

Étude de la sensibilité in vitro de 232 isolats de *Plasmodium falciparum* aux antipaludéens au Burkina Faso (Afrique de l'Ouest).

H. Tinto (1), J. B. Ouedraogo (1, 2), B. Traoré (1), S. O. Coulibaly (1) & T. R. Guiguemde (1)

(1) Centre Muraz / OCCGE, Centre de référence de la chimiorésistance du paludisme, Laboratoire de parasitologie-entomologie, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

(2) Institut de recherche en science de la santé / CNRST, Ouagadougou, Burkina Faso.

Correspondance : Dr Halidou TINTO, Centre Muraz/OCCGE, 01 BP 153, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. E-mail : palu.muraz@fasonet.bf

Manuscrit n° 2186. "Parasitologie". Reçu le 18 avril 2000. Accepté le 29 août 2000.

Summary: In vitro susceptibility of Burkina Faso (West Africa) 232 isolates of *Plasmodium falciparum* to antimalarials.

Plasmodium falciparum in vitro susceptibility to chloroquine, quinine, mefloquine and halofantrine was investigated in patients living in Bobo-Dioulasso (Burkina Faso, West Africa). Our study was carried out from July to November 1997 at the Malaria Chemoresistance Reference Centre, Centre Muraz/OCCGE. Inclusion criteria were: presence of a single infection by *P. falciparum* with a parasite count > 4000 infected red cells/mm³. The susceptibility to drugs was measured after an incubation period of 48 hours at 37° C, under 5% CO₂. (3H) Hypoxanthine was added to the medium to monitor parasite growth. 134 isolates of *P. falciparum* were tested against chloroquine; 24,6% (33/134) were resistant. We have also documented 11,2% (15/133) of resistant isolates to halofantrine. All the tested isolates were susceptible to quinine (n = 135) and mefloquine (n = 136). A significant positive correlation was found between the following IC50 values: chloroquine-quinine, quinine-mefloquine and mefloquine-halofantrine. Our study shows no significant increase of the prevalence of chloroquine-resistant strains of *P. falciparum* in our study area; as well as the persistence of resistance to halofantrine with regard to previous publications in the subject.

Résumé :

L'activité in vitro de quatre antipaludéens (chloroquine, quinine, méfloquine et halofantrine) a été mesurée sur des souches de *Plasmodium falciparum* en utilisant la technique du microtest isotopique. L'étude a été menée de juillet à novembre 1997 chez des patients recrutés dans quatre formations sanitaires de la ville de Bobo-Dioulasso et présentant une infection monospécifique à *P. falciparum* avec une parasitémie > 4000 GRP/mm³ de sang. La sensibilité a été appréciée au bout de 48 heures d'incubation, après maturation des parasites et incorporation d'un radio-isotope (³H). Au plan de la chimiorésistance, nous avons observé 24,6 % (33/134) de résistance à la chloroquine. La résistance à l'halofantrine a été observée dans 11,2 % des cas (15/133). Par contre, tous les isolats étudiés ont présenté une bonne sensibilité à la quinine et à la méfloquine. Nous avons pu également établir des corrélations statistiquement significatives entre les CI50 des couples chloroquine-quinine, quinine-méfloquine et méfloquine-halofantrine. La présente étude indique une stabilisation de la chloroquinorésistance dans la région et une persistance de la résistance à l'halofantrine par rapport aux publications antérieures sur le phénomène.

malaria
Plasmodium falciparum
antimalarial drug
in vitro susceptibility

paludisme
antipaludéen
Plasmodium falciparum
chimiorésistance in vitro

Introduction

L'émergence et la multiplication des souches chloroquinorésistantes de *Plasmodium falciparum* constituent un obstacle majeur dans la lutte contre le paludisme dans la plupart des régions d'endémie. Cela remet en question la chimioprophylaxie usuelle par la chloroquine et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) recommande de nos jours aux voyageurs non immuns l'utilisation de la méfloquine dans les pays africains sub-sahariens (15). L'extension de la résistance à d'autres molécules s'est caractérisée ces dix dernières années par l'apparition

de souches résistantes à la quinine en Afrique (13) puis à l'halofantrine (1). Dès lors, la nécessité d'une surveillance régulière de ces phénomènes de résistance s'est imposée. Le test *in vitro* constitue l'une des approches indirectes les plus efficaces pour l'évaluation de l'efficacité d'un antipaludéen. Nous rapportons ici les résultats d'une étude *in vitro* de 232 isolats réalisée, en 1997, au Burkina Faso. Elle a pour but :

- d'évaluer la sensibilité de *P. falciparum* aux quatre antipaludéens cités (chloroquine, quinine, méfloquine et halofantrine),
- de déterminer les éventuelles corrélations qui existent entre ces médicaments au plan de la résistance.

