

Dynamiques de la gamétocytémie à *Plasmodium falciparum* en fonction de la réponse thérapeutique à la chloroquine en zone de mésoendémie palustre.

V. Robert & J.-F. Trape (1) (2)

(1) ORSTOM (Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération), Laboratoire de paludologie, B.P. 1386, Dakar, Sénégal, Tél : (00) 221-832 09 62, fax : (00) 221-832 16 75

(2) Manuscrit n°1870. "Parasitologie". - Accepté le 25 novembre 1997.

Correspondance et tirés-à-part : V. Robert, ORSTOM, B.P. 1386 Dakar, Sénégal ou Vincent.Robert@orstom.sn

Summary: Dynamics of *Plasmodium falciparum* Gametocytemia According to The Therapeutic Response to Chloroquine in A Mesoendemic Area.

Key-words: Malaria -
Plasmodium falciparum -
Gametocyte -
Chemotherapy -
Chloroquine - Resistance -
Drug pressure - Senegal

Patients with Plasmodium falciparum infections were selected with an in vivo chloroquine sensitivity assay in a mesoendemic area of Senegal. Gametocytemia was studied in relation to asexual parasite responses classified as drug-sensitive or showing RI or RII resistance. Gametocyte prevalence and density appeared significantly higher in resistant infections than in sensitive ones. These observations were made on children as well as on adults. The period between first clinical symptom appearance and treatment, varying from 0 to 5 days, was not linked to asexual parasite responses, but was significantly and positively correlated to gametocyte prevalence and density observed seven days after beginning the treatment. The comparison between these results and those previously observed in a hypoendemic area suggests that the dynamic of gametocytemia is independent of the endemic level. These observations illustrate that the dissemination of chimoiresistant malaria can be reinforced - via the gametocyte stage - by selective chloroquine pressure.

Résumé :

Mots-clés : Paludisme -
Plasmodium falciparum -
Gamétocyte -
Chimiothérapie -
Chloroquine - Résistance -
Pression médicamenteuse -
Sénégal

La gamétocytémie lors d'un accès palustre traité à la chloroquine a été étudiée en fonction du niveau de chimiosensibilité de l'infection chez 137 malades résidant dans une région du Sénégal où le paludisme est mésoendémique. La prévalence et la densité gamétocytaires ont été significativement plus élevées avec les infections résistantes qu'avec les infections sensibles. La durée d'évolution de la maladie avant traitement, qui a varié de 0 à 5 jours, a été positivement corrélée aux niveaux de prévalence et de densité gamétocytaires observés sept jours après le début du traitement. Ces résultats en zone mésoendémique étendent des observations similaires récentes en zone hypoendémique et illustrent comment la dissémination du paludisme chimiorésistant, via le stade gamétocyte, peut être renforcée par la pression sélective de la chloroquine.

Introduction

Le paludisme à *Plasmodium falciparum* résistant à la chloroquine est devenu un problème majeur de santé publique. Il concerne la presque totalité des zones d'endémie dans le monde. En Afrique, la résistance à la chloroquine est apparue initialement à l'est du continent à la fin des années 1970, puis a progressé de façon continue pour atteindre son extrémité ouest en une dizaine d'année (3, 11). Toutefois, l'usage de la chloroquine reste largement préconisé dans la majeure partie de l'Afrique, en particulier comme traitement de première intention des accès palustres.

Les relations entre la chloroquine, les gamétocytes et l'inféctivité pour les moustiques sont complexes et probablement encore largement méconnues. On pense que la chloroquine ne stimule pas la gamétocytogenèse de *P. falciparum* (8), mais le contraire a été récemment prouvé avec *P. chabaudi* (2). Chez *P. falciparum*, la chloroquine n'a pas de conséquence sur le pouvoir infectant des gamétocytes matures (17, 19, 21), ni sur le déroulement de la sporogonie (4) ; toutefois, chez *P. berghei*

et *P. yoelii nigeriensis*, les souches chloroquino-résistantes présentent une inféctivité supérieure (9, 12). L'inféctivité des gamétocytes pour les moustiques vecteurs de paludisme dépend de nombreux facteurs (16), dont l'un des principaux est la densité gamétocytaire (19).

