



## Profil et évolution de la chimiosensibilité du paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum* en France, 2000

P. Ralaimazava<sup>1</sup>, R. Durand<sup>1</sup>, N. Godineau<sup>2</sup>, A. Keundjian<sup>4</sup>, Z. Jezic<sup>1</sup>, B. Pradines<sup>4</sup>, O. Bouchaud<sup>3</sup>, J. Le Bras<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centre national de référence de la chimiosensibilité du paludisme, Hôpital Bichat-Claude-Bernard, Paris ;

<sup>2</sup> Unité de parasitologie, Hôpital Delafontaine, Saint-Denis ; <sup>3</sup> Service des maladies infectieuses et tropicales A, Hôpital Bichat-Claude-Bernard, Paris ;

<sup>4</sup> Institut de médecine tropicale du Service de santé des armées, Marseille

### INTRODUCTION

Pour des raisons professionnelles ou d'agrément, le voyage vers les régions impaludées tend à s'accroître et à se banaliser. Le paludisme d'importation observé en France est en hausse, avec environ 5 000 cas rapportés en 1999 et 7 000 pour l'année 2000 [1]. Actuellement, les recommandations aux voyageurs sur la prévention du paludisme reposent en partie sur la connaissance de la chimiosensibilité de *P. falciparum* aux antipaludiques. Le rôle du Centre national de référence de la chimiosensibilité du paludisme (CNRCP) et de l'Institut de médecine tropicale du Service de santé des armées (IMTSSA) est d'assurer la surveillance de l'évolution de la chimiosensibilité du paludisme afin d'optimiser sa prévention et son traitement.

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### Isolats

Les isolats de *Plasmodium* proviennent d'hôpitaux français métropolitains et parviennent au CNRCP ou à l'IMTSSA qui contrôlent l'espèce et la parasitémie de chaque isolat. Un recueil des informations épidémiologiques est effectué à l'aide d'une fiche incluant le nom, le prénom, la date de naissance, le pays de résidence, le pays d'infestation, la date de retour de zone d'endémie palustre. L'usage ou non d'une chimioprophylaxie, et son observance sont indiqués par le clinicien. Le clinicien renseigne sur un éventuel traitement antérieur et sur le traitement prescrit et son évolution. D'un point de vue d'épidémiologie générale, il a été étudié l'intégralité des isolats de *Plasmodium falciparum*, *malariae*, *vivax*, *ovale* avec confirmation du diagnostic d'espèce.

Nous considérons comme échecs prophylactiques les cas de *P. falciparum* malgré une chimioprophylaxie jugée correcte par les cliniciens. Sont considérés comme échecs vrais ceux de sujets sous prophylaxie confirmée par la présence de concentrations plasmatiques efficaces d'antipaludiques. L'absence dans le plasma d'un sujet sous chimioprophylaxie d'un antipaludique à concentration efficace est considéré comme un faux échec chimioprophylactique. Sont considérés comme douteux les sujets dont les données ne sont pas conclusives.

Les isolats provenant soit de malades n'ayant pas pris de chimioprophylaxie soit de malades ayant pris une chimioprophylaxie connue, ont été analysés en vue de déterminer la chimiosensibilité de *P. falciparum* aux antipaludiques. Dans le cas des isolats soumis à une chimioprophylaxie connue, la chimiosensibilité n'est déterminée que pour les antipaludiques non impliqués dans la chimioprophylaxie utilisée. Ont été exclus les isolats pour lesquels l'information sur la chimioprophylaxie est incomplète ou manquante.

La chimiosensibilité aux antipaludiques des isolats provenant de cas d'échec thérapeutique est déterminée par des tests isotopiques et/ou génomiques. Nous considérons comme échec thérapeutique, la réapparition ou la persistance de formes asexuées de *plasmodium* sur le frottis-goutte épaisse malgré un traitement prescrit à l'hôpital.