Site d'étude

La ville de Bobo Dioulasso a constitué notre cadre d'étude. Capitale économique du Burkina Faso, elle compte une population de 400 000 habitants. Elle est située en zone de savane arborée qui est caractérisée par un climat de type soudano-sahélien avec 6 mois de saison pluvieuse et 6 mois de saison sèche. Le paludisme y est holo-endémique et sa transmission est permanente avec une recrudescence en saison des pluies (mai-octobre).

Matériels et Méthodes

Prélèvements

L'étude a été menée de juillet à novembre 1997 et le recrutement des patients s'est effectué dans 4 formations sanitaires de la ville. L'étude a concerné les enfants de 6 mois à 15 ans venant en consultation et cliniquement suspect d'accès palustre. Ont été inclus dans l'étude tous les sujets porteurs d'hématozoaires (goutte épaisse positive) et satisfaisant aux critères suivants: avoir une infection monospécifique à *Plasmodium falciparum*, avoir une densité parasitaire 4000GRP/mm³ (0,1 %) de sang, consentir librement de participer à l'étude. Un échantillon de 5 à 10 ml de sang (selon l'âge du patient) a été prélevé sur héparine avant traitement. La chloroquine a été donnée en première intention et la sulfadoxine-pyriméthamine en deuxième intention. Tous les patients ayant reçu un traitement antipaludéen les 7 jours précédents ont été systématiquement exclus de l'étude.

Les tests in vitro

La technique utilisée a été celle du microtest isotopique décrit par DESJARDINS (8). Les solutions mères de chloroquine sulfate (Rhône-Poulenc Rorer, Paris, France), de quinine hydrochloride (Sigma, St Louis, Etats-Unis), de chlorhydrate de méfloquine (Hoffman-La-Roche, Bâle, Suisse) et de chlorhydrate d'halofantrine (SmithKline Beecham, Brentford, Royaume-Uni) ont été préparées avec de l'éthanol à 70 %. Les concentrations de médicaments dans les puits variaient de 4,54 à 1165 nM/l pour la chloroquine, de 13,02 à 3333 nM/l pour la quinine, de 1,41 à 361,45 nM/l pour la méfloquine et de 0,23 à 60 nM/l pour l'halofantrine.

Les hématies, après trois lavages, ont été mises en suspension dans du RPMI 1640 (Sigma, Etats-Unis) supplémenté de 10 % de sérum humain (Banque de sang, CHNSS, Bobo-Dioulasso) et d'hypoxanthine tritiée (Amersham, Little Chalfont, Royaume-Uni). La distribution a été faite à raison de 200 µl par cupule et les plaques incubées à 37 °C avec 5 % de CO₂ pendant 48 heures. Le contenu des plaques a été collecté à l'aide d'un collecteur cellulaire (Skatron, Lier, Norvège). Le comptage s'est effectué avec 2 ml de liquide de scintillation (BCS-NA, Amersham, Royaume-Uni) et l'incorporation radioactive a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation Beta (Beckman LS60001C, Etats-Unis). Les résultats de croissance plasmodiale en fonction de la concentration d'antimalarique sont exprimés en CPM et sont interprétés par analyse en régression linéaire. La concentration inhibitrice 50 % (CI50) est définie comme la concentration permettant 50 % de l'incorporation d'hypoxanthine tritiée des puits témoins sans antimalarique. Les CI50 correspondant aux seuils de résistance *in vitro* sont estimés à CI50 > 100 nM pour la chloroquine, à CI50 > 800 nM pour la quinine, à CI50 > 30 nM pour la méfloquine et à CI50 > 6 nM pour l'halofantrine.

