centre national de référence de la chimiosensibilité du paludisme (CNRCP) décrit le profil de la chimiosensibilité du paludisme importé en France par l'étude des isolats de *Plasmodium* transmis à deux laboratoires situés à Paris et Marseille pour permettre aux autorités sanitaires (Conseil supérieur d'hygiène publique de France) d'adapter les recommandations chimioprophylactiques et thérapeutiques.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Isolats

Les isolats de *Plasmodium* parviennent d'hôpitaux français métropolitains au CNRCP qui confirme l'espèce et la parasitémie et étudie leur chimiosensibilité. Un recueil d'informations est effectué à l'aide d'une fiche incluant l'identité, le pays de résidence, le pays d'origine, le pays d'infestation, la date de retour de zone d'endémie palustre. L'usage ou non d'une chimioprophylaxie et son observance sont indiqués par le clinicien. Le clinicien renseigne sur un éventuel traitement antérieur et sur le traitement prescrit et son évolution. L'intégralité des isolats de *Plasmodium falciparum*, *malariae*, *vivax*, *ovale* de trois hôpitaux (Bichat Claude-Bernard, Saint-Denis et Mantes) a été étudiée. Episodiquement, des isolats sont transmis d'autres hôpitaux pour déterminer la chimiosensibilité de *P. falciparum*. Dans le cas des isolats soumis à une chimioprophylaxie ou à un traitement antérieur connu, la chimiosensibilité n'est déterminée que pour les antipaludiques utilisés. Les isolats pour lesquels l'information sur la chimioprophylaxie est incomplète ou manquante n'ont pas été testés au laboratoire.

Tests de laboratoire

Le diagnostic d'espèce et la densité parasitaire sont confirmés microscopiquement. Les divergences ou difficultés diagnostiques font l'objet d'une confirmation par étude antigénique (ICT[®], Optimal[®]) ou génomique par PCR (*PfDHFR*, *PfrRNA*) [2]. Le portage de gamétocytes de *P. falciparum* sans formes asexuées n'est pas retenu pour le diagnostic de paludisme évolutif. La détermination de la densité parasitaire au décours du traitement permet, associée à la mesure de température corporelle, de classer les réponses thérapeutiques selon les normes

OMS [3]. La chimiosensibilité in vitro du *P. falciparum* à la chloroquine (CQ), à l'atovaquone (A), au métabolite actif de l'amodiaquine (Aqm), à la quinine (Q), à la méfloquine (M), à l'halofantrine (H), et au cycloguanil (CG) est mesurée par des tests isotopiques [4]. La culture du parasite n'est effectuée que lorsque la parasitémie au frottis sanguin est supérieure ou égale à 0,5 % (25 000 formes asexuées / μ L de sang) et que les parasites ne sont pas altérés à la réception. Les seuils de diminution de sensibilité de ces tests correspondent à la moyenne + 2 et des concentrations inhibitrices 50 % (CI₅₀) des isolats de succès thérapeutiques. Ils sont, respectivement, 100 nM (CQ), 30 nM (M), 6 nM (H), 800 nM (Q), 500 nM (CG), 80 nM (Aqm) et 7 nM (A) [4]. Ces tests ont été réalisés avec les isolats provenant des cas d'échec thérapeutique ou des malades n'ayant pas utilisé la molécule correspondante. Le génotypage des marqueurs de résistance est employé pour le CG et la CQ. La présence de la mutation ponctuelle S108N dans le gène de la dihydrofolate réductase est nécessaire à la résistance de *P. falciparum* au CG (elle indique également la résistance à la pyriméthamine) [5]. La présence de la mutation ponctuelle K76T dans le gène *Pfprt* est nécessaire à la résistance in vitro des isolats de *P. falciparum* à la CQ [6]. La présence de la mutation ponctuelle Y268S dans le gène du cytochrome B a été rapportée comme associée à la résistance in vitro des isolats de *P. falciparum* à l'A. La présence de mutations additionnelles N51I et C59R, associée à des hauts niveaux de résistance au cycloguanil, a été recherchée par PCR suivie de séquençage sur une série d'échecs prophylactiques vrais à l'association CQ + proguanil (PG).

