

ETUDE PRELIMINAIRE IN VITRO DE LA
CHIMIOSENSIBILITE DE PLASMODIUM FALCIPARUM
A MADAGASCAR

par

J. LE BRAS*, C. DULAT**, P. COULANGES**,
D. RALAMBOSON***, P. J. RAKOTONIRINA-
RANDRIAMBELOMA**, P. DELORON*

INTRODUCTION

La quinine a une efficacité variable selon la souche plasmodiale (1). La chloroquine est un médicament déjà ancien vis à vis duquel *P. falciparum* développe de plus en plus une chimiorésistance (2). Le Fansidar est une association de pyriméthamine et de sulfadoxine qui entraîne rapidement l'apparition de résistances partout où son utilisation s'est généralisée (3).

Il est plus que jamais nécessaire, pour la surveillance épidémiologique comme pour le traitement du paludisme à *P. falciparum* chimiorésistant de disposer de tests in vitro aussi fiables et précis que l'est désormais l'antibiogramme dans le domaine des affections bactériennes.

L'étude préliminaire rapportée ici est la première publication concernant l'utilisation sur le terrain d'un test in vitro de seconde génération pour la mesure de la chimiosensibilité de *P. falciparum*. Rappelons schématiquement la place des tests in vivo et in vitro :

* Institut de Médecine et d'Epidémiologie Tropicales, Hôpital Claude Bernard
75019 PARIS.

** Institut Pasteur de Madagascar.

*** Service de lutte contre les Maladies Transmissibles, Institut d'Hygiène
Sociale, Antananarivo.

– Limites des tests thérapeutiques :

1. L'échec thérapeutique ne signifie pas chimiorésistance plasmodiale. L'absorption et la métabolisation du médicament, l'obstacle que peut éventuellement lui opposer l'hématie peuvent limiter l'accès à la cible.

A l'opposé, les défenses immunitaires peuvent ajouter leurs effets à ceux de la thérapeutique.

2. Les épreuves thérapeutiques standardisées (tests *in vivo*) sont délicates à appliquer et à interpréter.

– le test *in vivo* de 7 jours (4) ne permet pas de différencier les réponses S et RI.

– le test *in vivo* de 28 jours implique l'examen quotidien du sang et la coopération patiente (et rare) du malade ; ses conclusions sont faussées en cas de réinfestation.

– L'évolution des tests *in vitro* :

1. Le macro-test (5) dont l'usage s'est répandu sous le nom de test standard OMS (6) est simple mais sommaire :

– incubation 24 heures à 38° C de sang défibriné sur billes de verre avec 5 mg/ml de glucose et des concentrations variables de médicaments.

– il nécessite au minimum un prélèvement de 10 ml de sang renfermant plus de 1000 trophozoïtes âgés par microlitre (anneaux épaissis) ce qui limite le nombre de sujets éligibles (7).

2. Le micro-test (8) utilise comme les tests ultérieurs, la technique de culture *in vitro* de Trager et Jensen (9). Le faible volume de sang nécessaire (0,1 ml) est un avantage limité par la délicatesse d'exécution. Lors d'application de terrain, son rendement a été meilleur que celui du macro-test (10).

3. Le test de 48 heures (11) comme le semi micro-test à temps d'incubation adapté à la souche (12,13) sont adaptables à la fois aux souches synchrones trouvées dans le sang de malades et aux parasites asynchrones provenant de culture *in vitro*.

MATERIEL ET METHODES

A/ Sujets étudiés

142 sujets ont été examinés parmi :

- les consultants des dispensaires de prophylaxie et traitement du paludisme (62 sujets de 6 mois à 47 ans)
- les enfants des écoles (74 enfants de 9 à 16 ans)
- les malades hospitalisés (6 sujets).

Trois localités de zones géoclimatiques différentes ont été étudiées : Tananarive au climat tropical d'altitude, Tamatave au climat tropical humide et Moramanga, zone de transition au climat tropical humide.