### Tests de laboratoire

1. Le diagnostic d'espèce et la densité parasitaire sont confirmés microscopiquement. Les divergences ou difficultés diagnostiques font l'objet d'une confirmation par étude antigénique (Parasight®, ICT®, Optimal®) ou génomique par PCR (PfdHFR, PfrRNA [2]).

2. La chimiosensibilité de *P. falciparum* à la chloroquine (CQ), au métabolite actif de l'amodiaquine (AQm), la quinine (Q), l'halofantrine (H), le cycloguanil (CG) et la pyriméthamine (P) est mesurée par des tests isotopiques [3]. Sur la base de l'expérience préalable, les valeurs qui ont été définies comme seuil sont, respectivement, 80 nM (CQ), 6 nM (H), 800 nM (Q), 50 nM (CG) et 100 nM (P).

3. Un test génomique est employé pour les antifoliniques (CG et P). 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* à la P et à une diminution de sensibilité au CG [4]. La présence de mutations additionnelles N51I et C59R, associée à des hauts niveaux de résistance au cycloguanil, a été recherchée par PCR suivie de séquençage sur une série d'échecs prophylactiques vrais à l'association chloroquine plus proguanil.

4. Un nouveau test génomique portant sur *pfcr*, gène central à la résistance à la chloroquine de *P. falciparum*, a été initié au cours de l'année 2000 [5]. L'allèle mutant *pfcr* K76T a été détecté par PCR suivie de séquençage.

5. Un dosage par chromatographie liquide haute pression des antipaludiques a été effectué sur le plasma des isolats présentant un échec prophylactique ou thérapeutique. Les molécules étudiées sont la CQ, la monodéséthyl-chloroquine (CQm) qui est le métabolite actif de la CQ, le proguanil (PG) qui est un précurseur peu actif, le CG qui est le métabolite actif du PG, la méfloquine (MQ). Elles sont détectables à des concentrations inférieures ou égales à 5 ng/ml de plasma [6].

### Tests statistiques

Les résultats sont recueillis sur Excel 97. Le test de Fischer-Snedecor est utilisé pour le calcul des intervalles de confiance à 95 % (IC<sub>95</sub>). Les distributions d'effectifs sont analysées avec le test de  $\chi^2$  corrigé selon Yates.

### RÉSULTATS

#### Description des cas

En 2000, 596 isolats provenant de 46 hôpitaux de la métropole sont parvenus au CNRCP (544 soit 91 %) ou à l'IMTSSA (52). *P. falciparum* a été identifié pour 543 souches (91 %) (dont quatre associés : 1 avec *P. ovale* et 3 avec *P. malariae*), les autres espèces ont été *P. ovale* : 40 souches, *P. malariae* : 7 souches et *P. vivax* : 6 souches. 588 isolats ont été identifiés par frottis-goutte épaisse, 2 ont été identifiés par PCR PfdHFR et 6 ont nécessité une confirmation par PCR PfrRNA.

## Patients

Il s'agit de personnes dont la résidence principale est en France dans la majorité des cas (90 %) (n=567).

L'âge moyen est de 33 ans [8 mois -72 ans] avec dans 72 cas (12 %), un âge inférieur ou égal à 15 ans. Le sex-ratio (H/F) est de 1,6.

Dans 99 % des cas (n=577) le pays de contamination est en Afrique, dans 6 cas le pays n'a pas été déterminé du fait d'un séjour consécutif dans deux ou trois pays différents. Les pays les plus représentés sont la Côte d'Ivoire : 145 isolats (25,3 %), le Sénégal : 89 isolats (15,6 %), le Cameroun : 76 isolats (13,3 %), le Mali : 70 isolats (12,2 %) et les Comores : 43 isolats (7,5 %).

Le délai médian entre le retour de zone impaludée et le diagnostic est, dans 539 cas de *P. falciparum*, de 10 jours [0-196]. Pour 40 cas de *P. ovale*, le délai médian est de 56 jours [0-402]. Pour 6 cas de *P. vivax* le délai médian est de 102 jours [22-183]. Dans 7 cas de *P. malariae* le délai médian est de 36 jours [8-92].

