

## UN FOYER DE PALUDISME MULTI-RESISTANT EN ZONE FORESTIERE AU CAMEROUN REVISITE 14 ANS APRES

P. AGNAMEY, S.R. MOYOU, P. BRASSEUR, P.F. GALEGA

*Med Trop* 2002; **62** : 141-144

**RESUME** • La sensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine, l'amodiaquine, la quinine et la pyronaridine a été évaluée par la méthode du microtest DELI. L'étude a été menée au Cameroun dans les plantations d'hévéas de la Nyé'eté, situées à 45 km au Sud-Est de Kribi en zone forestière. Le niveau de la résistance *in vitro* à la chloroquine qui était de 56 % en 1986 est resté du même ordre en 2000 (61 %). Le niveau de sensibilité à l'amodiaquine (76,5 %) et à la pyronaridine (89,5 %) est très élevé sur l'ensemble des isolats testés et notamment sur les isolats chloroquino-résistants. La quinine présente encore une bonne activité, avec 80 % d'isolats sensibles malgré un usage intensif sur le site. Ces résultats montrent la relative stabilité de ce foyer de résistance à la chloroquine et le peu de résistance croisée avec l'amodiaquine et la pyronaridine. Ces données ouvrent des perspectives pour un traitement alternatif du paludisme à *Plasmodium falciparum* non compliqué dans les zones de chloroquino-résistance.

**MOTS-CLES** • *Plasmodium falciparum* - antimalariques - résistance - Cameroun.

RE-ASSESSMENT OF MULTIDRUG-RESISTANT MALARIA IN A FOREST ZONE OF CAMEROON 14 YEARS LATER

**ABSTRACT** • *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, amodiaquine, quinine and pyronaridine was assessed using the DELI microtest method in 2000. Isolates were collected on the La Nyé'eté rubber plantations located in a forest zone 45 km southeast of Kribi, Cameroon. Comparison with results of the last survey in 1986 showed that chloroquine resistance has remained stable (61 % versus 56 %). Sensitivity to amodiaquine and pyronaridine was high (76,5 % and 89,5 % respectively) in all isolates including chloroquine-resistant isolates. Despite intensive use in the area, quinine remained highly effective (sensitivity, 80%). These results indicate that chloroquine sensitivity has remained relatively stable in this resistant zone and that little cross-resistance with amodiaquine and pyronaridine has developed. These findings hold the promise for an alternative treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in chloroquine-resistance areas.

**KEY WORDS** • *Plasmodium falciparum* - Antimalarial drugs - Resistance - Cameroon

La diminution de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine dans la plupart des pays d'Afrique rend difficile actuellement le choix d'une thérapeutique pour le traitement du paludisme et constitue un problème majeur de santé publique. L'évolution de la résistance à la chloroquine rend nécessaire une surveillance par des tests de chimiosensibilité *in vivo* et *in vitro*. Au Cameroun, les premiers cas de résistance à la chloroquine sont apparus à Limbé sur la côte ouest dès 1985 (1). Des enquêtes de chimiosensibilité *in vitro* effectuées dans la population de Limbé quelques mois plus tard montraient des pourcentages d'isolats résistants

supérieurs à 50 % (2). En octobre 1985, une autre étude révélait l'existence de quelques isolats résistants à Garoua, ville située en zone sahélienne (3). En 1986, un autre foyer de chloroquino-résistance était identifié en zone forestière au Sud du Cameroun proche de la ville de Kribi (4). Afin de vérifier l'évolution de la chimiorésistance *in vitro* dans ce dernier foyer 14 années plus tard, nous avons entrepris une nouvelle étude en juillet 2000 pour tester l'activité de la chloroquine, l'amodiaquine, la quinine et la pyronaridine sur des isolats frais de *Plasmodium falciparum*.