B/ Méthodes

Dépistage et prélèvement des sujets paludéens :

Tous les sujets ont fait l'objet d'un prélèvement sanguin au bout du doigt. Pour chacun, un frottis mince a été réalisé, fixé et coloré par une méthode de coloration rapide (Diff Quick) et examiné sur place, au moyen d'un microscope portable à piles (Mac Arthur).

Trois personnes ont participé à l'organisation de ce dépistage qui a permis 25 déterminations extemporanées à l'heure.

Les sujets présentant un parasitémie à *P. falciparum* supérieure à 0,1 % ont fait l'objet d'un prélèvement sur vacutainer ACD stérile, de 3 à 10 ml de sang veineux au pli du coude. Ces prélèvements ont été conservés à +4° C en boîte isotherme, jusqu'au retour au laboratoire où 32 tests ont été réalisés ; en outre 9 tests ont été réalisés à Paris 40 heures après le prélèvement.

L'activité de 3 molécules a été étudiée in vitro sur les souches de *P. falciparum* hébergées par les sujets paludéens. Il s'agit de deux amino-4-quinoléines : la chloroquine et le RP 12278, cette dernière molécule n'ayant pas encore été utilisée en thérapeutique mais ayant montré une activité chez l'*Aotus* infesté par *P. falciparum* chloroquinorésistant (14), et d'une quinoline méthanol : la méfloquine, en cours d'expérimentation clinique en zone impaludée.

Réalisation du semi-micro-test de chimiosensibilité :

25 µl de solution de médicament sont placés dans les 24 cupules de plaques de polystyrène pour culture de tissus (Cluster Dish 24 Costar) et mis à évaporer. On utilise 3 cupules pour chacune des 7 doses choisies et 3 cupules pour les témoins. Ces plaques sont stockées à -25° C jusqu'à l'emploi. Les hématies sont mises en suspension à raison de 5% dans le milieu de culture (RPMI 1640 + 25 mM HEPES + 25 mM NaHCO₃) additionné de 10 % de sérum humain. Ces hématies sont celles du malade (prélevées sur ACD

et lavées 5 fois en RPMI). Cette suspension est répartie par fractions de 0,7 ml dans chaque cupule. La plaque, après agitation, est placée dans un container étanche avec une bougie allumée. A l'extinction de la bougie, le container est incubé 24 à 48 heures à 37°C. ; des cupules témoins supplémentaires, incubées séparément, permettent de déterminer le temps optimal d'incubation. On élimine alors le milieu surnageant, puis à partir de chaque sédiment homogénéisé, on réalise un frottis mince qui est coloré au Giemsa. Dans la limite des franges, on dénombre les schizontes sains pour 100 formes parasitaires asexuées (saines ou altérées). Le test est considéré comme interprétable s'il y a plus de 10% de schizontes dans les 3 cupules témoins. Sur chaque frottis sont étudiées 100 formes parasitaires (200 s'il y a moins de 20% de schizontes). Le pourcentage de schizontes, pour chaque dose de médicament, est rapporté au témoin. La relation graphique entre le pourcentage de maturation en schizontes et la dose d'antipaludéen permet de déterminer la DE₅₀ et sa marge de fluctuation.

RESULTATS

34 tests in vitro ont été réussis à partir de 12 souches de *P. falciparum* prélevées chez des paludéens. Les résultats sont exprimés en dose efficace 50% (DE₅₀) et en nanomoles par litre de substance (voir tableau I).

Il est à noter que les DE₅₀ observées pour la chloroquine sont généralement inférieures à 100nM/l pour les souches chloroquinosensibles et supérieures à 450 nM/l pour les souches chloroquinorésistantes (figure 1).

COMMENTAIRES ET CONCLUSION

En ce qui concerne la chimiosensibilité de *P. falciparum* :

— la chloroquinosensibilité in vitro des souches malgaches de *P. falciparum* est plus faible que celle mesurée à l'aide de la même méthodologie en Afrique de l'Ouest. Une des 12 souches étudiées présente un caractère de chloroquinorésistance (Tamatave n° 130). 6 présentent une chloroquinosensibilité diminuée in vitro sans que l'on puisse présumer de leur chloroquinorésistance in vivo, 5 sont normalement sensibles.

