

CHIMIORESISTANCE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* SUR LES REGIONS COTIERES MALGACHES

M. RANDRIANARIVELOJOSIA, L. RAHARIMALALA, A. RANDRIAMANANTENA, R. JAMBOU.

RESUME • La chloroquine demeure l'antipaludique de première ligne pour le traitement des accès palustres simples à Madagascar. Néanmoins, la progression de la chloroquinorésistance peut compromettre dans l'avenir cette politique de lutte contre le paludisme. Cette étude, réalisée en 1997, a eu pour but d'évaluer l'efficacité de l'association sulfadoxine-pyriméthamine *versus* chloroquine dans la prise en charge des accès palustres simples à *Plasmodium falciparum*. Elle a été réalisée dans quatre sites des régions côtières malgaches, zones de transmission permanente de paludisme. Le taux de prévalence du paludisme a été mesuré de 15 p. 100 à 22 p. 100 chez les écoliers et de 24 p. 100 à 72 p. 100 chez les consultants de dispensaires en recrutement passif. Les quatre espèces de *plasmodium* pathogènes pour l'homme ont été détectées, *Plasmodium falciparum* étant responsable de 83 p. 100 des cas de paludisme. Le test *in vivo* de chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine, selon le protocole de test standard simplifié de l'OMS de 7 jours, a été réalisé chez 149 patients. Les 35 tests réalisés chez les écoliers n'ont pas mis en évidence de résistance, alors que 17 cas de résistance type R1+R2 ont été notés sur 114 tests réalisés chez des consultants soit 14,9 p. 100 des cas. Parmi les 90 tests *in vitro* réalisés pour la résistance à la chloroquine, quatre isolats soit 4,4 p. 100 étaient résistants. Concernant la sulfadoxine-pyriméthamine, 45 des 46 tests *in vivo* réalisés chez des consultants n'ont pas montré de résistance à cette molécule. L'efficacité de l'association sulfadoxine-pyriméthamine a été supérieure à celle de la chloroquine ($p = 0,02$) et cette association pourrait constituer un relais à la chloroquine.

MOTS-CLES • *Plasmodium falciparum* - Chloroquine - sulfadoxine-pyriméthamine - Résistance - Madagascar.

DRUG RESISTANCE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN COASTAL AREAS OF MADAGASCAR

ABSTRACT • Chloroquine is still the drug of choice for first-line treatment of uncomplicated malaria in Madagascar. However development and spread of chloroquine-resistance could compromise this therapeutic strategy in the future. The purpose of this 1997 study was to compare the efficacy of combined treatment using sulfadoxine and pyrimethamine and single-agent treatment using chloroquine for management of uncomplicated malaria. Study data were collected at four sites in coastal areas of Madagascar where transmission of malaria is perennial. Prevalence of malaria ranged from 15 p. 100 to 22 p. 100 in school children and from 24 p. 100 to 72 p. 100 in outpatient consulting spontaneously at community health centers. All four *Plasmodium* species affecting man were identified. *Plasmodium falciparum* was involved in 83 p. 100 of cases. *In vivo* testing of the susceptibility of *Plasmodium falciparum* to chloroquine was performed in 149 patients according to the standard simplified 7-day protocol of the WHO. The 35 tests in school children demonstrated no evidence of resistance. However type R1 + R2 resistance was noted in 17 of the 114 tests performed on outpatients, i.e. 14.9 p. 100. *In vitro* testing demonstrated chloroquine resistance in four of the 90 specimens tested, i.e. 4.4 p. 100. With regard to combined sulfadoxine/pyrimethamine treatment, 45 of 46 *in vivo* tests in outpatients showed no evidence of resistance. Combination treatment was more effective than single-agent treatment ($p=0.02$) and could offer an effective alternative for future use.

KEY WORDS • *Plasmodium falciparum* - Chloroquine - Sulfadoxine pyrimethamine - Resistance - Madagascar.

Med. Trop. • 2000 • 60 • 243-249

Le paludisme est un problème de santé publique à Madagascar. Il est stable sur la côte est de l'île alors qu'il est stable, mais avec une recrudescence saisonnière correspondant à la saison des pluies sur la côte ouest et instable sur les Hautes Terres centrales et ses marges (1, 2). Les régions

côtières malgaches sont des zones où la consommation d'antipaludiques dont la chloroquine (CQ) est importante. Cette situation est préoccupante car la CQ est l'antipaludique de première intention mis en œuvre par le Programme National de Lutte contre le paludisme (PNLP). Elle est aussi préconisée pour la prophylaxie chez la femme enceinte, et chez les voyageurs en association avec le proguanil. Les régions côtières sont d'ailleurs les zones les plus touristiques de l'île et des visiteurs y sont régulièrement impaludés. Ces régions côtières pourraient aussi être les voies de pénétration à Madagascar des souches parasitaires provenant d'Afrique et d'Asie.

• Travail du Laboratoire du Paludisme (R.M., R.L., Assistants de recherche; R.A., Médecin de terrain; R.J., Chargé de recherche, Chef de Service) de l'Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo, Madagascar.

• Correspondance : R. JAMBOU, Unité d'Immunologie, Institut Pasteur, BP 220, Dakar, Sénégal • Fax : 00 221 839 92 10 • e-mail : rjambou@pasteur.sn •

• Article reçu le 10/12/1999, définitivement accepté le 10/11/2000.