### MATERIEL ET METHODES

#### Site d'étude

Les plantations d'hévéas de la Nyé'eté sont situées à 45 km au Sud-Est de Kribi en zone forestière. Elles appartiennent à la société G.M.G. Hévécam et couvrent environ 40 000 ha (de 2°33' à 2°48' Nord et de 9°59 à 10°15 Est) La population, constituée en majorité d'employés des plantations et de leurs familles, est d'environ 30 000 habitants, répartis en 15 villages. La population dis-

• Travail du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Rouen (P.A., Chargé de Recherches ; P.B., Professeur); de l'Institut de Recherches Médicales et d'Études des Plantes Médicinales, Yaoundé, Cameroun (S.R.M., Professeur) et de l'Hôpital des Plantations de la Nyé'eté, Kribi, Cameroun (P.F.G., Docteur en Médecine)

• Correspondance : P. AGNAMEY, Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine et Pharmacie, 22 boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex, France  
• Fax : +33 (0) 2 35 14 85 24 • e-mail : patrice.agnamey@wanadoo.fr

• Article reçu le 31/05/2001, définitivement accepté le 21/05/2002.

pose d'un hôpital moderne relayé au niveau de chaque village par un dispensaire dirigé par un infirmier et régulièrement approvisionné en médicaments de première nécessité.

### Isolats de *Plasmodium falciparum*.

L'étude a été menée dans 4 villages et à l'hôpital de la plantation parmi les consultants. Les participants étaient en majorité des enfants âgés de 2 à 10 ans. Le dépistage de porteurs non symptomatiques de *Plasmodium falciparum* dans la population a été fait par l'examen au microscope de frottis sanguins colorés par la méthode de May Grunwald - Giemsa. Les sujets présentant une parasitémie supérieure à 0,1 % ont été enrôlés dans l'étude après avoir obtenu leur consentement éclairé. Les critères d'inclusion dans une étude de chimiosensibilité *in vitro* ont été décrits par ailleurs (2). Un prélèvement sanguin veineux de 2 ml a été effectué sur EDTA et placé à 4° C. Les tests de chimiosensibilité ont été effectués au laboratoire de l'hôpital de la Nyé'été dans un délai maximum de 8 heures après le prélèvement.

### Test de sensibilité *in vitro*.

#### • Culture du parasite

La détermination de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* aux antimalariques *in vitro* a été effectuée par la méthode colorimétrique du microtest DELI (Double-site enzyme-linked Lactate deshydrogenase enzyme immunodetection assay) basé sur l'immunodosage de la lactico-déshydrogénase spécifique du parasite (pLDH) libérée lors de sa croissance (5, 6). Les isolats de *Plasmodium falciparum* ont été cultivés en duplicate en milieu RPMI 1640 avec 0,5 % d'albumax (Gibco BRL Grand Island, NY) et 0,1 mg / l d'hypoxanthine (NEN, Boston ; MA. USA), en présence de concentrations décroissantes des molécules testées selon une méthode précédemment décrite (2). Après incubation dans une jarre à bougie pendant 48 h à 37°C et en milieu humide, les plaques étaient congelées à -20°C. Après 3 congélations et décongélations successives, la pLDH contenue dans l'hémoly s at était dosée par la méthode DELI.

#### • Réaction ELISA (DELI-test)

Le dosage de la pLDH dans les hémoly s ats de cultures utilise 2 anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes différents de l'enzyme et a été décrit antérieurement (7). Brièvement, 100 µl d'une dilution en tampon PBS (pH 7,4) de l'anticorps anti-pLDH (MAb-17E4) est distribué dans chaque puits d'une plaque de 96 puits (Nunc Maxisorb, Danemark). Les plaques sont incubées une nuit à 4°C. Après lavage, les plaques sont saturées avec du tampon PBS-Sérum Albumine Bovine à 1 % (PBS-SAB) pendant 4 h à la température du laboratoire. Le tampon est rejeté et l'on ajoute 100 µl de la dilution d'hémoly s at de la culture. Après 1 h d'incubation à 37°C, les plaques sont lavées et l'on ajoute 100 µl de la dilution de l'anticorps anti-pLDH (MAb-19G7) biotinylé. Après 1 h d'incubation à 37°C et lavage, on introduit dans chaque puits 100 µl de Streptavidine peroxydase diluée que l'on incube pendant 30 mn à la température du laboratoire. La plaque est ensuite lavée et l'on ajoute 100 µl d'un mélange à partie égale (v/v) d'une solution de substrat (3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine) et d'une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,02 %. La réaction est arrêtée par addition de 100 µl dans chaque puits d'acide phosphorique 0,1M. La lecture des DO se fait au spectrophotomètre à 450 nm.