Dans une étude récente en zone urbaine hypoendémique au Sénégal, il a été observé que la gamétocytémie, après un accès simple traité à la chloroquine, était d'autant plus élevée que le type de réponse *in vivo* indiquait un haut degré de résistance (13). Cette observation suggère une transmission préférentielle des parasites les plus résistants et pourrait expliquer pourquoi les infections associées à une réponse de type RII sont rapidement devenues prévalentes, par rapport à celles associées au type RI, partout en Afrique tropicale. Ceci pourrait conduire à préconiser l'usage d'un gamétocytocide en association avec le traitement antipaludique dans les zones de chloroquino-résistance (10). Le but de la présente étude était d'une part, de vérifier si l'observation précédente faite en zone hypoendémique était retrouvée en zone mésoendémique, d'autre part, de préciser les conséquences de l'histoire de la maladie sur la gamétocytémie.

Matériel et méthodes

Le village de Mlomp est situé en Casamance, au sud-ouest du Sénégal. La pluviométrie annuelle moyenne est de 1200 mm par an et les pluies sont réparties sur une période de six mois, entre juin et novembre. Les 7000 habitants appartiennent presque exclusivement à l'ethnie Diola. La résistance à la chloroquine a émergé à Mlomp en 1990. Une étude randomisée en novembre 1992 (période de l'année présumée de transmission maximale pour le paludisme) a montré que la prévalence parasitaire atteignait 46 % chez les enfants et 38 % chez les adultes (18).

Des tests *in vivo* de chimiosensibilité à la chloroquine ont été effectués chez des malades consultant au dispensaire pour un accès simple à *P. falciparum* et déclarant ne pas avoir pris d'antimalarique au cours des quinze jours précédents. La dose standard de traitement a été de 25 mg/kg de poids corporel, distribuée en 3 jours (10, 10 et 5 mg). Le recrutement a été fait en octobre 91, octobre 92, août 93 et août 94. Des gouttes épaisses ont été réalisées à J0, J2, J4 et J7 chez 137 individus âgés de 1 à 59 ans (moyenne= 11,1 ; médiane= 9). La densité gamétoctaire a été mesurée sur 200 champs microscopiques à partir du rapport gamétoctes/leucocytes, sur la base de 8000 leucocytes/ μ l de sang. Le seuil de sensibilité de l'observation microscopique a été estimé à 3,3 parasites/ μ l de sang. L'analyse des observations a été effectuée en accord avec les recommandations de WERNSDORFER & PAYNE (20).

Les prévalences gamétoctaires ont été comparées en utilisant la probabilité exacte de FISHER. Le χ^2 de PEARSON a été utilisé pour tester la signification de l'augmentation des prévalences gamétoctaires après traitement dans les groupes sensibles, RI et RII. Le χ^2 de tendance linéaire a été utilisé pour tester la signification de l'augmentation des prévalences gamétoctaires observées après sept jours de traitement en fonction de l'histoire de la maladie. Le test non paramétrique de KRUSKAL-WALLIS a été utilisé pour comparer les durées moyennes de la maladie avant le traitement, en fonction de la réponse thérapeutique. Les densités gamétoctaires ont été transformées en $\text{Log}(x+1)$ et les moyennes géométriques ont été comparées par une ANOVA.

Résultats

La proportion de tests *in vivo* montrant une résistance parasitologique de *P. falciparum* a été de 50 % (tableau I). Deux patients ont présenté des infections de type RIII, l'un d'entre eux n'a présenté aucun gamétoctes à J0, J2, J4 et J7 et l'autre avait respectivement 0,0, 8,0, 14,5 et 4,0 gamétoctes/ μ l de sang. Ce petit nombre de RIII n'a pas permis d'analyser les gamétoctes en liaison avec ce type de résistance.

Tableau I.

Distribution des réponses des stades asexués de *Plasmodium falciparum* dans des tests de sensibilité *in vivo* à la chloroquine réalisés pendant quatre ans dans la zone mésoendémique de Mlomp, province de la Casamance, Sénégal.