La baisse de sensibilité aux amino-4-quinoléines des souches de *Plasmodium falciparum* a ainsi déjà été rapportée à Madagascar (2-4). Dans le cadre de la réévaluation de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* aux médicaments de première et de deuxième lignes, une étude de chimiosensibilité *in vitro* et *in vivo* à la CQ et à l'association sulfadoxine-pyriméthamine (SP) a été réalisée dans quatre sites côtiers de février à août 1997. Ces sites ont été choisis pour comparer les situations des zones rurales, semi-urbaines et touristiques. Ces zones posent des problèmes très différents aux équipes du PNL.

MATERIEL ET METHODES

Lieux d'étude.

Les plaines de Marovoay se trouvent dans la partie nord-ouest de Madagascar. Cette région est traversée par trois cours d'eau permanents qui se jettent dans la rivière de Betsiboka. Ces plaines, au climat tropical semi-humide, avec une pluviométrie annuelle moyenne de 1500 mm, sont caractérisées par une saison sèche de mai à octobre et une saison des pluies de novembre à avril. La température moyenne annuelle est de 27°C (minimum : 16,4°C ; maximum : 35,8°C). Les plaines de Marovoay comptent 13 000 hectares de rizières bien irriguées et un vaste programme d'amélioration rizicole a été lancé depuis quelques années. La riziculture domine ainsi le paysage et occupe la plus grande partie du terroir villageois. C'est une des raisons pour lesquelles des migrants des régions non-impaludées des Hautes Terres centrales viennent s'y installer ou y sont employés de façon saisonnière. La morbi-mortalité due au paludisme pose un problème chez ces travailleurs. On enregistre en moyenne dans les villages de ces plaines vingt piqûres infectantes par homme et par an contre une à trois dans les régions limitrophes de Hautes Terres centrales. *Anopheles funestus* est le principal vecteur du paludisme à Marovoay où il prédomine de juin à août. Parallèlement, le niveau de transmission du paludisme est maximum entre juin et octobre. Cependant la présence d'*Anopheles arabiensis* permet le maintien de la transmission toute l'année.

Nosy Be est une île volcanique au relief peu marqué, située au nord-ouest de Madagascar. Nosy Be figure parmi les pôles touristiques malgaches. C'est une région de polyculture canne à sucre, riz, maïs, cultures vivrières, ilang-ilang dont le climat est tropical humide : 2000 mm de précipitations par an, température moyenne annuelle de 22°C à 26°C en juillet et 28°C en mars. Le paludisme y est endémique tout au long de l'année. Un commerce régulier et traditionnel existe entre cette région et les Comores, voire Zanzibar, deux régions de forte prévalence de chloroquinorésistance.

Sainte Marie est une île formée par une bande de terre de faible altitude de 60 km de long sur cinq à six km de large. Sa superficie est de 250 km². C'est un site très touristique de la côte est de Madagascar à environ 120 km au nord de Toamasina. Le climat est humide et chaud. Les températures moyennes mensuelles sont en permanence supérieures à 20°C. Les précipitations annuelles réparties sur les 12 mois de l'année sont supérieures à 2500 mm. La transmission du paludisme

se fait tout au long de l'année, même pendant l'hiver, période de grande affluence touristique, en relation avec la migration des baleines.

Toamasina est un chef lieu de province de la côte est malgache. Il s'agit d'une région au climat tropical humide caractérisée par une forte transmission du paludisme. La pluviométrie moyenne annuelle est 3 400 mm et la température annuelle moyenne est au dessus de 20°C. Toamasina est le seul port international malgache. De ce fait, la surveillance de la chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* dans cette région s'avère importante devant la possibilité d'importation de souches de plasmodies résistantes.

Population étudiée.

Deux groupes de patients ont été l'objet des investigations. Le premier groupe était constitué par les consultants sans distinction d'âge ni de sexe, fébriles ou présentant une notion de fièvre dans les 48 heures qui précédaient la consultation dans les différents dispensaires publics urbains et ruraux ou aux centres médicaux privés de Marovoay, Nosy Be, Sainte Marie et Toamasina. Le deuxième groupe comportait des élèves de la classe de 11^e, âgés de 5 ans à 16 ans, des écoles primaires publiques de Marovoay et Sainte Marie.

Chaque individu des deux groupes a bénéficié d'un examen clinique avec prise de température, palpation de la rate et pesée, et d'un examen parasitologique par prélèvement sanguin au bout du doigt permettant la confection de frottis et de gouttes épaisses. Après consentement éclairé des patients, de ceux des parents ou de celui de l'accompagnateur pour les enfants de moins de cinq ans, un prélèvement veineux a été réalisé chez les sujets âgés de plus de deux ans et ayant une parasitémie supérieure à 1500 trophozoïtes par microlitre de sang (tpm) pour l'étude de la chimiosensibilité des parasites par test *in vitro*. A Toamasina, les examens cliniques, la prise en charge des patients présentant un accès palustre confirmés lors de ces dépistages et le suivi des malades ont été assurés par les médecins des dispensaires eux-mêmes. Seule l'étude de la chimiosensibilité *in vitro* a été réalisée par notre équipe lors de cette enquête.