### Analyse et expression des résultats

Les résultats ont été exprimés en concentration inhibitrice 50 % (CI<sub>50</sub>), concentration d'antimalarique correspondant à la DO égale à la moitié de celle des témoins. Les moyennes géométriques (m) des CI<sub>50</sub> ont été calculées avec un intervalle de confiance de 95 % (IC). La comparaison entre les valeurs des CI<sub>50</sub> obtenues pour les isolats sensibles et les isolats résistants à la chloroquine a été effectuée par le t-test de Student. Les isolats ayant une CI<sub>50</sub> > 100 nM pour la chloroquine, >30 nM pour l'amodiaquine et > 500 nM pour la quinine ont été considérés comme résistants. Pour la pyronaridine, les isolats présentant une CI<sub>50</sub> > 15 nM étaient considérés comme peu sensibles bien qu'il n'existe pas actuellement de données permettant une corrélation avec l'effet thérapeutique *in vivo*.

## RESULTATS

L'enquête a été réalisée au mois de juillet 2000 pendant la saison des pluies. L'examen parasitologique a été mené chez 87 sujets asymptomatiques âgés de 2 à 55 ans (âge moyen : 11 ans). Parmi eux, 29 étaient porteurs de *Plasmodium falciparum* avec des parasitémies de 0,1 à 4 % (m : 1,1 %). Sur 29 échantillons de sang testés, 18 ont été interprétables pour la chloroquine, 17 pour l'amodiaquine, 15 pour la quinine et 19 pour la pyronaridine.

Les CI<sub>50</sub> obtenues pour la chloroquine étaient comprises entre 8 et 1313 nM (m : 202 nM ; IC95 %, 197-207 nM.). Les CI<sub>50</sub> pour l'amodiaquine étaient comprises entre

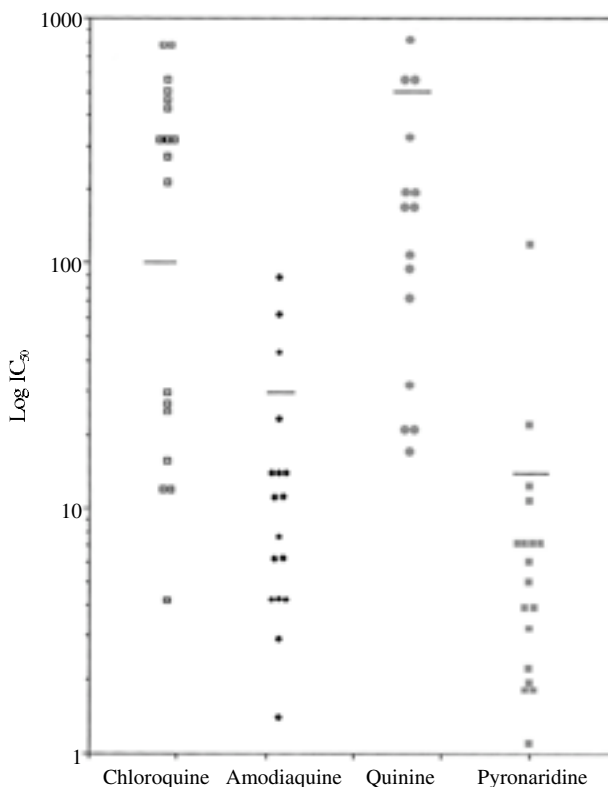


Figure 1 - Répartition des valeurs de CI<sub>50</sub> des molécules antimalariques testées sur des isolats frais de *Plasmodium falciparum* en 2000 (\_\_\_\_ : limite de sensibilité).

2 et 123 nM (m : 14,5 nM ; IC 95 %, 11,6-17,4 nM). Les  $CI_{50}$  de la quinine étaient comprises entre 21 et 1010 nM (m : 147 nM ; IC 95 %, 144 - 150 nM). Les  $CI_{50}$  pour la pyronaridine étaient comprises entre 1,1 et 21,9 nM (m : 5,5 nM ; IC 95 %, 2,7-8,3 nM). La distribution des valeurs de  $CI_{50}$  (Fig. 1) montre que 61 % (11/18) des isolats testés sont résistants à la chloroquine ; 17,6 % (3/17) à l'amodiaquine ; 20 % (3/15) présentent une sensibilité diminuée à la quinine et 10,5 % (2/19), une sensibilité diminuée à la pyronaridine.

