

Résistance à la chloroquine et au cycloguanil de *Plasmodium falciparum* chez des patients arrivant en France après un voyage en Afrique sans chimioprophylaxie.

J. Le Bras (1), B. Pradines (2), J. P. di Piazza (1), R. Durand (1), N. Godineau (3), O. Bouchaud (4), R. Roué (5), B. Marchou (6), G. Martet (7), C. Longuet (1) & D. Parzy (2)

(1) Centre national de référence de la chimiosensibilité du paludisme (CNRCP), Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris, France.

(2) Institut de médecine tropicale du service de santé des armées (IMTSSA), Le Pharo, Marseille, France.

(3) Laboratoire de biologie, Centre hospitalier général de Saint Denis, France.

(4) Service des maladies infectieuses, Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris, France.

(5) Service des maladies infectieuses, Hôpital d'instruction des armées Bégin, Saint-Mandé, France.

(6) Service des maladies infectieuses, Hôpital Purpan, Toulouse, France.

(7) Laboratoire de biologie, Hôpital d'instruction des armées Laveran, Marseille, France.

Correspondance et tirés à part : J. Le Bras, Hôpital Bichat Claude Bernard, 75018 Paris. Tél 01 40 25 78 97 ; Fax 01 46 27 02 08 ; e-mail <cnrcp.parasit1@bch.ap-hop-paris.fr>

Manuscrit n° 1977/SMV 9. 3ème Journée biennale de Médecine des voyages. Accepté le 16 décembre 1998.

Summary: *Plasmodium falciparum* Resistance to Chloroquine and Cycloguanil in Patients Returning to France after a Travel in Africa without Chemoprophylaxis.

Key-words: Malaria - Chloroquine - Proguanil - Cycloguanil - Resistance - DHFR - Africa

The in vitro susceptibility of chloroquine and the genomic profile of dihydrofolate reductase (DHFR) codon 108 was determined against african isolates of *P. falciparum* (Pf) from imported malaria cases without previous drug intake by an isotopic microtest or PCR + RFLP. Pf resistance to chloroquine or to the DHFR inhibitor was present in 49% and 46% of isolates, respectively. Pf drug resistance was more frequent in permanent than in seasonal malarial transmission areas and chloroquine plus DHFR resistance reached 28% in years 1995-97. Updating the guidelines for the prevention of malaria in travellers to Africa is necessary.

Résumé :

La sensibilité à la chloroquine et au cycloguanil a été étudiée sur des isolats de *Plasmodium falciparum*, prélevés chez des patients en provenance d'Afrique tropicale n'ayant pas reçu de médicament, par un test isotopique in vitro ou par la mise en évidence de la mutation S108N de la dihydrofolate réductase (DHFR). Une chimiorésistance à la chloroquine ou au cycloguanil est constatée pour près de la moitié des isolats. Les taux les plus élevés de chimiorésistance sont observés dans les pays d'Afrique où la transmission du paludisme est permanente. La fréquence globale de la résistance conjointe à la chloroquine et aux antifoliques se situe à 28 % en 1995-97. Un ajustement des recommandations chimioprophylactiques pour les pays d'Afrique francophone est proposé.

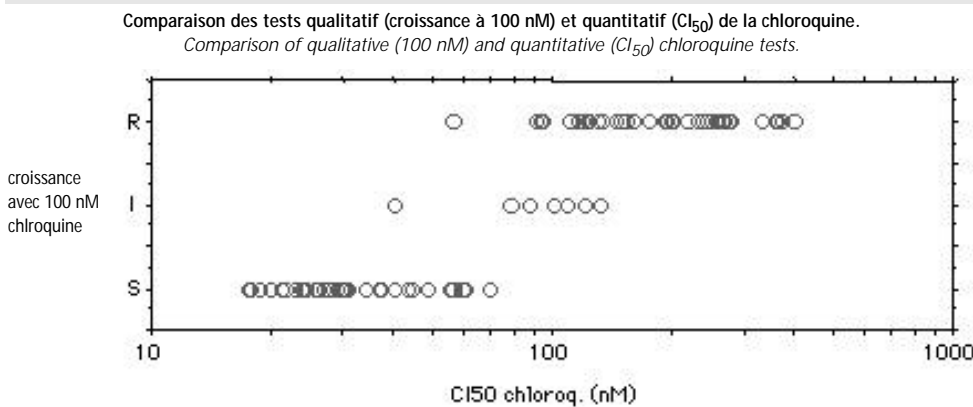
Mots-clés : Paludisme - Chloroquine - Proguanil - Cycloguanil - Chloroquinosensibilité - Résistance - DHFR - Afrique