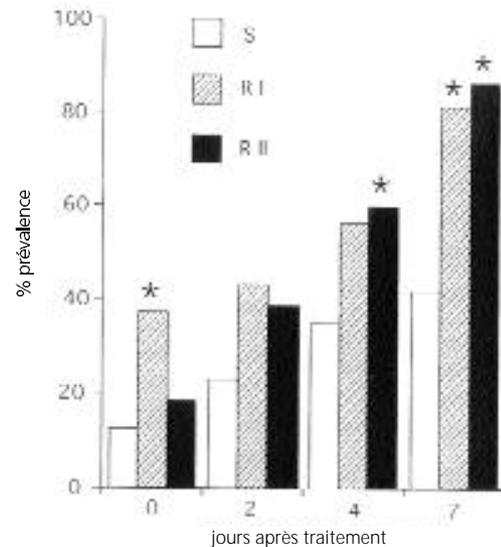
année	1991	1992	1993	1994	Total	%
sensible	16	19	19	15	69	50,4
RI	5	7	0	4	16	11,6
RII	12	11	12	15	50	36,5
RIII	0	0	1	1	2	1,5
total	33	37	32	35	137	100

Prévalence gamétoctaire

Les prévalences gamétoctaires de *P. falciparum* dans les groupes S, RI et RII ont augmenté de J0 à J7 après le traitement (figure 1) ; cette augmentation a été significative pour les groupes S et RII et proche de la signification pour le groupe

Figure 1.

Évolution après traitement par la chloroquine de la prévalence gamétoctaire chez des patients en accès simple à *Plasmodium falciparum*. Les astérisques indiquent des différences significatives par rapport aux infections sensibles (test exact de FISHER <0,05) (n=69 pour S, n=16 pour RI et n=50 pour RII ; 2 RIII n'ont pas été représentés).



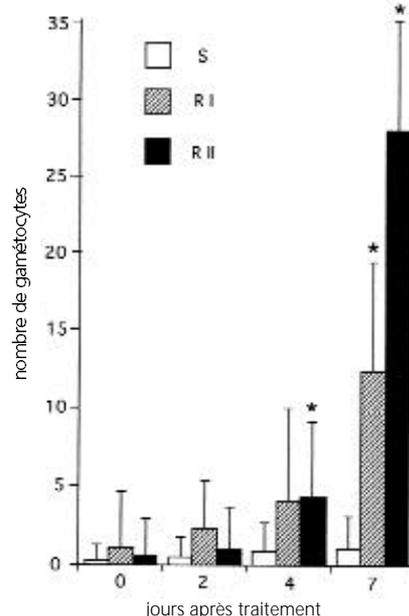
RI ($\chi^2 = 16,6, P < 10^{-3}$; $\chi^2 = 98,7, P < 10^{-6}$; $\chi^2 = 7,2, P < 0,07$, respectivement, avec ddl = 3 dans chaque cas). À J0, J2, J4 et J7 la prévalence gamétoctaire n'a jamais différencié significativement entre RI et RII. À J0, elle a différencié entre S et RI (probabilité exacte de FISHER $P = 0,03$). Entre S et R(I+II), elle a différencié à J4 (34,8 % vs 59,1 %) et J7 (42,0 % vs 84,8 %) (probabilité exacte de FISHER $P = 0,006$ à J4 et $P < 10^{-4}$ à J7).

Densité gamétoctaire

Les densités gamétoctaires dans les groupes S, RI et RII ont augmenté de J0 à J7 (figure 2). La moyenne géométrique des nombres de gamétoctes a augmenté de J0 à J7 chez les patients à souches sensibles de 0,39 gamétoctes/ μ l de sang à 2,80, chez

Figure 2.