— l' amino-4-quinoléine RP 12278 présente une activité élevée contre 11 des 12 souches étudiées, ce qui évoque que la diminution de sensibilité à la chloroquine n'est pas un caractère qui s'étend aux

autres molécules de même classe. Il paraît donc souhaitable d'étudier l'activité d'une autre amino-4-quinoléine actuellement commercialisée : l'amodiaquine, et de poursuivre les études pharmacologiques de molécules proches de la chloroquine.

— la méfloquine a un très haut niveau d'activité sur toutes les souches

RESUME

142 sujets ont fait l'objet d'un dépistage du paludisme par frottis mince de sang capillaire. 12 prélèvements de sang veineux effectués chez des sujets paludéens présentant plus de 1 hématie parasitée par *P. falciparum* sur mille ont permis la réalisation de 33 tests de chimiosensibilité à la chloroquine, à la méfloquine et à la bisquinoléine (RP 12278) selon la semicrométhode in vitro.

7 souches de *P. falciparum* ont présenté une sensibilité diminuée à la chloroquine, toutes les souches étant sensibles aux deux autres substances.

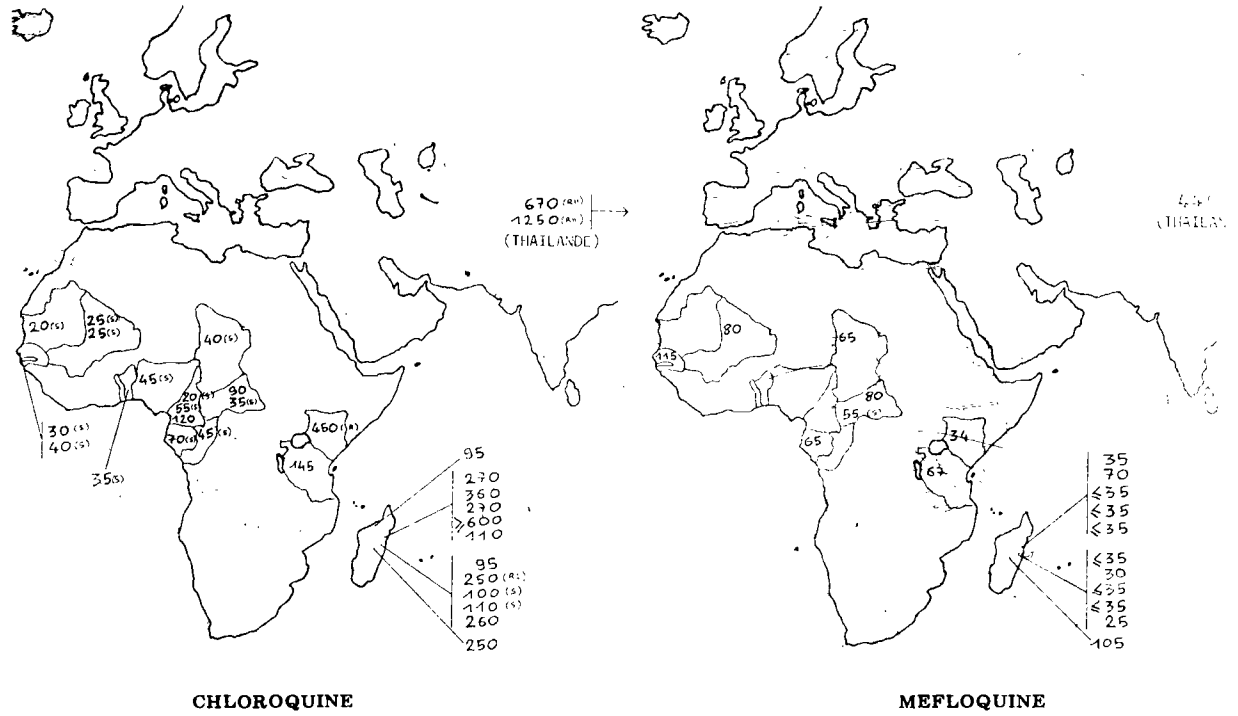
BIBLIOGRAPHIE

1. WERY H., COOSEMANS M. (1980).
La résistance médicamenteuse dans le paludisme
Ann. Soc. Belge Med. Trop., 60, 137-162.
2. Relevé épidémiologique hebdomadaire, OMS, (1980), 31.
3. Morbidity and mortality weekly report (1982), 31, 15.
4. OMS (1973).
Chimiothérapie du paludisme et résistance aux antipaludiques. OMS, Sér.,
Rapp. Techn. n° 529, 128.
5. RIECKMANN K.H., MC NAMARA J.V., FRISCHER H., STOCKEST T.A.,
CARSON P.E., POWELL R.D. (1968).
Effects of chloroquine, quinine and cycloguanil upon the maturation of
asexual erythrocytic forms of two strains of *P. falciparum* in vitro. Amer. J.
Trop. Med. Hyg., 17, 661-671.
6. PNUD/Banque Mondiale/OMS. (1981).
Programme spécial de recherche et de formation concernant les maladies
tropicales : 5è rapport annuel, p. 19-20.
7. RIECKMANN K.H. (1980).