Méthode

Le test de chimiosensibilité *in vitro* de l'activité anti-plasmodiale de la chloroquine a été conduit selon la technique du semi-microtest isotopique décrite par Desjardins et Coll. (5) et adaptée par Le Bras et Coll. (6). Le sang prélevé sur ACD a été centrifugé à 1 800 t/mn pendant dix minutes. Après avoir éliminé le surnageant, le culot de globules rouges parasités a été lavé trois fois en RPMI 1640 (GIBCO France). Les tests ont été effectués dans des plaques de culture de 96 puits à fond plat. Les dilutions de chloroquine (12,5 nM à 1600 nM) ont été préalablement réparties sur les plaques. Dans chaque puits 200 µL de suspension d'hématies parasitées ont été distribués, diluée en RPMI 1640 supplémenté par 25 mM de bicarbonate, 25 mM de Hepes et 10 p. 100 de sérum humain décomplémenté de groupe érythrocytaire AB rhésus positif. La parasitémie initiale est de 2 000 à 25 000 trophozoïtes par microlitre. Une dilution avec des globules rouges non infestés de groupe

Tableau I - Données cliniques et parasitologiques recueillies chez les 2191 sujets examinés lors de l'enquête sur la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*, en 1997 à Madagascar.

	Dispensaires (n = 1360)				Ecoles (n = 831)	
	Marovoay	Nosi be	Ste Marie	Toamasina	Marovoay	Ste Marie
Nombre de patients inclus	438	523	248	151	532	299
Moyenne d'âge (an)	15,9	18,3	10,7	28	8,8	9,1
Âges extrêmes (an)	0,2-85	0,3-80	0,1-70	0,7-64	5-16	5-14
Nombre de sujets fiévreux	283	192	217	70	152	39
Porteurs de plasmodium n (p. 100)	154 (35)	127 (24,3)	179 (72,2)	42 (27,8)	81 (15,2)	66 (22,1)
<i>Plasmodium falciparum</i>	124	101	171	41	42	55
<i>Plasmodium malariae</i>	25	18	7	0	39	11
<i>Plasmodium ovale</i>	1	8	1	0	0	0
<i>Plasmodium vivax</i>	4	0	0	1	0	0
Proportion de sujets fiévreux porteurs de plasmodium n (p. 100)	139 (49)	63 (32,8)	153 (70,5)	23 (33)	19 (21,5)	15 (38,5)

0 rhésus positif a été faite quand les charges parasitaires étaient élevées. Les plaques ont été incubées à 37°C dans une atmosphère microaérophile pour une durée totale de 42 heures. L'hypoxanthine a été ajoutée à raison de 0,5 µCi par puits après 18 heures d'incubation pour évaluer le taux de croissance des parasites. Le contenu des puits a été collecté sur filtre en fibre de verre. Une fois séché, le filtre a été imbibé avec 2 mL de liquide scintillant (Amersham Corporation USA) et la radioactivité mesurée à l'aide d'un compteur à scintillations Wallac microBeta. Les résultats ont été évalués en concentration inhibitrice 50 p. 100 (CI₅₀) et en concentration inhibitrice 90 p. 100 (CI₉₀) à partir de la courbe effet-concentration transformée en une droite de régression du probit du pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme des concentrations. Par cette méthode, la valeur de la CI₅₀ déterminant le seuil de sensibilité des isolats à la chloroquine est fixée à 100 nM.

Les tests de chimiosensibilité *in vivo* ont été réalisés selon le protocole de test standard simplifié de l'OMS (7, 8). L'enrôlement des sujets s'est fait après lecture des frottis. Dans les dispensaires où le dépistage était passif, ont été inclus les sujets ayant une température axillaire supérieure à 37,5°C associée à une parasitémie supérieure à 1 500 tpm de sang, qui ne présentaient ni signe de gravité ni contre indication à l'administration par voie orale des médicaments. L'étude a été menée en simple aveugle. Les sujets porteurs de numéros pairs ont été traités par l'association SP par voie orale à la dose unique de 12,5 mg de sulfadoxine et 250 mg de pyriméthamine par 10 Kg de poids à J0, sans excéder la dose de 1,5 g de pyriméthamine. Les sujets de numéros impairs, les nourrissons de moins d'un an et les femmes enceintes ont été traités par 25 mg/Kg de CQ répartis sur trois jours soit le schéma 10 mg/Kg, 10 mg/Kg, 5 mg/Kg. Les écoliers âgés de 6 ans à 14 ans, pour lesquels le dépistage était actif, ont été examinés et ont tous reçu 10 mg/Kg de chloroquine. Ceux chez qui une parasitémie supérieure à 1 500 tpm a été observée ont reçu une dose de chloroquine de 25 mg/Kg répartie sur trois jours. Le suivi

clinique et biologique a été le même pour les deux groupes : suivi quotidien de J0 à J2 et contrôle à J4 et à J7, avec prise de température et réalisation d'un frottis mince et de goutte épaisse.

Analyse statistique

Le test du χ^2 a été utilisé pour toutes ces comparaisons de données qualitatives. Le niveau de signification a été déterminé à 5 p. 100.

Résultats.

Au total, 2 191 patients ont été examinés au cours de cette étude, dont 1 360 consultants des dispensaires et 831 écoliers (Tableau I). Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes chez qui ont été réalisés des tests *in vitro* et *in vivo*. La proportion de consultants porteurs de splénomégalie de score supérieur à 1 est indiquée à la figure 1. Le nombre de cas de paludisme qui ont été diagnostiqués a été de 649 soit 29,6 p. 100 des sujets inclus. Au total, 147 écoliers étaient porteurs de parasites dont 125 étaient asymptomatiques.