Introduction

L'essentiel du paludisme importé en France est dû à *Plasmodium falciparum* et provient d'Afrique (9). Une chimioprévention de la phase sanguine par la chloroquine, par un antifolique (proguanil ou pyriméthamine) ou par la méfloquine est satisfaisante, en l'absence de résistance. Une chimioprévention de l'infestation par la primaquine pourrait entraîner une hémolyse sévère chez les sujets déficitaires en G6PD. La communauté médicale s'accorde en majorité pour considérer que le risque potentiel de contracter un paludisme grave lors d'un séjour en Afrique intertropicale surpasse le risque d'effets indésirables d'une chimioprophylaxie. Elle s'accorde plus difficilement sur le choix entre la méfloquine et l'association chloroquine-proguanil pour le traitement préventif. Une difficulté majeure de ce choix tient à l'insuffisance de nos connaissances sur les génotypes de résistance de *P. falciparum* et leur distribution régionale. La résistance de *P.*

falciparum à la chloroquine et au proguanil est observée avec une fréquence variable dans tous les pays d'Afrique tropicale, à Madagascar et aux Comores. La résistance de *P. falciparum* à la méfloquine y reste rare (15). Les recommandations, en France et au Royaume Uni, pour les voyageurs se rendant dans ces régions privilégient une chimioprophylaxie par l'association chloroquine-proguanil (3, 4). Les recommandations françaises classent les pays en groupe 2 si la chloroquino-résistance est minoritaire (Afrique de l'Ouest) et en groupe 3 si la chloroquino-résistance est majoritaire (Afrique de l'Est et Centrale). De 1992 à 1994, une stabilisation de la proportion de chloroquino-résistance était constatée (2), avec parfois de fortes disparités régionales (10). Le mode de résistance aux antifoliques est indépendant de celui à la chloroquine (13, 14). L'association chloroquine + proguanil sera donc inefficace s'il y a bi-résistance. Un phénotype ou un génotype de résistance prédit correctement l'échec thérapeutique ou prophylactique (5, 8).

Figure 1.



Ce travail, réalisé par le Centre national de référence de la chimiosensibilité du paludisme (CNRCP) et l'Institut de médecine tropicale du Service de santé des armées (IMTS-SA), dans le cadre de la surveillance de la chimiosensibilité du paludisme à *Plasmodium falciparum* importé en France, a pour but de proposer un critère décisionnel de classement des pays en groupe 2 ou 3 en fonction de la proportion de bi-résistance chloroquine + proguanil.

Matériel et méthodes

Isolats

Les isolats de *P. falciparum* étudiés de 1995 à 1997 ont pour origine des cas de paludisme d'importation provenant d'hôpitaux français métropolitains (tous les cas observés pour les hôpitaux Bichat-Claude Bernard à Paris, Centre hospitalier général de Saint-Denis, Purpan à Toulouse, Hôpital d'instruction des armées Bégin à Saint-Mandé et HIA Laveran à Marseille). Pour chaque cas de paludisme, les renseignements cliniques exploités sont : le pays d'infestation, la chimioprophylaxie suivie, les traitements antipaludiques antérieurs. Nous n'avons pas retenu pour l'analyse les isolats obtenus de patients pour lesquels une prise chimioprophylactique n'a pas pu être exclue. Ont été écartés, également, les valeurs de sensibilité à la chloroquine des isolats de patients ayant pris de la chloroquine à titre curatif avant le prélèvement et le profil de la dihydrofolate réduction (DHFR) des isolats de patients ayant pris un antifolinique.