Susceptibility of cultured parasites of *P. falciparum* to antimalarial drugs.
The in vitro cultivation of the Pathogens of Tropical Diseases p. : 35-50.
Trop. Dis. Res. Séries n°3, Schwabe et Co., Basel, Switzerland.
8. RIECKMANN K.H., SAX L.J., CAMPBELL G.H., MREMA J.E. (1978).
Drug sensitivity of *P. falciparum* . An in vitro microtechnique. Lancet, 1,
22-23.
9. TRAGER W., JENSEN J.B. (1976).
Human malaria parasites in continuous culture.
Science, 193, 673-675.
10. WERNSDORFER W.H. (1980).
Field evaluation of drug resistance in malaria. In vitro microtest.
Acta Tropica, 37, 222-227.
11. NGUYEN-DINH P., HOBBS J.H., CAMPBELL C.C. (1981).
Assessment of chloroquine sensitivity of *P. falciparum* in Choletuca, Hondu-
ras.
WHO Bull., 59, 4, 641-646.
13. DELORON P., LE BRAS J., ANDRIEU B., HARTMANN J.F. (1982).
Standardisation de l'épreuve de chimiosensibilité in vitro de *Plasmodium*
falciparum.
Pathol. Biol., 30, 6 bis.
12. LE BRAS J., THUILLIER D., COULAUD J.P., SAVEL K. (1980).
In vitro comparison of patient and *P. falciparum* strain sensitivities to chloro-
quine.
The Host Invader Interplay, Van den Bossche Ed. Elsevier, 637-641.
14. SCHMIDT L.H., VAUGHAN D., MÜELLER D., CROSBY R. AND HA-
MILTON R. (1977).
Activities of various 4-aminoquinolines against infections with chloroqui-
ne resistant strains of *Plasmodium falciparum*.
Antimicrobial Agents and Chemoth., 11, 5, 826-843.

TABLEAU I

ETUDE DE CHIMIOSENSIBILITE IN VITRO DE 12 SOUCHES MALGACHES DE *P. FALCIPARUM*

Lieu d'origine de la souche	N°	Chimiosensibilité in vitro (DE ₅₀ en nM/l)		
		Chloroquine	Mefloquine	RP 12278
MORAMANGA	6	95	≤ 35	10
	10	250	30	35
	14	100	≤ 35	25
	17	110	≤ 35	10
	144	260	25	40
TAMATAVE	65	270	35	20
	105	360	70	≥130
	110	270	≤ 35	35
	130	≥600	≤ 35	50
	136	110	≤ 35	15
LOHARIANDAVA	147	250	105	NE
PORT BERGE	146	95	NE	NE



CHIMIOSENSIBILITE COMPAREE DE 31 SOUCHES DE P. FALCIPARUM (semimicrométhode, résultats exprimés par la DE₅₀ en nM/L, résultat in vivo 25 mg/kg entre parenthèses).