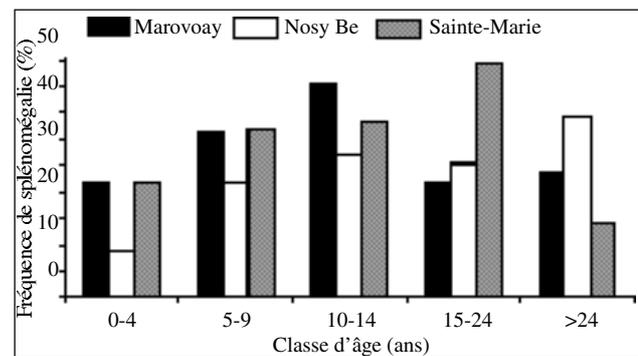


Figure 1 - Splénomégalie de score supérieur à 1, selon l'âge chez les consultants des dispensaires, en 1997 à Madagascar.

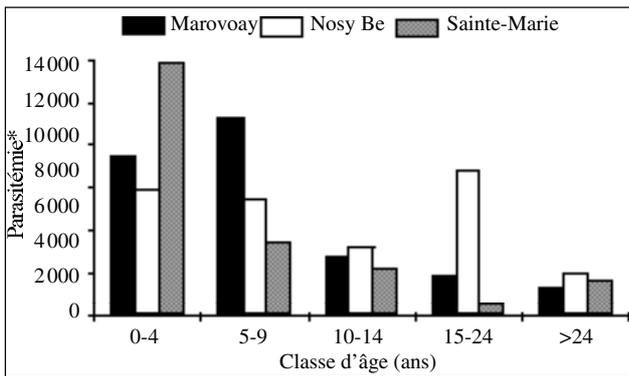


Figure 2 - Moyenne géométrique des charges parasitaires en *Plasmodium falciparum*, selon la classe d'âge chez les consultants des dispensaires, en 1997 à Madagascar.

*Trophozoïtes/µl de sang.

La moyenne géométrique de la charge parasitaire était dans ce groupe de 900 à 1 200 tpm. *Plasmodium falciparum* a été identifié dans 82,3 p. 100 des cas, *Plasmodium malariae* dans 14,5 p. 100, *Plasmodium ovale* dans 1,5 p. 100, *Plasmodium vivax* dans 0,8 p. 100 des cas et l'infection mixte à *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium malariae* dans 0,9 p. 100 des cas. Sur les 100 cas de paludisme à *Plasmodium malariae*, 83 provenaient de la partie ouest de l'île.

La part du paludisme dans l'étiologie des fièvres a été déterminée. Parmi les 762 consultants de dispensaires, hyperthermiques à l'inclusion, 378 soit 49,6 p. 100 ont été trouvés porteurs d'hématozoaires. Parmi les écoliers, 191 étaient hyperthermiques soit 22,8 p. 100. Seuls 34 écoliers fébriles, soit 17,8 p. 100 ont été trouvés porteurs de *plasmodium*.

Les moyennes arithmétiques des charges parasitaires chez les consultants des dispensaires à J0 étaient à Marovoay de 20 300 tpm (IC 95 : 14 052-26 508), à Nosy be de 15 260 tpm (IC 95 : 4 844-25 676) et à Sainte Marie de 24 360 tpm (IC 95 : 16 607-32 115). Globalement, dans les quatre sites d'étude, 59 porteurs de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* ont été détectés à J0 sur les 2 191 patients soit 2,7 p. 100. La variation des charges parasitaires en *Plasmodium falciparum* à J0 en fonction de l'âge est indiquée à la figure 2.

Les tests *in vivo* de chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine ont été effectués sur 194 sujets des dispensaires et des écoles. Quarante sujets ont été perdus de vue dont vingt deux avant J4, quatre exclus avant J7 pour avoir pris de la quinine ou après refus de prélèvement, et un décès. Au total, 149 tests ont été interprétables (Tableau II). Aucun cas de résistance R3 n'a été détecté. Les 35 isolats testés chez les écoliers ont été tous sensibles à la CQ. Ces tests ont été effectués vingt sept fois chez des élèves asymptomatiques dont la moyenne arithmétique de charge parasitaire était de 3 500 tpm. En comparaison, sur 114 tests réalisés chez les consultants, dix sept cas de résistance R1+R2 soit 15 p. 100 ont été notés, dont dix à Sainte Marie. La proportion des isolats résistants était chez les consultants de 10 p. 100 à Nosy be, de 11 p. 100 à Marovoay et de 20 p. 100 à Sainte Marie. La différence n'est pas significative entre les trois sites. Les sujets traités à la CQ se sont améliorés rapidement sur le plan clinique. Sur les dix sept patients présentant des parasites à J7, huit étaient porteurs de charges parasitaires inférieures à 1 500 tpm. Les neuf autres patients ont reçu un nouveau traitement, justifié par la persistance d'une charge parasitaire, bien que seulement trois d'entre eux aient été encore hyperthermiques. Avec un taux moyen de réduction de parasitémie entre J0 et J2 de 97,2 p. 100, la baisse de parasitémie dans les deux groupes de sujets a été rapide et la réponse clinique à la CQ satisfaisante (Tableau III). Seuls trois patients parmi les douze cas d'échecs cliniques entre J4 et J7 ont été retrouvés porteurs de *Plasmodium falciparum* avec des charges parasitaires de 1 700 tpm, 23 500 tpm et 103 000 tpm.