Nous avons développé une méthode d'analyse de fragments d'ADN pour dénombrier les clones présents dans les isolats de *P. falciparum* de patients et quantifier leurs proportions respectives [7]. Le dosage des antipaludiques par chromatographie liquide haute pression a été effectué sur le plasma des sujets déclarant un échec prophylactique ou thérapeutique ou une absence d'usage d'antipaludique. Les molécules étudiées sont la CQ, la monodéséthyl-chloroquine (CQm) qui est le métabolite actif de la CQ, le PG qui est un précurseur peu actif, le CG qui est le métabolite actif du PG, la M et son métabolite (Mm), l'A, la Q et l'Aqm. Elles sont détectables à des concentrations supérieures ou égales à 5 μ g/L de plasma. Nous considérons que la concentration minimale efficace est de 33 μ g/L pour la CQ (environ 100 μ mol/L), de 22 μ g/L pour le CG (80 μ mol/ml) et de 680 μ g/L pour la M [8,9]. Nous considérons comme échecs prophylactiques les cas de *P. falciparum* malgré une chimioprophylaxie jugée correcte par les cliniciens. Sont considérés comme échecs vrais ceux de sujets sous prophylaxie confirmés par la présence

de concentrations plasmatiques efficaces d'antipaludiques. L'absence d'un antipaludique à concentration efficace dans le plasma d'un sujet sous chimioprophylaxie est considérée comme un faux échec chimioprophylactique. Sont considérés comme douteux les échecs dont les données pharmacologiques ne sont pas conclusives.

Tests statistiques

Les résultats sont recueillis sur Excel 97. Le test de Fischer-Snedecor est utilisé pour le calcul des intervalles de confiance à 95 % (IC 95). Les distributions d'effectifs sont analysées avec le test de Chi 2 corrigé selon Yates.

RÉSULTATS

Description des cas

Pendant les deux années, 1 143 et 112 isolats provenant de 36 hôpitaux de la métropole sont respectivement parvenus au CNRCP nord et sud, *P. falciparum* a été identifié pour 1 147 souches (dont onze associés : 4 avec *P. ovale*, 6 avec *P. malariae* et 1 avec *P. vivax*), tous ont été identifiés par frottis-goutte épaisse, 28 ont été confirmés par PCR. Les patients ont leur résidence principale en France ou en Europe dans la majorité des cas (89 %) (n = 1 222). L'âge moyen calculé est de 32 ans [3 mois - 82 ans] avec dans 189 cas (15 %), un âge inférieur ou égal à 15 ans. Le sex-ratio est de 1,5. Dans 98 % des cas (n = 1 231), le pays de contamination est en Afrique dont 23 cas où le pays n'a pas été déterminé du fait d'un séjour consécutif dans deux ou trois pays différents. Les pays d'Afrique les plus représentés sont : la Côte-d'Ivoire (19 %), le Cameroun (18 %), le Sénégal (14 %), le Mali (13 %), les Comores (10 %). Le délai médian entre le retour de zone impaludée et le diagnostic est dans 1 059 cas de *P. falciparum* de 10 jours [0-330]. Pour 69 cas de *P. ovale*, le délai médian est de 100 jours [0-915]. Pour 17 cas de *P. vivax*, le délai médian est de 109 jours [9-674]. Dans 13 cas de *P. malariae*, le délai médian est de 34 jours [7-95]. Sur les 1 137 dossiers médicaux renseignés, 655 notent l'absence de prise chimioprophylactique, néanmoins, dans 8 % des cas (sur un échantillon de 275 sujets) la présence d'antipaludique a été détectée dans le plasma. L'association proguanil-chloroquine (Savarine® ou Nivaquine® + Paludrine®) est citée par 53 % des patients ayant pris une chimioprophylaxie ; la chloroquine seule dans 31 % des cas. Les autres prophylaxies utilisées seules sont, le Lariam® (n = 35), la Malarone® (n = 5), la Paludrine® (n = 16), la pyriméthamine (n = 12). Ces deux derniers composés ne sont pas des prophylaxies recommandées par le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF).