Évolution après traitement par la chloroquine de la moyenne géométrique de la densité gamétoctaire par microlitre de sang chez des patients en accès simple à *Plasmodium falciparum*. Les barres indiquent les intervalles de confiance et les astérisques indiquent les différences significatives par rapport aux infections sensibles (test U de MANN-WHITNEY <0,05).



les patients à souches RI de 1,44 à 12,29 et chez les patients à souches RII de 0,63 à 28,29 ; ainsi, la gamétocytémie des souches sensibles, RI et RII a augmenté respectivement d'un facteur 7,1, 8,5 et 44,9. Ces densités ont toujours été supérieures chez les souches résistantes par rapport aux souches sensibles à J0, J2, J4, et J7. Pour la comparaison S-RI à J4 et pour la comparaison RI-RII à J7, les différences n'ont pas été significatives ($P = 0,17$ pour chacune des deux comparaisons par le test U de MANN-WHITNEY) ; mais, pour la comparaison S-RII à J4 et pour les comparaisons S-RI et S-RII à J7, les différences ont été significatives ($P = 0,009$, $P = 0,028$ et $P < 10^{-4}$ par le test U de MANN-WHITNEY). Les gamétocytes décomptés paraissaient en totalité morphologiquement matures (stade V).

Parasites asexués avant le traitement

A J0, les moyennes géométriques des densités de trophozoïtes dans les groupes S, RI et RII ont été respectivement 286,7, 171,0 et 511,7 ($F = 5,27$, $P = 0,0063$). Les moyennes des groupes sensibles et RI n'ont pas différé significativement ($P < 0,40$), mais la moyenne des RII a différé de RI ($P = 0,017$) et a été proche du seuil de signification par rapport aux sensibles ($P = 0,054$).

Relation avec l'âge des patients

La réponse thérapeutique a été liée à l'âge des patients ; l'âge moyen des patients à infections sensibles (21,8 ans) a été supérieur à celui des RI (16,1 ans), qui a été lui-même supérieur à celui des RII (15,0 ans). Chez les enfants de 1 à 9 ans ($n = 68$), à J7, les prévalences et densités gamétocytaires des souches sensibles et résistantes (RI+RII+RIII) ont été significativement différentes (pour les prévalences, la probabilité exacte de FISHER $P = 0,027$ et pour les densités $P = 0,0039$ par le test U de MANN-WHITNEY). Un résultat similaire a été obtenu chez les patients âgés de 10 à 19 ans ($n = 54$) (respectivement $P = 2.10^{-4}$ et $P = 0,018$). Cette stratification suggère que l'âge n'a pas été un facteur influant sur les gamétocytémies observées.

Relation avec l'histoire de la maladie

Lors de l'inclusion dans le test *in vivo*, les patients en accès palustres ont déclaré être malades, en moyenne, depuis 1,34 jours (extrêmes : 0-5 jours) (tableau II). Il n'y a eu aucune relation entre ce délai (séparant le début de la maladie du début du traitement) et la réponse thérapeutique (1,32 jours pour les S ; 1,59 jours pour les R1 ; 1,26 jours pour les R2 ; P corrigé pour les ex-æquo = 0,61 dans le test de KRUSKAL-WALLIS). Il n'y a pas eu non plus de relation significative entre ce délai et la densité gamétocytaire à J2 ($r = 0,107$, $n = 137$, $P = 0,22$) et à J4 ($r = 0,159$, $n = 137$, $P = 0,063$). Par contre, il y a eu une corrélation très significative entre ce délai et la densité gamétocytaire à J7 ($r = 0,287$, $n = 137$, $P = 7 \times 10^{-4}$) et il y a eu une corrélation significative entre ce délai et la prévalence gamétocytaire à J7 (pour les patients dont la maladie a débuté entre 0 et 3 jours, $n = 133$, le r^2 de tendance linéaire = 4,87, $P = 0,027$).

Tableau II.