Des tests *in vivo* de chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* à l'association SP ont été pratiqués chez 56 malades. Parmi eux, 46 étaient interprétables, huit ont été perdus de vue, deux exclus avant J7 pour refus de suivi et prise de quinine (Tableau II). A partir de J2, la clairance parasitaire a été totale pour tous les patients, sauf un à Sainte Marie où un patient apyrétique présentait une charge parasitaire résiduelle de 128 tpm. L'efficacité de l'association SP dans le traitement des accès palustre simples, avec plus de 95 p. 100 de réussite thérapeutique (Tableau III), a été supérieure de celle de la chloroquine (p = 0,02).

Tableau II - Résultats des tests de chimiosensibilité *in vivo* type OMS réalisés pour la chloroquine chez 114 consultants de dispensaires et 35 écoliers, et pour l'association sulfadoxine-pyriméthamine chez 46 consultants de dispensaires, lors de l'enquête sur la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum*, en 1997 à Madagascar.

	Dispensaires				Ecoles		
	Marovoay	Nosy be	Ste Marie	Total	Marovoay	Ste Marie	Total
Traitement par la chloroquine							
Nombre de tests	35	30	49	114	15	20	35
Sensible (p. 100)	31 (89)	27 (90)	39 (80)	97 (85)	15 (100)	20 (100)	35 (100)
Résistance type R1 + R2 (p. 100)	4 (11)	3 (10)	10 (20)	17 (15)	0	0	0
Résistance type R3 (p. 100)	0	0	0	0	0	0	0
Traitement par l'association sulfadoxine-pyriméthamine							
Nombre de tests	8	11	27	46	-	-	-
Sensible (p. 100)	8 (100)	11 (100)	26 (96)	45 (98)	-	-	-
Résistance type R1 + R2 (p. 100)	0	0	1 (4)	1 (2)	-	-	-
Résistance type R3 (p. 100)	0	0	0	0	-	-	-

Tableau III - Réponses clinique et parasitologique aux tests de chimiosensibilité *in vivo* réalisés pour la chloroquine et l'association sulfadoxine-pyriméthamine lors de l'enquête sur la chimiorésistance, en 1997 à Madagascar.

Réponse au test <i>in vivo</i>	Traitement par la chloroquine n = 114			Traitement par l'association sulfadoxine- pyriméthamine n = 46		
	S n (p. 100)	R1 + R2 n (p. 100)	Total n (p. 100)	S n (p. 100)	R1 + R2 n (p. 100)	Total n (p. 100)
Nombre de tests	97 (85)	17 (15)	114 (100)	45 (98)	1 (2)	46 (100)
Echec clinique	9 (8)	3 (2,5)	12 (10,5)	2 (4,3)	0	2 (4,3)
Présence de trophozoïtes à J2	10 (8,7)	2 (1,8)	12 (10,5)	10 (21,7)	0	10 (21,7)
Densité parasitaire élevée à J2 ⁽¹⁾	4 (3,5)	3 (2,6)	7 (6,1)	1 (2)	0	1 (2)
Présence de gamétocytes à J4 et J7	8 (7)	3 (2,5)	11 (9,5)	8 (17,4)	0	8 (17,4)

⁽¹⁾ Rapport de la densité parasitaire à J2 sur la densité parasitaire à J0 supérieur à 25 p. 100.

Sur les 110 isolats de *Plasmodium falciparum* testés *in vitro* pour leur sensibilité à la CQ, 90 tests ont été interprétables. Les résultats ont montré que quatre isolats, soit 4 p. 100, étaient résistants avec une moyenne de CI₅₀ de 161,7 nM (écart-type : 39,5 nM). Sept présentaient une sensibilité intermédiaire avec une CI₅₀ moyenne de 108 nM (écart-type : 4,2 nM), et soixante dix-neuf étaient sensibles avec une moyenne de CI₅₀ de 43,7 nM (écart-type : 24,5 nM). Aucun isolat résistant n'a été observé à Sainte Marie ou à Toamasina, sur la côte est (Tableau IV).

DISCUSSION

La prévalence du paludisme dans les régions côtières de Madagascar est élevée par rapport aux Hautes Terres centrales où une étude récente a montré que la prévalence du paludisme ne dépassait pas 2,6 p. 100 chez les consultants de dispensaires et 0,4 p. 100 chez les écoliers (9). La diminution des charges parasitaires en fonction de l'âge suggère l'acquisition d'une prémunition classiquement associée à la permanence de transmission au sein de la population de ces régions côtières. La parasitémie, apparemment élevée de la classe d'âge de 15 ans à 24 ans à Nosy be, n'est pas interprétable compte tenu du faible effectif dans ce groupe (n = 6).

La part du paludisme dans l'étiologie des fièvres est inférieure à 50 p. 100, sauf à Sainte Marie. Pourtant, tout état fébrile est étiqueté paludisme faute de moyen de détection dans la plupart des centres de soins de santé. La persistance de la

fièvre sous antipaludiques est attribuée de façon souvent erronée à une résistance au traitement. Dans ces situations, les personnels de santé changent rapidement d'attitude thérapeutique et leurs pratiques deviennent très aléatoires et sans relation avec les directives du PNLP. Une pression médicamenteuse est ainsi exercée sur les parasites avec des molécules de deuxième voire de troisième ligne. Des enquêtes régulières sont donc nécessaires pour préciser la situation réelle de chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum*.