Échecs chimioprophylactiques et dosages plasmatiques

Les accès palustres à Pf sous chimioprophylaxie régulière (n = 163) se sont déclarés en moyenne 16 jours [0-57], après le retour en France avec une parasitémie de 1 % en moyenne. Le dosage a permis de confirmer 35 échecs sur 109 : 14/34 à la CQ et 21/75 à l'association CQ/PG ou Savarine® (souches provenant de zone 3 et de Côte-d'Ivoire (n = 7), du Mali (n = 2), du Ghana (n = 2), de Guinée, du Burkina Faso et du Sénégal (n = 1 pour chaque)). On a retrouvé en moyenne 280 µg/L de M [57-684], dans le plasma des 8 patients en échec chimioprophylactique à la méfloquine, ce qui est inférieur à la concentration minimale observée chez 15 voyageurs canadiens [9].

Traitements antipaludiques

Avant la consultation hospitalière, 164 patients ont commencé un traitement. Les médicaments utilisés sont : la quinine (n = 63), la chloroquine (n = 45), l'Halfan® (n = 25), le Lariam® (n = 17), le Fansidar® (n = 2), la Savarine® (n = 2) et des associations diverses (n = 10). Sur les 732 malades qui ont dit n'avoir rien pris, 6 % présentent un antipaludique dans le sang, sur 155 plasmas dosés. Le traitement prescrit à l'hôpital des accès à *P. falciparum* (n = 899) a été dans 58 % des cas la quinine seule (n = 522) ou associée à un antibiotique (n = 10). Les autres

traitements sont : l'Halfan® dans 177 cas (19 %), le Lariam® dans 167 cas (18 %), l'association proguanil + atovaquone (Malarone®) dans 13 cas, la chloroquine dans 9 cas et la sulfadoxine-pyriméthamine dans 1 cas. Le traitement prescrit pour les espèces autres que *P. falciparum* (n = 84) a été la chloroquine dans 28 cas, la quinine seule dans 28 cas, l'Halfan® dans 11 cas, le Lariam® dans 9 cas et la Malarone® dans 1 cas, les traitements des 7 autres cas ne sont pas connus. Sur les deux années consécutives, 15 cas d'échecs thérapeutiques ont été rapportés : dont 8 à l'Halfan® (échecs tardifs), 6 à la quinine dont 4 précoces et 1 échec précoce au Lariam® (tableau 1).

Tableau 1

Traitements des cas de *Plasmodium falciparum* analysés par le CNRCP en 2001-2002

Traitements	Nombre						
	Décès	ETP	ETT	abs ETP	RCPA	Non suivis	Total
Quinine	3	4	2	163	34	316	522
Quinine + Ab	0	0	0	0	0	10	10
Halofantrine	0	0	8	11	2	156	177
Méfloquine	0	1	0	12	0	154	167
Atovaquone + Proguanil	0	0	0	5	4	4	13
Chloroquine	0	0	0	0	0	9	9
Sulfadoxine + Pyriméthamine	0	0	0	0	0	1	1

Ab : cycline ou clindamycine

ETP : échec thérapeutique précoce ; ETT : échec thérapeutique tardif ; abs ETP : pas de fièvre ni parasites à 72 h ; RCPA : réponse clinique et parasitologique adéquate