Répartition des 137 tests de sensibilité *in vivo* à la chloroquine en fonction de l'histoire de la maladie avant le traitement, et indications sur la gamétocytémie 7 jours après le début du traitement.

malade depuis (jour)	n	présence de gamétocytes à J7 et indice gamétocytaire	moyenne géométrique des densités gamétocytaires à J7 calculée en excluant les valeurs nulles (nombre de gamétocytes / μ l de sang)
0	14	5 (36%)	8,3
1	83	51 (61%)	31,4
2	24	17 (71%)	36,7
3	12	10 (83%)	39,4
4-5	4	3	265,3

Discussion

Après un traitement à la chloroquine, la densité et la prévalence gamétocytaires ont été significativement plus élevées lors des infections RI-RII que lors des infections sensibles. Comparés à une étude précédente effectuée à Pikine en zone hypoendémique du Sénégal (13), les présents résultats obtenus en zone mésoendémique sont largement concordants. Il est cependant à noter que les prévalences gamétocytaires à J4 et J7 qui étaient significativement différentes entre les infections RI et RII dans l'étude de Pikine n'a pas été significativement différente à Mlomp. Ceci pourrait être en rapport avec la prévalence relativement élevée des gamétocytes à J0 dans les infections RI de notre échantillon de Mlomp. Globalement, il nous semble raisonnable de conclure qu'en zones hypoendémique et mésoendémique, les gamétocytémies après traitement présentent une dynamique comparable en relation avec le niveau de chimiosensibilité.

Pour tenter d'expliquer l'apparition massive de gamétocytes circulants consécutive au traitement dans le cas des souches résistantes, il est possible d'émettre trois hypothèses, non exclusives entre elles :

- la chloroquine, bien connue pour détruire les jeunes gamétocytes sensibles (17), a sélectionné les jeunes gamétocytes résistants,
- les souches résistantes ont été plus gamétocytogènes,
- la chloroquine a augmenté la néogamétocytogenèse des souches résistantes.

Le fait que l'histoire de la maladie détermine grandement la présence et la densité de gamétocytes dès le septième jour de traitement, alors qu'il faut 10-12 jours *in vivo* pour que s'achève l'intégralité de la gamétocytogenèse (5), semble plutôt en faveur de la première et/ou de la deuxième hypothèse.

Dans les zones de chloroquinorésistance, des données recueillies au Mozambique (15) et en Guinée Équatoriale (14) ont aussi montré une augmentation des gamétocytes sept jours après le traitement. Dans les Iles Salomon, la présence de gamétocytes au début du traitement a été un facteur de risque significatif d'une résistance *in vivo* (7). Enfin, chez les patients d'une région endémique du Sri Lanka (6) et dans le Sud-Cameroun (1), une plus grande proportion d'infections chloroquino-résistantes présentait une gamétocytémie comparée aux infections sensibles.

L'ensemble de ces observations suggère que, lorsque des souches sensibles et résistantes coexistent dans la population humaine, la gamétocytémie au décours d'un accès palustre traité à la chloroquine dépend du niveau de résistance de l'infection et favorise ainsi la transmission préférentielle des parasites les plus résistants.

Remerciements

Nous remercions Marcel HOMMEL et Philippe BRASSEUR et les deux lecteurs anonymes pour leurs intéressantes suggestions. Ce travail a reçu un soutien financier du ministère français de la coopération et du développement et de l'ORSTOM (Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération).

Références bibliographiques

1. BOUDIN C, LE HESRAN JY, RINGWALD P, GOUAGNA LC, SAFEUKUI I *et al.*- Comparaison de la gamétocytogenèse *in vivo* chez les souches de *Plasmodium falciparum* chloroquino-sensibles ou résistantes. *Bull Liais Doc OCEAC*, 1966, **29**, 9-15.
2. BUCKLING AJ, TAYLOR LH, CARLTON JMR & READ A - Adaptive changes in *Plasmodium* transmission strategies following