Les dix sept cas observés de résistance R1+R2 à la CQ sont, à trois exceptions près, des échecs parasitologiques et non cliniques. Des proportions du même ordre sont observées sur les marges des Hautes Terres centrales en pleine saison de transmission du paludisme (2, 4). Ces échecs pourraient s'expliquer par des réinfestations liées à l'intensité de transmission comme le suggèrent les taux élevés de portage de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* retrouvés chez 2,9 p. 100 des sujets à Nosy be, 4,3 p. 100 à Marovoay, et 8,9 p. 100 à Sainte Marie à J0. Dans la ville de Toamasina, lors d'une étude réalisée en 1995, une résistance R1+R2 à la CQ a été détectée dans 7,5 p. 100 des tests (10). Au cours de la présente étude, *in vitro* aucun isolat résistant n'a été observé.

L'efficacité de l'association SP dans le traitement des accès palustre simples, est supérieure de celle de la CQ. Cependant, une étude réalisée dans le sud de Madagascar a mis en évidence des échecs parasitologiques au traitement avant même que l'utilisation du SP en seconde intention ne soit instituée par le PNLP (11). Il est à noter que la consommation d'antipaludiques, dont l'association SP utilisée en automédi-

Tableau IV - Résultats des tests de chimiosensibilité *in vitro* réalisés pour la chloroquine selon le lieu, sur 90 isolats de *Plasmodium falciparum* recueillis lors de l'enquête sur la chimiorésistance, en 1997 à Madagascar.

	Marovoay n = 8	Nosy be n = 32	Ste Marie n = 30	Toamasina n = 20	Total n (p. 100)
Sensible ⁽¹⁾	5	26	28	20	79 (88)
Résistance type R1 + R2 ⁽²⁾	1	4	2	0	7 (8)
Résistance type R3 ⁽³⁾	2	2	0	0	4 (4)

⁽¹⁾ CI50 inférieure à 100nM

⁽²⁾ CI50 comprise entre 100nM et 120 nM

⁽³⁾ CI50 supérieure à 120nM

cation, est plus importante au sein de la population urbaine et semi-urbaine des régions côtières de Madagascar que dans le reste du pays. Ainsi, dans la ville de Toamasina, onze consultants sur 151 ont reconnu avoir pris de l'association SP en automédication, et/ou du Cotrim®. Un dispensaire privé traite systématiquement les cas présumés de paludisme par l'association SP, faute de pouvoir obtenir une confirmation parasitologique. L'efficacité du Cotrim® contre *Plasmodium falciparum* a été confirmée *in vivo* au Malawi et en Gambie (12, 13) et *in vitro* (14). Le triméthoprime, composant de Cotrim® agit sur la même cible moléculaire que la pyriméthamine. Ainsi, l'utilisation massive de l'association SP et de Cotrim® au sein de la population risque de favoriser la sélection d'isolats résistants aux antifoliques. L'expérience de l'Asie du sud-est, comme celle de l'Afrique, a montré que l'apparition des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes aux antifoliques est relativement rapide sous pression médicamenteuse (15-19). Les premiers génotypes du gène DHFR de souches malgaches de *Plasmodium falciparum* selon la méthode de Parzy et Coll. (16) ont déjà mis en évidence la présence de mutation SerineAGC>AsparagineAAC du codon 108, impliquée dans la résistance à des antifolates (Randrianarivejosia et Coll., 1998, communication personnelle), dans une zone semi-urbaine du sud de Madagascar. L'association SP est recommandée au même titre que la quinine comme traitement de seconde ligne, à Madagascar (20). Il convient alors de protéger son efficacité en contrôlant les abus d'utilisation, sources de sélection de souches résistantes et en le réservant aux contre-indications ou aux échecs thérapeutiques éventuels de la chloroquine. Il serait bénéfique d'associer des amino-8-quinoléines gamétocytocides au traitement, ce qui pourrait limiter l'expansion des souches résistantes. Cette pratique a montré son efficacité dans des zones de faible transmission de paludisme (21).

Les résultats obtenus lors de cette étude, remettent en question des déclarations émanant des centres hospitaliers de district et parvenues à la direction de lutte contre le paludisme, rapportant des cas fréquents d'échec thérapeutique à la CQ, souvent après le traitement des cas de paludisme présumés. Ce travail montre néanmoins la circulation des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes bien que les réponses parasitologique et clinique aient été satisfaisantes dans ces régions côtières. Malgré la pression médicamenteuse sur les côtes, c'est sur les marges des Hautes Terres centrales que la fréquence de souches résistantes *in vitro* a été la plus élevée ($p=0,01$). Dans ces zones, le niveau de résistance se stabilise autour de 15 p. 100 *in vitro*, et autour de 30 p. 100 *in vivo* avec des protocoles de suivis plus longs (3, 5). La CQ garde donc son efficacité à Madagascar, même dans un contexte d'épidémie (22, 23). Si la résistance de *Plasmodium falciparum* aux amino-4-quinoléines pose à terme le problème du remplacement de la CQ par un autre médicament de première ligne, cela n'est pas une urgence pour Madagascar. Néanmoins, le projet d'intensification de la lutte contre le paludisme, lancé par le ministère de la santé, fait à nouveau appel aux dispensateurs de CQ, ce qui devrait se traduire par une augmentation de la pression médicamenteuse globale et la sélection des souches résistantes (24, 25). Différents travaux ont montré que