Tests in vitro

Une variante simplifiée du semi-microtest isotopique (1) a été utilisée en première intention pour les isolats étudiés à Paris. La chloroquine a été étudiée à la concentration de 100nM considérée, sur la base de l'expérience préalable, comme seuil de résistance. La résistance à une molécule a été considérée quand la croissance à la dose seuil était supérieure à 45%. Les croissances insuffisantes (croissance, dans le témoin sans médicament, inférieure à 3 fois la valeur du bruit de fond) ont été considérées comme des échecs. Le microtest isotopique a été utilisé pour la détermination des concentrations médianes inhibitrices (CI₅₀) de chloroquine. Le microtest et le semi-microtest simplifié sont corrélés ($r^2 = 0,65$) (figure 1).

Tests génomiques

Pour le cycloguanil (métabolite actif du proguanil), la présence d'une mutation du codon 108 (Ser -> Asn) du gène de la dihydrofolate réductase (DHFR) de *P. falciparum* est mise en évidence par un test d'amplification génomique (PCR),

suivi d'une restriction enzymatique (RFLP) (5) ou d'une PCR codon dépendante (12). La présence de la mutation ponctuelle S108N dans le gène de la dihydrofolate réductase est corrélée à la résistance *in vitro* des isolats de *P. falciparum* au cycloguanil. La valeur prédictive du codon 108 déterminée en 1995 était la suivante : 100 % des S108 (forme sauvage) sensibles au cycloguanil, 87 % des S108N résistantes au cycloguanil (6). Les isolats polyclonaux pour le codon 108 (S108 + S108N) sont

considérés comme résistants. Cette technique permet l'étude des prélèvements possédant une faible parasitémie ou présentant des parasites altérés. Une réponse est ainsi possible pour plus de 98 % des échantillons.

Analyse statistique

Les données ont été saisies et analysées avec les logiciels Excel et Statview. La distribution de Fisher-Snédecor a été utilisée pour déterminer l'intervalle de confiance exact du paramètre p de la loi binomiale

$$p = p < P, \text{ avec : } P = \frac{(x+1)F_{/2}^{(2(x+1), 2(n-x))}}{(n-x) + (x+1)F_{/2}^{(2(x+1), 2(n-x))}}$$

$$\text{et } \underline{p} = \frac{x}{x + (n-x+1)F_{/2}^{(2(n-x+1), 2x)}}$$

de la bi-résistance observée, complété avec les proportions manquantes calculées quand la résistance à un seul composé a été déterminée, en considérant comme effectif total celui des données complètes (11).

Résultats

Le phénotype de résistance à la chloroquine et le génotype de résistance DHFR ont été respectivement déterminés pour 231 et 561 isolats répondant aux critères de sélection (tableau I). La proportion de résistance à la chloroquine est de 49%, celle au cycloguanil est de 46 %. Pour l'ensemble des isolats africains étudiés, la proportion observée de résistance simultanée aux deux molécules est de 28 %, avec une disparité entre les pays d'Afrique soudanienne et ceux d'Afrique équatoriale.

Tableau I.