- chloroquine chemotherapy. *Proc R Soc Lond B*, 1997, **264**, 553-559.
3. CHARMOT G, AMAT-ROZE JM, RODHAIN F, LEBRAS J & COULAUD JP - Abord géographique de l'épidémiologie de la chloroquinorésistance de *Plasmodium falciparum* en Afrique Tropicale. *Ann Soc Belge Méd Trop*, 1991, **71**, 187-197.
 4. CHUTMONGKONKUL M, MAIER WA & SEITZ HM - *Plasmodium falciparum*: effect of chloroquine, halofantrine and pyrimethamine on the infectivity of gametocytes for *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Ann Trop Med Parasitol*, 1992, **86**, 103-110.
 5. FIELD JW & SCHUTE PG - The microscopic diagnosis of human malaria II. A morphological study of the erythrocytic parasites. *Studies from the Institute for Medical Research Malaya*, 1954, **24** part II.
 6. HANDUNNETTI SM, GUNewardena DM, PATHIRANA PPSL, EKANAYAKE K, WEERASINGHE S & MENDIS KN - Features of recrudescence chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* infections confer a survival advantage on parasites and have implications for disease control. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996, **90**, 563-567.
 7. HESS FI, IANNUZZI A, LEAFASIA J, COWDREY D, NOTHDURFT HD *et al.*- Risk factors of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Tropica*, 1996, **61**, 293-306.
 8. HOGH B, THOMPSON R, HETZEL C, FLECK SL, KRUSE NAA *et al.*- Specific and nonspecific responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage parasites and observations on the gametocytemia in schoolchildren living in a malaria-endemic area of Mozambique. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, **52**, 50-59.
 9. ICHIMORI K, CURTIS CF & TARGETT GAT - The effects of chloroquine on the infectivity of chloroquine-sensitive and -resistant populations of *Plasmodium yoelli nigeriensis* to mosquitoes. *Parasitology*, 1990, **100**, 377-381.
 10. MOLEZ JF & GAYE O - Un gamétocytocide associé au traitement antipaludique schizontocide sera-t-il bientôt nécessaire en zone de chimiorésistance ? *Méd Trop*, 1997, **57**, 97.
 11. PAYNE D - Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*, 1987, **3**, 241-246.
 12. RAMKARAN AE & PETERS W - Infectivity of chloroquine resistant *Plasmodium berghei* to *Anopheles stephensi* enhanced by chloroquine. *Nature*, 1969, **223**, 635-639.
 13. ROBERT V, MOLEZ JF & TRAPE JF - Gametocytes, chloroquine pressure, and the relative parasite survival advantage of resistant strains of *falciparum* malaria in West Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 1996, **55**, 350-351.
 14. ROCHE J, AYECABA S, BENITO A, MOLINA R & ALVAR J - Evaluation *in vivo* de la chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* en Guinée Équatoriale, 1991-1993. *Bull Liais Doc OCEAC*, 1995, **28**, 73-80.
 15. SCHAPIRA A & SCHWALBACH JFL - Evaluation of four therapeutic regimens for *falciparum* malaria in Mozambique, 1986. *Bull OMS*, 1988, **66**, 219-226.
 16. SINDEN RE, BUTCHER GA, BILLKER O & FLECK SL - Regulation of infectivity of *Plasmodium* to the mosquito vector. *Adv Parasitol*, 1996, **38**, 53-117.
 17. SMALLEY ME - *Plasmodium falciparum* gametocytes: the effect of chloroquine on their development. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1977, **71**, 526-529.
 18. SOKHNA CS, MOLEZ JF, NDIAYE P, SANE B & TRAPE JF - Tests *in vivo* de sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine au Sénégal: évolution de la résistance et estimation de l'efficacité thérapeutique. *Bull Soc Path Ex*, 1997, **90**, 83-89.
 19. TCHUINKAM T, MULDER B, DECHERING K, VERHAVE JP, COT M *et al.*- Experimental infections of *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum* of naturally infected gametocytes carriers in Cameroon: factors influencing the infectivity to mosquitoes. *Trop Med Parasitol*, 1993, **44**, 271-276.
 20. WERNSDORFER WH & PAYNE D - Drug sensitivity tests in malaria parasites. In: *Malaria. Principles and practice of malariology*. WERNSDORFER WH & MCGREGOR I (editors). Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988, **2**, pp. 1765-1800.
 21. WILKINSON RN, NOEYPATIMANONDH S & GOULD DL - Infectivity of *falciparum* malaria patients for anopheline mosquitoes before and after chloroquine treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1976, **70**, 306-307.