les inhibiteurs de DHFR augmentent la gamétocytogenèse et l'infestivité des gamétocytes (26, 27). Le portage de gamétocytes à J7 après traitement par l'association SP semble aller dans ce sens, bien que l'effectif soit limité. L'étude des mutations du gène DHFR par des techniques de PCR (16, 17), devrait permettre une surveillance à grande échelle de la chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques susceptibles de relayer la CQ. Changer la politique nationale de lutte contre le paludisme implique des décisions difficiles. Autant évaluer et protéger l'efficacité des médicaments de seconde ligne, avec le protocole standard de 7 jours, qui est communément pratiqué même dans des zones de forte transmission du paludisme (28).

Remerciement • Cette étude a été financée par IDA/O.M.S. - Programme CRE - SAN (93-97) de Madagascar. Nous adressons nos remerciements, pour leur précieuse collaboration, à tous les Médecins des hôpitaux publics et des centres médicaux privés, à tout le personnel des Centres de Soins de Base et aux Directeurs des écoles et à leurs collaborateurs dans les différents sites d'études. Nous remercions le Professeur Philippe BRASSEUR qui a bien voulu relire ce texte.

REFERENCES

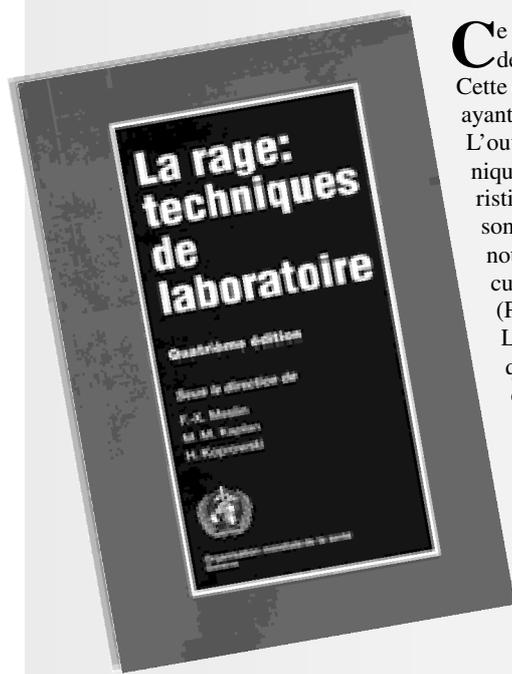
- 1 - MOUCHET J., BLANCHY S. - Particularité et stratification du paludisme à Madagascar. *Sante* 1995; **5** : 386-388.
- 2 - RAHARIMALALA L., RAMANBANIRINA L., RASON M.A. et Coll. - Hétérogénéité de la transmission et la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques à Madagascar: une relation à surveiller. *Med. Trop.* 1995; **55 Suppl. 4** : 84-87.
- 3 - MILIJAONA R., RAHARIMALALA L., RAMANBANIRINA L., et Coll. - Chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* sur les marges des hautes terres malgaches: perspective pour le programme national de lutte. *Med. Trop.* 1998; **58** : 261-265.
- 4 - MILIJAONA R., RAHARIMALALA L., RAMANBANIRINA L. et Coll. - Augmentation progressive de la résistance de *Plasmodium falciparum* aux amino-4-quinoléines sur les Hautes Terres de Madagascar. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1998; **91** : 91-92.
- 5 - DESJARDINS R.E., CANFIELD C.J., HAYNES J.D., CHULEY. - Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by an semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979; **16** : 710-718.
- 6 - LE BRAS J., DELORON P. - *In vitro* study of drug sensibility of *Plasmodium falciparum* : evaluation of a new semi-micro test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1983; **32** : 447-451.
- 7 - WHO - A practical handbook for therapeutic efficacy testing for the district health worker. WHO-Afro, Brazzaville, 1997, pp 23.
- 8 - BRUCE-CHWATT L.J., BLACK R.H., CANFIELD C.J., et Coll. - La pharmacorésistance dans le paludisme. in « Série de Monographies - Chimiothérapie du paludisme ». OMS ed., 1984, n°27, p146.
- 9 - JAMBOU R., TOMBO M.L., RAHARIMALALA L. et Coll. - Le paludisme à Antananarivo : évaluation d'une situation post-épidémique. *Cah. Sante* 1998; **8** : 257-264.
- 10 - RATSIMBASOA C.A. - Epidémiologie du paludisme et chimiosensibilité à la chloroquine à Toamasina. Thèse de Médecine, Faculté de Médecine d'Antananarivo, Madagascar, 1995, 110 p.
- 11 - RAKOTO S.A., RAHARIMALALA L., JAMBOU R. - Etude de la chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* à Madagascar : 1- Situation des médicaments de seconde ligne à Taolagnaro (quinine, sulfadoxine-pyriméthamine). *Arch. Inst. Pasteur Madagascar* 1998; **64** : 51-54.