Chimiosensibilité des isolats

Suivant les critères de l'étude, 408 tests isotopiques (333 à Paris, 75 à Marseille) ont été réalisés ; 40 % de ces tests ont présenté un échec de culture lié à la présence de médicament ou à une altération non perçue (les parasites s'altèrent rapidement après prélèvement). La sensibilité aux 6 antipaludiques étudiés est rapportée dans le tableau 2. La fréquence de résistance à la CQ dans ces petits échantillons fluctue entre 1996 et 2002 (tableau 3). En agrégeant les données de 1996 à 2002, la proportion de chloroquino-résistance des pays du groupe 2 (33 %) est moindre que celle des pays du groupe 3 (55 %). La sensibilité au CG a été mesurée sur 691 souches, 630 souches par étude génomique et 61 par les deux méthodes. Le pourcentage de souches présentant la mutation ponctuelle S108N dans le gène *DHFR* est de 60 %. La résistance au CG n'évolue pas entre 1996 et 2002 (p = 0,7). En 2002, en fonction des groupes définis par le CSHPF, la proportion de résistance au CG est moindre dans le groupe 2 que dans le groupe 3 (p < 10⁻⁶). En agrégeant les données de la chimiorésistance de 1996 à 2002, la résistance au

Tableau 2

Chimiorésistance des isolats de *Plasmodium falciparum* reçus par le CNRCP en 2001-2002

Antipaludiques	Sensibles	Résistants
Chloroquine	97	133
Cycloguanil*	416	275
Atovaquone	166	24
Méfloquine	26	3
Halofantrine	3	48
Quinine	1	54

* résistance génotypique pour le cycloguanil, phénotypique pour les autres antipaludiques

Tableau 3

Évolution en fonction des groupes de pays définis par le CSHPF, du taux de résistance à la chloroquine, au cycloguanil, et de birésistance des isolats de *P. falciparum* importés d'Afrique en France entre 1996 et 2002 et non soumis à sélection médicamenteuse (données CNRCP)

	Pourcentage d'isolats résistants* (nombre testé)							TOTAL [IC95%]
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	
R-Chloroquine								
Groupe-2	43 % (44) _{NS}	34 % (32) _{NS}	34 % (53) _{NS}	23 % (47) _{NS}	43 % (44) _{NS}	27 % (51) _{NS}	27 % (67) _S	33 % [29-38] (338) _{SS}
Groupe-3	58 % (26)	63 % (41)	57 % (53)	35 % (34)	58 % (19)	61 % (28)	57 % (54)	55 % [49-61] (255)
R-Cycloguanil								
Groupe-2	42 % (198) _{NS}	39 % (136) _S	40 % (168) _{SS}	38 % (162) _{SS}	42 % (198) _{SS}	34 % (61) _{SS}	30 % (73) _{NS}	39 % [37-42] (996) _{SS}
Groupe-3	57 % (54)	67 % (122)	67 % (127)	72 % (111)	73 % (114)	79 % (38)	78 % (63)	70 % [67-72] (629)
R-Chloroquine et Cycloguanil								
Groupe-2	19 % (42) _{NS}	14 % (26) _{NS}	15 % (49) _{NS}	7,7 % (45) _{NS}	19 % (42) _{NS}	4,6 % (49) _{NS}	13 % (53) _{NS}	13 % [9,6-19] (306) _{SS}
Groupe-3	33 % (21)	50 % (17)	38 % (47)	25 % (31)	42 % (19)	49 % (26)	47 % (40)	39 % [31-48] (201)
Total	22 % (63)	28 % (43)	23 % (96)	14 % (76)	26 % (61)	20 % (75)	28 % (93)	23 % [21-24] ** (507)

* ajustement de Fischer-Snedecor NS = différence non significative, S = $p < 0,01$ et SS = $p < 0,001$ entre groupes

** non significatif entre années

CG dans le groupe 2 est de 39 % et dans le groupe 3 de 70 %. La sensibilité à la fois à la CQ et au CG a été mesurée sur 219 souches. Entre 1996-2002, la proportion de birésistance observée est moindre dans le groupe 2 que dans le groupe 3 ($p < 0,001$). Pour les sept années écoulées, la proportion de birésistance observée est de 13 % dans les pays du groupe 2 et de 39 % dans les pays du groupe 3 (tableau 3). La méthode d'analyse de fragment nous a permis un constat inattendu : la quasi totalité des voyageurs hébergent plusieurs souches de *Plasmodium* et les génotypes de résistance varient avec l'heure de prélèvement [7].