Résultats

Ce sont au total 232 souches qui ont été reçues pendant la période de l'étude. Le tableau I résume la répartition des tests effectués ainsi que la réponse des isolats par médicament. Les résultats obtenus indiquent une résistance à la chloroquine plus élevée que celle aux autres antimalariques. Parmi les 134 souches testées, 33 (24,6 %) étaient résistantes à ce médicament avec une moyenne des CI50 de 72,7 nM (valeurs extrêmes : 2,8 et 729 nM/l). Une de ces souches a présenté une CI50 particulièrement élevée de 729,2 nM. Le taux de résistance à l'halofantrine a été de 11,3 % (15/133) avec une moyenne des CI50 de 3,4 nM (valeurs extrêmes : 0,15 et 31,3 nM/l). Toutes les souches testées ont présenté une bonne sensibilité à la méfloquine avec une CI50 moyenne de 5,4 nM (valeurs extrêmes : 0,35 et 27,5 nM/l), ainsi qu'à la quinine avec une CI50 moyenne de 97,3 nM (valeurs extrêmes : 3,3 et 580 nM/l). Sur l'ensemble, quatre isolats sont apparus résistants à la fois à la chloroquine et à l'halofantrine. La recherche de corrélation entre les différentes valeurs des CI50 des antipaludéens pris 2 à 2 est résumée dans le tableau II. Dans la présente étude, nous observons une corrélation statistiquement significative entre les valeurs des CI50 des antimalariques suivants : chloroquine-quinine, quinine-méfloquine et méfloquine-halofantrine.

Tableau I.

Répartition des tests effectués et réponse des isolats de *P. falciparum* aux antipaludéens testés.
Distribution of tests conducted and P. falciparum isolate response to tested antimalarial drugs.

	antipaludéens			
	chloroquine	quinine	méfloquine	halofantrine
nombre de tests	134	135	136	133
isolats sensibles	101	135	136	118
isolats résistants	33 (24,6 %)	0	0	15 (11,2 %)

Tableau II.

Corrélation entre les valeurs des CI50 *in vitro* des différents antimalariques testés.
Correlation between the in vitro CI50 values of the different antimalarial drugs tested.

antimalariques		nombre de tests	R*	P	significativité à 95 %
chloroquine	quinine	134	+ 0,52	< 0,0001	S
chloroquine	méfloquine	134	- 0,17	0,04	S
chloroquine	halofantrine	131	- 0,19	0,03	S
quinine	méfloquine	135	+ 0,26	0,002	S
quinine	halofantrine	132	+ 0,14	0,09	NS
méfloquine	halofantrine	133	+ 0,62	< 0,0001	S

* coefficient de corrélation de Pearson ; S : significatif ; NS : non significatif

Discussion

Au Burkina Faso, la chloroquinorésistance a été décrite dès 1983 *in vitro* (2) et confirmée *in vivo* en 1988 (5). Le taux de 24,6% que nous observons semble indiquer une stabilisation du phénomène bien que la chloroquine soit depuis toujours utilisée en première intention. En effet, ces résultats sont comparables à ceux publiés pour cette région par d'autres auteurs; c'est ainsi qu'en 1991, le taux de résistance *in vitro* à la chloroquine rapporté à Bobo-Dioulasso était de 25 % (5). Une étude réalisée dans la même zone par OUEDRAOGO *et al.* rapportait respectivement, en 1995 et 1996, des taux de 20% et 19% (16). Cependant, d'autres auteurs ont rapporté des taux plus élevés. C'est ainsi qu'en 1992, une étude menée à Goundry, au Burkina Faso, par DEL NERO *et al.* rapportait

un taux de 74,4% de résistance *in vitro* à la chloroquine (7). Des résultats rapportés d'Afrique Centrale indiquent également des taux analogues (17, 22). Cette différence avec nos résultats pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité de la distribution géographique des souches de *P. falciparum* et la fluctuation du phénomène dans le temps.

La quinine représente aujourd'hui le traitement de choix dans la prise en charge des cas graves de paludisme. Mais, de plus en plus, son administration par voie orale, parentérale ou intrarectale est faite en première intention devant une fièvre supposée paludique, dans l'ignorance de la notion d'une échelle thérapeutique dans l'emploi des antimalariques. Tous nos isolats ont présenté une bonne sensibilité à la quinine. Nos résultats corroborent donc ceux de DEL NERO *et al.* (7), ainsi que ceux d'une autre étude réalisée dans la même région (5). Ils diffèrent par contre des résultats publiés par certains auteurs qui ont rapporté la présence de souches résistantes à la quinine en Afrique de l'Ouest (4, 16).

Des échecs prophylactiques (10) et des résistances ou des baisses de sensibilité *in vitro* (14, 21) ont bien montré que la résistance à la méfloquine existait en Afrique de l'Ouest. Certains auteurs ont même mis en évidence l'existence de cette résistance avant même l'introduction de la méfloquine dans la région (3, 18). Nos résultats sont différents et montrent une très bonne sensibilité des souches étudiées. Cela pourrait s'expliquer par la différence des souches circulantes et/ou la fluctuation dans le temps du phénomène.