Les activités de la chloroquine, amodiaquine et pyronaridine ont été simultanément testées avec succès sur 15 isolats dont 4 sont sensibles à la chloroquine (m : 26,0 nM ; IC 95 %, 24,2-27,8 nM). Sur 11 isolats résistants à la chloroquine (m : 744,0 nM ; IC 95 %, 742,5-745,5 nM), 8 (73 %) sont sensibles à l'amodiaquine et 9 (82 %) présentent une forte susceptibilité à la pyronaridine. Si l'on compare la sensibilité à l'amodiaquine des isolats chloroquino-sensibles et celle des résistants, on observe que ces derniers sont moins sensibles à l'amodiaquine (m : 25,4 nM ; IC 95 %, 23,1-27,8 nM versus m : 5,0 ; IC 95 %, 3,3-5,7 nM) que les isolats chloroquino-sensibles ( $0,025 < p < 0,05$ ). De même les  $CI_{50}$  moyennes pour la pyronaridine sont plus élevées pour les isolats résistants à la chloroquine que pour ceux qui sont chloroquino-sensibles (m : 8,3 nM ; IC 95 %, 5,6-11,0 nM versus m : 3,1 nM ; IC 95 %, 0,6 - 5,6 nM) ( $0,1 < p < 0,375$ ). Par ailleurs, les valeurs de  $CI_{50}$  observées pour la chloroquine en 1986 (m : 150,6 nM ; IC 95 %, 146,0-155,2 nM) diffèrent de celles qui étaient obtenues en 2000 ( $0,1 < p < 0,375$ ). La même observation a été faite en ce qui concerne les valeurs de  $CI_{50}$  obtenues pour la quinine (m : 265 nM ; IC 95 %, 263-267 nM) en 1986 ( $0,1 < p < 0,375$ ) (Fig. 2).

## DISCUSSION

Bien que les nombres d'isolats testés dans les 2 études restent relativement faibles pour en tirer des conclusions définitives, il apparaît cependant que le niveau de la résistance *in vitro* de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine sur le foyer de la Nyé'eté au Cameroun est resté stable depuis 14 ans (Fig. 2). Il était de 56 % en 1986 et s'est révélé à 61 % en 2000. La différence de méthodologie entre le microtest isotopique utilisé en 1986 (4) et le microtest DELI que nous avons utilisé en 2000 permet de comparer les résultats en raison de la bonne corrélation existant entre les 2 méthodes. Avec le microtest isotopique, l'évaluation du test est obtenue par la mesure de l'incorporation d'un nutriment radiomarqué (hypoxanthine tritiée), alors qu'avec le microtest DELI on mesure la production d'un métabolite (pLDH). Les essais comparatifs effectués par Druilhe (7) ont montré une étroite corrélation entre les 2 méthodes aussi bien avec le clone chloroquino-sensible 3D7 de *Plasmodium falciparum* ( $CI_{50}$  15,1 nM déterminé par le microtest isotopique et  $CI_{50}$  15,7 nM par le microtest DELI) qu'avec la souche chloroquino-résistante PA (FUP/C) de *Plasmodium falciparum* ( $CI_{50}$  : 387,5 nM déterminé par le microtest isotopique et  $CI_{50}$  : 396,1 nM par le microtest DELI).