Proportion d'isolats de *P. falciparum* résistants à la chloroquine et au cycloguanil, en l'absence de chimioprophylaxie, parmi les cas de paludisme importé d'Afrique en France de 1995 à 1997.
Proportion of *P. falciparum* isolates resistant to chloroquine and cycloguanil in the absence of chemioprophyllaxy, among malaria cases imported from Africa to France from 1995 to 1997.

	chloroquino-R % (n)	cycloguanilo-R % (n)	% de bi-résistance* (interv. conf. 95%)
Mali	37 (27)	15 (66)	7,7 (0,5 - 23)
Guinée	57 (7)	35 (20)	17 (0,9 - 71)
Sénégal	25 (16)	21 (43)	20 (0,8 - 37)
Burkina Faso	43 (7)	21 (14)	0
Côte d'Ivoire	32 (50)	40 (120)	11 (4,6 - 27)
RI des Comores	44 (9)	51 (35)	25 (2,2 - 64)
R Centrafricaine	40 (15)	76 (21)	18 (1,5 - 49)
Togo	50 (6)	78 (23)	33 (6,1 - 83)
Zaire	57 (7)	73 (15)	43 (9,7 - 81)
Cameroun	63 (27)	70 (67)	53 (24 - 70)
Congo	75 (12)	74 (23)	60 (26 - 85)
Gabon	89 (9)	60 (20)	75 (18 - 86)
Bénin	83 (12)	73 (33)	80 (32 - 92)
autres pays d'Afrique	47 (32)	48 (60)	23 (12 - 45)
total	49 (236)	46 (560)	28 (20 - 32)

*résistance observée aux deux molécules

Discussion

La mutation S108N de la DHFR d'une part, et la croissance *in vitro* à une concentration 100 nM de chloroquine d'autre part, ont une valeur prédictive de l'échec prophylactique supérieure à 85 %.

La distribution des résistances aux antifoliques et à la chloroquine varie notablement selon les pays avec une proportion de bi-résistance faible dans les régions de paludisme saisonnier (Mali, moins de 10 %) et élevée dans les régions de transmission pérenne (Bénin, Gabon, plus de 50 %).

Les modes d'action de la chloroquine et du cycloguanil sur *P. falciparum* diffèrent et les mécanismes de résistance du parasite à ces deux molécules ne sont pas liés (7). L'indépendance de la distribution de la chloroquine-résistance et de la cycloguanil-résistance explique que les valeurs observées de bi-résistance sont souvent très proches du produit des fréquences de résistance à chaque composé (tableau I). Les échantillons d'isolats de *P. falciparum* recueillis en Afrique en 1996, lors d'enquêtes de terrain, permettent de constater une fréquence de bi-résistance similaire à celle du paludisme importé : 7 % à Bobo Dioulasso au Burkina Faso, 18 % à Bingerville en Côte d'Ivoire, 20 % à Dielmo et 36 % à Pikine au Sénégal, 67 % à Libreville au Gabon (JB OUEDRAOGO & B PRADINES, communication personnelle).

Nous proposons un critère décisionnel de classement des pays en fonction de la proportion de bi-résistance chloroquine + proguanil, qui place les pays d'endémie dans le groupe 3, quand une majorité de souches bi-résistantes est observée au cours des 3 années précédentes. Ainsi, en 1998, le Mali, la Guinée, le Sénégal, le Burkina Faso, la Côte d'Ivoire, la République Centrafricaine et la République islamique des Comores sont en groupe 2, cependant que le Cameroun, le Congo, le Gabon et le Bénin sont en groupe 3 ; les données récentes sont en nombre trop limité pour les autres pays, qui restent dans le groupe où ils se situaient antérieurement. Il pourrait être proposé, devant l'augmentation de fréquence de la résistance à la chloroquine et au proguanil, et en l'attente d'un nouveau schéma chimioprophylactique efficace et bien toléré, de renoncer à la chimioprophylaxie tout en renforçant la prévention antivectorielle pour les courts séjours en zone de transmission faible de *P. falciparum*.

Conclusion

Une meilleure connaissance des génotypes de résistance de *P. falciparum* et de leur distribution régionale est nécessaire pour un choix raisonné des régimes de chimioprévention du paludisme en Afrique. Une étude très récente a montré que certains allèles du génotype Pfcg2 sont associés à la résistance biologique à la chloroquine dans plus de 90 % des cas. La bithérapie est une des solutions à la chimiorésistance, mais son efficacité suppose de vérifier que les génotypes de résistance aux composants de l'association sont indépendants et

minoritaires. L'introduction prochaine de nouvelles molécules potentiellement utilisables en prévention ne doit pas faire négliger cette démarche.