La résistance à l'halofantrine était signalée dès 1988 en Afrique de l'Ouest : diminution de sensibilité (20) et résistance de type RI (1). Des résultats analogues ont été également rapportés *in vivo* par la suite (9). Nos résultats corroborent ces observations avec une prévalence de 11,3 % de souches résistantes. Si, pour la chloroquine, une pression médicamenteuse élevée en zone urbaine peut être évoquée, il n'en est pas de même pour l'halofantrine. Cette molécule, en effet, n'a été introduite que très récemment au Burkina Faso (1992). L'existence de souches naturellement résistantes, comme dans le cas de la méfloquine, pourrait donc expliquer ce paradoxe apparent.

La polychimiorésistance est un corollaire de la résistance à la chloroquine, soit par le fait de résistances croisées (entre les amino-4-quinoléines et les amino-alcools) (13), soit parce que la chloroquinorésistance augmente le recours aux antimétabolites, et donc la pression sélective de ces antimalariques. La résistance croisée peut être appréciée par la liaison existant entre les CI50 de différents antipaludiques. Dans la présente étude, nous observons une forte corrélation entre les CI50 de la chloroquine et de la quinine, bien que nous n'ayons pas observé de cas de résistance à la quinine. Toutefois, les souches qui étaient résistantes à la chloroquine avaient également une faible sensibilité à la quinine (CI50 les plus élevées pour ce médicament). Ce fait avait déjà été rapporté par d'autres auteurs (4, 16).

Bien que la molécule de la méfloquine possède des similarités structurales avec celles des antimalariques de type quinoléine (quinine et chloroquine) et avec l'halofantrine, nous n'avons pas observé de corrélation entre les CI50 de la chloroquine et celles de la méfloquine ou de l'halofantrine. Nos résultats sont comparables à ceux d'autres auteurs qui ont même montré en Afrique de l'Ouest une corrélation négative entre ces diverses CI50 (14). Cependant, dans certaines régions Ouest-africaines comme le Mali et le Sénégal, des corrélations positives existent (17).

Nous avons également mis en évidence une corrélation positive entre les CI50 de la méfloquine et de la quinine. Ceci a déjà été rapporté par OUEDRAOGO *et al.* pour la même région (16),

ainsi que par une étude réalisée au Cameroun (19), où la quinine était très utilisée, et cela même avant la diffusion de la méfloquine. Cela nous suggère l'hypothèse selon laquelle la mauvaise utilisation de la quinine pourrait, non seulement entraîner une baisse de sensibilité vis-à-vis de ce produit, mais également induire une augmentation des CI50 d'autres molécules ayant une similarité structurale.

Si, dans notre étude, nous n'avons pas observé de corrélation entre les CI50 de la quinine et celles de l'halofantrine, certains auteurs ont pu mettre en évidence une telle relation (17, 19). Bien qu'en clinique l'halofantrine semble être active sur les souches résistantes à la méfloquine, nous avons observé une corrélation entre les CI50 de ces deux molécules. Cela a également été rapporté par de nombreux auteurs (16, 17, 19). Nous avons pu aussi constater que la corrélation quinine-méfloquine était plus faible que les corrélations existant entre chloroquine-quinine et méfloquine-halofantrine.

Conclusion

Cette étude a permis de comparer les résistances présentées par *P. falciparum* aux différents antimalariques utilisés dans la région et de confirmer le caractère stable de la chloroquinorésistance en Afrique de l'Ouest. Cette dernière constatation justifie le maintien de la chloroquine comme médicament de première intention au Burkina Faso (6, 11). La résistance à l'halofantrine, par contre, semble augmenter en terme de prévalence. Une telle éventualité doit inciter à renforcer la surveillance de la chimiosensibilité de *P. falciparum* aux antimalariques de façon générale, aux nouveaux antimalariques en particulier, et notamment à l'halofantrine par un suivi régulier *in vivo* et *in vitro* de l'efficacité de cette molécule.