DISCUSSION

L'évaluation de la chimiosensibilité du paludisme d'importation ne peut concerner que les sujets ayant présenté la maladie, d'où l'importance de considérer la résistance des souches isolées et de valider par des dosages les assertions de bonne observance. Il importe de suivre l'évolution de fréquence des chimio-résistances et de confirmer les données observées sur les cas importés par des études en zone d'endémie. Les taux de résistance observés par pays sont généralement similaires dans le paludisme d'importation et sur le terrain (tableau 4). Entre

Tableau 4

Pays classés par ordre de fréquence croissante de résistance à la chloroquine et au cycloguanil de *P. falciparum* importé ou étudié sur le terrain entre 1996 et 2002 (données CNRCP)

	% cycloguanil-R (n isolats)		% chloroquine-R (n isolats)		% cycloguanil+chloroquine-R ¹	
	importé	terrain	importé	terrain	importé	terrain
Madagascar	13 (23)	–	0 (13)	–	0	–
Djibouti	–	4 (25)	–	93 (27)	–	3,7
Mali	17 (170)	–	33 (63)	–	5,6	–
Burkina Faso	32 (38)	15 (46)	19 (16)	32 (75)	6,1	4,8
République Centre-Africaine	17 (17)	–	50 (48)	–	8,5	–
Côte-d'Ivoire	38 (408)	33 (61)	31 (129)	27 (64)	12	8,9
Niger	–	25 (20)	–	42 (26)	–	10,5
Sénégal	47 (188)	36 (377)	34 (82)	48 (363)	16	17
Guinée	48 (44)	–	39 (13)	–	19	–
Comores	44 (117)	47 (32)	50 (41)	–	22	–
République démocratique du Congo	81 (48)	95 (96)	43 (14)	–	35	–
Bénin	76 (58)	–	53 (15)	–	40	–
Togo	87 (38)	–	50 (8)	–	43	–
Libéria	–	84 (25)	–	–	–	–
Congo	81 (63)	86 (155)	64 (22)	–	52	–
Gabon	67 (42)	43 (115)	93 (15)	92 (180)	62	40
Thaïlande	–	100 (28)	–	96 (28)	–	96

cycloguanil-R : *PfDHFR* S108N ; chloroquine-R : $Cl_{50} > 100$ nmol L⁻¹ ; ¹ produit de la fréquence de résistance à chaque composé.

1997 et 2000, 62 vrais échecs à l'association CQ/PG ont été identifiés par le CNRCP [10]. En 1996-2002, l'efficacité attendue de la prophylaxie CQ/PG est de 87 % dans les pays du groupe 2 contre 61 % pour les pays du groupe 3 et la résistance à la M est sporadique et sans regroupement géographique, ces données étant similaires aux données antérieures. De ce fait, l'utilisation et le développement des tests isotopiques et génomiques sont importants pour étudier cette évolution. La présence de l'haplo-type *PfDHFR 108N-PfCRT76T* dans 59 sur 60 souches d'échecs de la prophylaxie CQ/PG testées entre 1998 et 2002, confirme l'intérêt de ces deux marqueurs [5]. Pour la CQ, une $CI_{50} \geq 100nM$, sur un isolat prélevé avant traitement reste le marqueur le plus satisfaisant d'un échec clinique chez les sujets non immuns. Les mutations sur les codons *DHFR51* et *59*, fréquemment observés dans les échecs chimioprophylactiques aux anti-foliniques, incitent à leur utilisation. Un nombre croissant de publications souligne le rôle des populations multiples dans les infections à *P. falciparum*. La présence d'un clone chimiorésistant en faible proportion peut ne pas être détectée et faire conclure faussement à la chimiosensibilité de l'isolat. La présence ou l'absence de rechute tardive, voire le portage prolongé ou asymptomatique de parasites peut être une conséquence de cette complexité [7]. Le dosage des antipaludiques peut confirmer un échec prophylactique si les dates et heures de prises sont correctement renseignées. Les concentrations minimales efficaces sont définies sur la base des expériences préalables, elles nécessitent des études sur les molécules nouvellement utilisées. La validation des renseignements cliniques des isolats à analyser est essentielle à la bonne interprétation des résultats de chimiosensibilité.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude montrent que la chimiosensibilité du paludisme d'importation est stable dans les zones d'où proviennent en plus grand nombre les isolats reçus par le CNRCP en 2001 et 2002. Les études menées sur le terrain confirment cette stabilité. La résistance à la molécule la plus utilisée (association CQ/PG) est stable, toutes zones confondues entre 1996 et 2002, sur le paludisme d'importation [10,11]. Le traitement de première intention de l'accès simple de paludisme à *Plasmodium falciparum*, en 2001-2002, est une monothérapie par la quinine, la méfloquine ou l'halofantrine. L'accroissement d'utilisation de la Malarone® depuis 2002 nécessite une surveillance particulière de la chimiosensibilité des souches d'importation à l'atovaquone et au cycloguanil et le développement de tests appropriés. Le déploiement en zone d'endémie du coartémether (Riamet®) nécessite la surveillance de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la luméfántrine et à l'artémether. La négligence par les voyageurs d'une chimioprophylaxie antipaludique, nécessite des messages plus ciblés ou personnalisés