- 12 - BLOLAND P.B., REDD S.C., KAZEMBE P. et Coll. - Co-trimoxazol for childhood febrile illness in malaria endemic regions. *Lancet* 1991; **337** : 518-520.
- 13 - DARAMOLA O.O., ALONSO P.L., O'DEMPSEY T.J. et Coll. - Sensitivity of *Plasmodium falciparum* in the Gambia to co-trimoxazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1991; **84** : 345-348.
- 14 - BASCO L.K., LE BRAS J. - Sensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum* aux antifoliques (triméthopime, pyriméthamine, cycloguanil) : étude sur 29 souches africaines. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1997; **90** : 90-93.
- 15 - SABCHAREON, A., CHONGSUPHAJASIDDHI P., ATTANATH K. et Coll. - *In vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* collected from pyrimethamine-sulfadoxine sensitive and resistant areas in Thailand. *Bull. World Health Organ.* 1985; **63** : 597-602.
- 16 - PARZY D., DOERIG C., PRADINES B. et Coll. - Proguanil resistance in *Plasmodium falciparum* African isolates : assessment by mutation-specific polymerase chain reaction and *in vitro* susceptibility testing. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997; **57** : 646-650.
- 17 - WANG P., READ M., SIMS P.F., HYDE J.E. - Sulfadoxine resistance the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol. Microbiol.* 1997; **94** : 979-986.
- 18 - PLOWE C.V., KUBLIN J.G., DUMBO O.K. - *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase mutations : epidemiology and role in clinical resistance to antifolates. *Drug Resistance Updates* 1998; **1** : 389-396.
- 19 - WATKINS W.M., MOSOBO M. - Treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with pyrimethamine-sulfadoxine : selective pressure for resistance is function of long elimination half-life. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1993; **87** : 75-78.
- 20 - JAMBOU R., RAHARIMALALA L., MILJAONA R. et Coll. - Etude de la chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* à Madagascar : 2- Efficacité et tolérance de la quinine base 250 mg (Surquina®) dans le traitement de l'accès palustre simple. *Arch. Inst. Pasteur de Madagascar* 1998; **64** : 56-61.
- 21 - SHEN J., ZHANG S., XU B. et Coll. - Surveillance of low level malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1998; **92** : 3-6.
- 22 - LEPERS J.P., DELORON P., FONTENILLE D., COULANGES P. - Reappearance of *falciparum* malaria in central highland plateaux of Madagascar. *Lancet* 1988; **i** : 586.
- 23 - LEPERS J.P., DELORON P., ANDRIAMAGATIANA-RASON M.O. et Coll. - Newly transmitted *Plasmodium falciparum* malaria in the central highland plateaux of Madagascar : assessment of clinical impact in a rural community. *Bull. World Health Organ.* 1990; **68** : 217-222.
- 24 - WERNSDORFER W.H. - The development and spread of drug resistant malaria. *Parasitol. Today* 1991; **7** : 297-303.
- 25 - KOELLA J.C. - Cost and benefits of resistance against antimalarial drugs. *Parasitol. Today* 1998; **14** : 360-364.
- 26 - CHUTMONGKONKUL M., MAIER W.A., SEITZ H.M. - *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.
- 27 - NOSTEN F., HIEN T.T., WHITE N.J. - Use of the artemisinin derivatives for the control of malaria. *Med. Trop.* 1998; **58 Suppl. 3** : 45-49.
- 28 - SOKHNA C.S., MOLEZ J.F., NDIAYE P. et Coll. - Test *in vivo* de chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine au Sénégal : évolution de la résistance et estimation de l'efficacité thérapeutique. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1997; **90** : 83-89.

La rage : techniques de laboratoire

Sous la direction de F-X. Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowski

Organisation mondiale de la santé ed., Genève



Ce manuel se veut un guide complet des techniques de laboratoire applicables au diagnostic de la rage et à la recherche ainsi qu'à la production de vaccins et d'immunoglobulines. Cette quatrième édition a été considérablement remaniée et augmentée, l'édition précédente ayant été largement utilisée pendant plus de 20 ans.

L'ouvrage comporte six parties. On trouvera dans la première un aperçu général des techniques actuelles, notamment des mesures de sécurité à observer, et un résumé des caractéristiques et de la biologie moléculaire du virus rabique. La seconde et la troisième parties sont consacrées à l'évaluation des techniques utilisées pour le diagnostic et la recherche, notamment de celles qui font appel à des titrages immuno-enzymatiques (ELISA), à des cultures cellulaires, à l'utilisation d'anticorps monoclonaux et à l'amplification génique (PCR).

La production de vaccin antirabique à usage médical et vétérinaire est évoquée dans la quatrième partie, qui comprend 12 nouveaux chapitres traitant des vaccins préparés en cultures cellulaires (y compris en lignées cellulaires continues) et des vaccins recombinés. On y décrit ensuite les techniques d'évaluation de la sécurité et de l'activité des vaccins antirabiques, notamment les tests *in vitro* destinés au contrôle en cours de production. Enfin, la dernière partie traite de la production des sérums antirabiques et des immunoglobulines d'origine humaine et équine. On trouvera dans les appendices d'autres conseils d'ordre pratique concernant, entre autres, les techniques de recueil et d'expédition des prélèvements de tissu cérébral à des fins diagnostiques, la préparation des conjugués antirabiques et le calcul des titres viraux et de l'activité des sérums antirabiques, des immunoglobulines et des vaccins ■