Références bibliographiques

1. BASKO LK, LE BRAS J, GILLOTIN C, RINGWALD P, RABENJARSON E *et al.* - Type RI resistance to halofantrine in West Africa. *Trop Med Parasitol*, 1991, **42**, 413-414.
2. BAUDON D, DECOUVOUX R, ROUX J & SONDO B - Etude de la sensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine dans une savane de Haute-Volta à paludisme hyper-endémique: utilisation des tests *in vivo* et *in vitro*. *Bull Soc Pathol Exot*, 1984, **77**, 658-665.
3. BRASSEUR P, KOUAMOU DJ, MOYOU-SOMO R & DRUILHE P - Multi drug resistant *falciparum* malaria in Cameroon in 1987-1988 II. Mefloquine resistance confirmed *in vivo* and *in vitro* and its correlation with quinine resistance. *Am J Trop Med Hyg*, 1992, **46**, 8-14.
4. CARME B, GAY F, NDOUNGA M, HAYETTE-GORREMANS MP & BOUQUET JC - *In vitro* drug susceptibility and clinical aspects of *Plasmodium falciparum* malaria in African children. *Trop Med Parasitol*, 1995, **46**, 270-274.
5. CENTRE MURAZ - *Deuxième Atelier sur la chimiorésistance du paludisme dans les Pays de l'O.C.C.G.E.* Rapport final, O.C.C.G.E., Bobo-Dioulasso, 1993, 15p.
6. COULIBALY SO, LAMIZANA L, PENALI KI *et al.* - La situation du paludisme dans les Etats de l'OCCGE de 1991 à 1994. *OCCGE Information*, 1996, **104**, 7-14.
7. DEL NERO L, LAMIZANA L, PIETRA V & NEBIE I - Sensitivity to antimalarial drugs by *P. falciparum* in Goundry, Oubritenga province, Burkina-Faso. *Parasitologia*, 1994, **36**, 287-293.
8. DESJARDINS RE, CANFIELDS CJ, HAYNES JP & CHNULAY JD - Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semi-automated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother*, 1979, **16**, 710-718.
9. FALADE CO, SALAKO LA, SOWUNMI A, ODUOLA AM & LARCIER P - Comparative efficacy of halofantrine, chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine for treatment of acute uncomplicated *falciparum* malaria in Nigeria children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1997, **91**, 58-62.

10. GAY F, BINET MH, BUSTOS MDG, ROUVEIX B, DANIS M *et al.* - Mefloquine failure in child contracting *falciparum* malaria in West Africa. *Lancet*, 1990, **335**, 120-121.
11. GUIGUEMDE TR, AOUBA A, OUEDRAOGO JB & LAMIZANA L - Ten years surveillance of drug-resistant malaria in Burkina Faso (1982-1991). *Am J Trop Med Hyg*, 1994, **50**, 699-704.
12. LE BRAS J, BASKO LK & CHARMOT G - Les bases de la chimiorésistance de *P. falciparum* et ses différents profils. *Cahiers santé*, 1993, **3**, 293-301.
13. LE BRAS J & RINGWALD P - Situation de la chimiorésistance du *P. falciparum* en Afrique en 1989. *Méd Trop*, 1990, **50**, 141-145.
14. MOCKENHAUPT FP - Mefloquine resistance in *P. falciparum*. *Parasitol Today*, 1995, **11**, 248-253.
15. OMS - *Voyages internationaux et santé. Vaccinations exigées et conseils d'hygiène*. Genève, Org Mond Santé, 1997, 112 p.
16. OUEDRAOGO JB, DUTHEIL Y, TINTO H *et al.* - *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to halofantrine compared with chloroquine, quinine and mefloquine in the region of Bobo-Dioulasso, Burkina Faso (West Africa). *Trop Med Inter Health*, 1998, **5**, 381-384.
17. PRADINES B, ROGIER C, FUSAI T, TALL A, TRAPE JF & DOURY JC - Sensibilité *in vitro* de 85 isolats de *Plasmodium falciparum* dans la région de Fatick, Sénégal. *Méd Trop*, 1996, **56**, 141-145.
18. RACCURT CP, DUMESTRE-TOULET V, ABRAHAM E, LE BRAS M, BRAKET-LIERMAIN A & RIPERT C - Failure of *falciparum* malaria prophylaxis by mefloquine in travellers from West Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 1990, **45**, 319-324.
19. RINGWALD P, BICKII J & BASCO LK - *In vitro* activity of antimalarials against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Yaoundé, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg*, 1996, **55**, 254-258.
20. RINGWALD P, LE BRAS J, VOYER C & COULAUD JP - Reduced *in vitro* susceptibility to halofantrine of *P. falciparum* in West Africa. *Lancet*, 1990, **335**, 421-422.
21. RINGWALD P, RABENJARSAN E, DOURY JC & LE BRAS J - Chimiosensibilité du paludisme d'importation à *P. falciparum* en France en 1990. *BEH*, 1991, **18**, 76-77.
22. WOLDAY D, KIBREAB T, BUKENYA D & HODES R - Sensitivity of *Plasmodium falciparum in vivo* to chloroquine and pyrimethamine-sulfadoxine in Rwandan patients in a refugee camp in Zaire. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1995, **89**, 654-656.