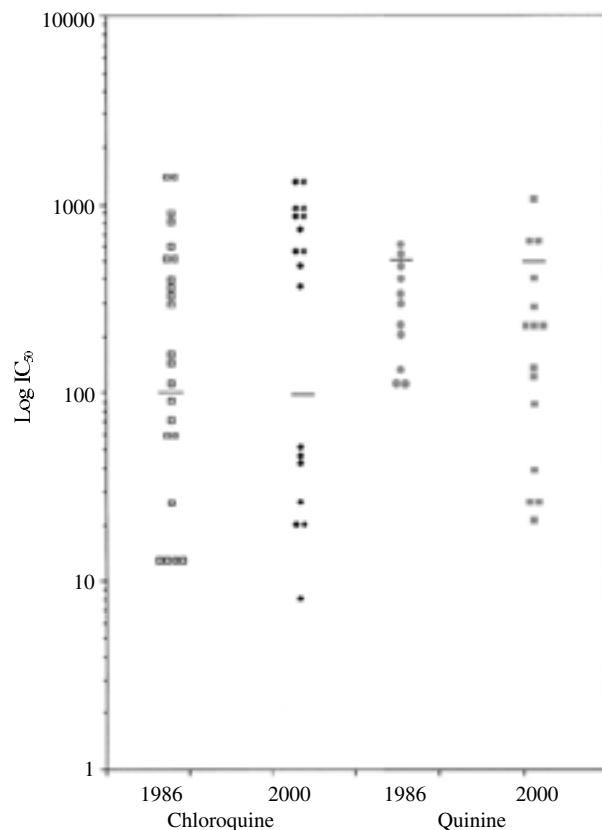


Figure 2 - Comparaison entre les répartitions des valeurs de  $CI_{50}$  de la chloroquine et de la quinine testées en 1986 et en 2000 sur des isolats frais de *Plasmodium falciparum* (— : limite de sensibilité).

Par ailleurs, les activités de la chloroquine, la quinine, la méfloquine et de l'artésunate de sodium ont été testées par les 2 méthodes sur 6 souches et 8 isolats de *Plasmodium falciparum*. Les coefficients de corrélation (r) observés étaient de 0,96 pour la chloroquine, la méfloquine et l'artésunate et de 0,95 pour la quinine. Dans une autre étude comparative, effectuée dans les conditions de terrain au Sénégal et au Burkina Faso (8), le coefficient de corrélation entre les 2 méthodes était de 0,79. Bien que les nombres d'isolats testés dans les 2 études soient limités, on observe cependant que la distribution des  $CI_{50}$  de chloroquine était continue en 1986, alors qu'en 2000, les  $CI_{50}$  étaient réparties en 2 spots de part et d'autre de la limite de sensibilité à la chloroquine (Fig. 2). La sensibilité à la quinine reste bonne malgré un usage de plus en plus grand par voie intramusculaire, ce qui est déjà observé en Asie depuis plusieurs décennies (9). Ceci peut s'expliquer par sa courte demi-vie limitant un contact prolongé du parasite à de faibles doses d'antimalarique favorisant l'apparition de mutants résistants. Par ailleurs, l'usage par voie injectable a l'intérêt de limiter l'automédication. L'étude montre peu de résistance croisée entre la chloroquine et l'amodiaquine bien qu'étant tous les deux des amino-4-quinoléines. Ce résultat confirme en plus l'efficacité de l'amodiaquine en zone de chloroquino-résistance comme cela a été déjà montré dans d'autres pays d'Afrique de l'Est (10, 11), du Centre (12) ou de l'Ouest (13, 14). L'amodiaquine reste

donc une alternative possible de traitement dans les régions de forte résistance à la chloroquine, mais son utilisation intensive en monothérapie risque fort de faire apparaître des résistances rapidement. De récents essais d'utilisation en association avec l'artésunate donnent des résultats encourageants (Communication personnelle). L'amodiaquine a un coût modéré et présente peu d'effets indésirables en thérapeutique. La pyronaridine reste également très active *in vitro* et *in vivo* comme cela a été déjà montré au Cameroun (15, 16) et *in vitro* au Sénégal (14). Là encore, une monothérapie n'est pas souhaitable si l'on veut préserver cette molécule et une bithérapie lors de son introduction serait souhaitable. Son association avec la pyriméthamine-sulfadoxine a été utilisée en Chine avec d'excellents résultats pour le traitement du paludisme non compliqué à *Plasmodium falciparum* (17).

### CONCLUSION

En conclusion, l'étude montre que 14 ans après la découverte du foyer de chloroquinorésistance de la Nyé'été, ce dernier est resté remarquablement stable de même que la sensibilité à la quinine. L'étude effectuée en 2000 montre en outre que sur 11 isolats résistants à la chloroquine, 8 sont parfaitement sensibles à l'amodiaquine et 9 à la pyronaridine. Ces résultats obtenus chez des sujets asymptomatiques mériteraient d'être confirmés sur des isolats de sujets symptomatiques afin d'envisager l'utilisation de l'amodiaquine et de la pyronaridine dans de nouveaux schémas thérapeutiques sur le site. Il a été obtenu le niveau d'activité effective de 3 antimalariques standards: la chloroquine, l'amodiaquine et la quinine ■

**Remerciements** • Nous remercions M. Samuel Kamdem responsable du laboratoire d'analyses médicales et sa chaleureuse équipe pour leur accueil. L'étude a été réalisée dans le cadre d'un contrat d'Action Concertée financé par la Commission Européenne (Grant n° 98-0355).