Remerciements

Nous remercions les correspondants du CNRCP qui nous ont transmis les isolats de paludisme d'importation. Cette étude a été réalisée par l'AP-HP Hôpitaux de Paris, avec le soutien de la Direction générale de la santé, de l'UREF et de Zeneca-Pharma.

Références bibliographiques

1. BASCO LK & LE BRAS J - *In vitro* susceptibility of Cambodian isolates of *P. falciparum* to halofantrine, pyronaridine and artemisinin derivatives. *Ann Trop Med Parasitol*, 1994, **88**, 131-136.
2. BASCO LK, RINGWALD P, THOR R, DOURY JC & LE BRAS J - Activity *in vitro* of chloroquine, cycloguanil, and mefloquine against African isolates of *P. falciparum*: presumptive evidence for chemoprophylactic efficacy in Central and West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1995, **89**, 657-658
3. BRADLEY DJ & WARHURST DC - Guidelines for the prevention of malaria in travellers from the United Kingdom. *CDR Review*, PHLS editor, 61 Colindale Av. London NW95EQ, 1997, **7**, 137-152.
4. CONSEIL SUPÉRIEUR D'HYGIÈNE PUBLIQUE DE FRANCE - Actualisations des recommandations sanitaires pour les voyageurs. *Bull Épidémiol Hebdom*, 1996, **23**, 101-105.
5. DURAND R, RAMILIARISOA O, SECARDIN Y, DE PÉCOULAS PE, BASCO LK & LE BRAS J - DHFR gene point mutation as a predictor of *Plasmodium falciparum* resistance to cycloguanil in malaria cases from Africa imported to France. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1997, **91**, 460-461.
6. EL DIN DE PÉCOULAS P, BASCO LK, LE BRAS J & MAZABRAUD A - Association between antifol resistance *in vitro* and DHFR point mutation in *P. falciparum* isolates. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996, **90**, 181-182.
7. LE BRAS J, BASCO LK, DE PÉCOULAS PE - Mécanismes et épidémiologie des résistances aux antipaludiques. *CR Soc Biol*, 1996, **190**, 471-485.
8. LE BRAS J & RINGWALD P - Situation de la chimiorésistance de *P. falciparum* en Afrique en 1989. *Med Trop*, 1990, **50**, 11-16.
9. LEGROS F, GAY F, BELKAID M & DANIS M - Situation du paludisme d'importation en France métropolitaine en 1996. *Bull Épidémiol Hebdom*, 1997, **48**, 213-214.
10. LOUIS JP, LOUIS F, TREBUCK A, MIGLIANI R & HENGY C - Intérêt d'une surveillance de la chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* aux antimalariques en Afrique Centrale. *Bull Liais Doc OCEAC*, 1992, **102**, 27-36.
11. MANOUKIAN EB - *Guide de statistiques appliquées*. Hermann, Paris, 1986.
12. PARZY D, DOERIG C, PRADINES B, RICO A, FUSAI T & DOURY JC - Proguanil resistance in *P. falciparum* african isolates assessment by mutation-specific polymerase chain reaction and *in vitro* susceptibility testing. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, **57**, 646-650.
13. SIRAWARAPORN W, SATHITKUL S, SIRAWARAPORN R, YUTHAVONG Y & SANTI DV - Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**, 1124-1129.
14. SU XZ, KIRKMAN LA, FUJIOKA H & WELLEMS TE - Complex polymorphisms in a 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell*, 1997, **91**, 593-603.
15. WERNSDORFER W & PAYNE D - The dynamics of drug resistance in *P. falciparum*. *Pharmacol Ther*, 1991, **50**, 95-121.