rappelant son efficacité et sa tolérance et le risque potentiellement mortel de l'accès palustre [12]. Nous confirmons que la principale origine du paludisme d'importation est le défaut d'observance de la chimioprophylaxie plus que son inadéquation. Les échecs thérapeutiques sont également le plus souvent dus à un défaut d'observance du traitement.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les médecins qui ont transmis les isolats de cette étude et recueillis les renseignements et le Dr Pascal Houzé, Hôpital Saint-Louis, qui a réalisé les dosages de médicaments sur les échantillons des patients du Centre nord.

RÉFÉRENCES

- [1] Danis M, Legros F, Thellier M, Caumes E et les Correspondants du réseau CNRMI. Données actuelles sur le paludisme en France Métropolitaine. *Med Trop* 2002; 62:3:0217.
- [2] Qari SH, Shi YP, Pieniazek NJ, Collins WE, Lal AA. Phylogenetic relationship among the malaria parasites based on small subunit rRNA gene sequences: monophyletic nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Phylogenet Evol* 1996; 6:157-65.
- [3] OMS. Monitoring antimalarial resistance. WHO/CDS/CSR/EPH/2002.17 (disponible sur www.who.int/csr/resources/publications).
- [4] Le Bras J, Ringwald P. Situation de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* en Afrique en 1989. *Med. Trop.*, 1990; 50:11-16.
- [5] Durand R, Jafari S, Bouchaud O, Ralaimazava P, Keudjian A, Le Bras J. *Plasmodium falciparum* : pfcrt and DHFR mutations are associated with Chloroquine plus Proguanil Prophylaxis failures in travelers. *J Inf Disease*, 2001; 184:1633-4.
- [6] Durand R, Jafari S, Vauzelle J, Delabre F, Jesic Z, Le Bras J. Analysis of pfcrt point mutation and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 2001; 114:95-102.
- [7] Jafari, S, Le Bras J, Bouchaud O., Durand R. *P. falciparum* clonal population dynamics. *J Infect Dis*, 2004; 189:195-203.
- [8] Touze JE, Keudjian A, Fusai T, Doury JC. Human pharmacokinetics of chloroquine and proguanil delivered in a single capsule for malaria chemoprophylaxis. *Trop Med Parasitol*, 1995; 46:158-160.
- [9] Pennie RA, Koren G, Crevoisier C. Steady state pharmacokinetics of mefloquine in long-term travellers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1993, 87: 459-462.
- [10] Ralaimazava P, Durand R, Godineau N, Keudjian A, Jezic Z, Pradines B, Bouchaud O, Le Bras J. Profil et evolution de la chimiosensibilité du paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum* en France en 2000 *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 2002; 26:127-129.
- [11] Le Bras J and Pradines B. Chemoresistance in *falciparum malaria*. *Trends in Parasitol*. 2003; 19:435-36.
- [12] Conseil supérieur d'hygiène publique de France. Recommandation sanitaires pour les voyageurs. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 2002; 24:0111-119.