### REFERENCES

- 1 - SANSONETTI MJ, LE BRAS J, VERDIER F *et Coll* - Chloroquinorésistant *Plasmodium falciparum* in Cameroon. *Lancet* 1985; **1** : 1154-1155.
- 2 - BRASSEUR P, DRUILHE P, KOUAMOOU J *et Coll* - High level of sensitivity to chloroquine of 72 *Plasmodium falciparum* isolates from Southern Cameroon in January 1985. *Am J Trop Med Hyg* 1986; **35** : 711-716.
- 3 - BRASSEUR P, DRUILHE P, KOUAMOOU J *et Coll* - Emergence of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance in the sahel part of west Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; **81** : 162-163.
- 4 - KOUAMOOU J, ENYONG P, BRASSEUR P *et Coll* - Nouveau foyer de paludisme chloroquinorésistant en zone forestière au Cameroun. *Bull Soc Pathol Exot* 1987; **80** : 452-458.
- 5 - MAKLER MT, RIES JM, WILLIAMS JA *et Coll* - Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am J Trop Med Hyg* 1993; **48** : 739-741.
- 6 - MAKLER M.T. & HINRICHS D. J. - Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg* 1993; **48** : 205-210.
- 7 - DRUILHE P, MORENO A, BLANC C *et Coll* - A colourimetric *in vitro* - sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 2001; **64** : 233-241.
- 8 - MORENO A, BRASSEUR P, CUZIN-OUATTARA N *et Coll* - Evaluation under field conditions of the colourimetric DELI-microtest for the assessment of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; **95** : 100-103.
- 9 - PUKRITTAYAKAMEE S, SPANARANOND W, LOOAREESUWAN P *et Coll* - Quinine in severe falciparum malaria: evidence of declining efficacy in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; **88** : 324-327.
- 10 - WATKINS W, SPENCER HC, KARIUKI D M *et Coll* - Effectiveness of amodiaquine as treatment for chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* infections in Kenya. *Lancet* 1984; **i** : 357-359.
- 11 - NEVILL CG, VERHOEFF FH, MUNAFU CG *et Coll* - A comparison of amodiaquine and chloroquine in the treatment therapy of falciparum malaria in Kenya. *East Afr Med J* 1994; **71** : 167-170.
- 12 - BRASSEUR P, AGNAMEY P, EKOBO AS *et Coll* - Sensitivity of *Plasmodium falciparum* to amodiaquine and chloroquine in central Africa: a comparative study *in vivo* and *in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; **89** : 528-530.
- 13 - R ACCURT CP, AROUKO H, DJOSSOU F *et Coll* - Sensibilité *in vivo* du *Plasmodium falciparum* à l'amodiaquine dans la ville de Cotonou et ses environs. *Med Trop* 1990; **50** : 21-26.
- 14 - PRADINES B, TALL A, PARZY D *et Coll* - *in vitro* of pyronaridine and amodiaquine against african isolates (Sénégal) of *Plasmodium falciparum* in comparison with standard antimalarial agents. *J Antimicrob Chemoter* 1998; **42** : 333-339.
- 15 - RINGWALD P, BICKII J., BASCO L. K. - *in vitro* of antimalarials against clinical isolates of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop. Med Hyg* 1996; **55** : 254-258.
- 16 - RINGWALD P., BICKII J. BASCO L.K. - Randomised trial of pyronaridine *versus* chloroquine for acute uncomplicated falciparum malaria in Africa. *Lancet* 1996; **347** : 24-28.
- 17 - SHAO BR, HUANG ZS, SHI XH *et Coll* - A 5-year surveillance of sensitive *in vivo* of *Plasmodium falciparum* to pyronaridine, sulfadoxine, pyrimethamine in Dioula area, Hainan Province. *Southeast Asian J Trop Med Publ Hlth* 1991; **22** : 65-67.