## Chimioprophylaxie et traitement

Sur les 505 dossiers médicaux renseignés, 274 (54 %) notent l'absence de prise chimioprophylactique et 231 (46 %) une prise plus ou moins régulière. L'association proguanil-chloroquine (Savarine® ou Nivaquine® + Paludrine®) est citée par 130 patients (56 % des patients ayant pris une chimioprophylaxie), la chloroquine seule dans 74 cas (32 % des cas). Les autres prophylaxies utilisées seules sont la méfloquine (n=11), le proguanil (n=10), la pyriméthamine (n=6). Ces deux derniers composés ne sont pas des prophylaxies recommandées par le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) [7].

## Echecs chimioprophylactiques

Les accès palustres sous chimioprophylaxie chloroquine-proguanil ont correspondu à 20 échecs vrais, 18 faux échecs, 5 douteux et 4 non documentés. Dans 38 cas, l'échec est survenu en cours de prise de chimioprophylaxie, dans 4 cas à 10 jours de l'arrêt de la chimioprophylaxie et dans 3 cas à plus de 10 jours. Pour 2 patients le délai n'est pas connu. Entre 1997 et 2000, on a rapporté 62 vrais échecs à l'association chloroquine-proguanil à l'Hôpital Bichat-Claude-Bernard (Paris) [8].

Parmi les 25 cas d'accès palustre sous chimioprophylaxie à la chloroquine signalés, on compte 11 faux échecs, 8 échecs vrais et 6 douteux ou sans données, dont 13 cas d'échecs cliniques survenus en cours de prise de la chimioprophylaxie et 3 après l'arrêt de celle-ci.

Parmi les 11 cas d'accès palustre sous méfloquine, seuls 3 cas ont été retenus comme échecs prophylactiques vrais, provenant du Cameroun, du Bénin et de Zambie.

## Traitement des cas

### Traitement antérieur à l'hospitalisation

Le traitement est connu pour 478 cas (80 % des cas signalés) (n=596) dont 99 l'ont commencé avant la prise en charge à l'hôpital. Les molécules utilisées sont : la quinine (n=43), la chloroquine (n=23), l'halofantrine (n=18), la méfloquine (n=10) ou l'association sulfadoxine-pyriméthamine (n=5).

### Traitement lors de l'hospitalisation

Le traitement du paludisme à *P. falciparum* prescrit à l'hôpital (n=455) a été, dans 71 % des cas, une monothérapie par quinine (n=321). Les autres traitements ont été : halofantrine dans 71 cas (16 %), méfloquine dans 44 cas (10 %), chloroquine dans 3 cas, un dérivé de l'artémisinine dans 2 cas et doxycycline (n=1). Deux associations ont été utilisées en première intention : quinine + doxycycline (1cas), proguanil + atovaquone (Malarone) (1cas).

Pour intolérance ou d'autres raisons non-mentionnées, 4 traitements par la quinine ont été relayés par un traitement par l'halofantrine et 6 par la méfloquine. Un traitement par l'halofantrine a été remplacé par l'association quinine + tétracycline.

Deux échecs cliniques dus à un sous dosage de la quinine ont été rapportés. Les rechutes sont survenues, respectivement à 20 jours et à 15 jours. Par ailleurs, sur 96 patients dosés en quinine, 13 présentaient des traces de quinine dans le plasma alors qu'ils n'ont signalé aucune prise.

Pour l'halofantrine, dans un cas originaire de Côte d'Ivoire, le traitement a été considéré comme un échec clinique, la sensibilité à l'halofantrine n'a pas été mesurée. Dans 6 cas (dont 2 enfants), une cure unique d'halofantrine a entraîné une rechute, suivie de guérison après traitement secondaire par l'halofantrine (3 cas) ou la quinine (3 cas).

Le traitement prescrit à l'hôpital après diagnostic pour les espèces autres que *P. falciparum* (n=46) a été la chloroquine dans 24 cas, la quinine dans 13 cas, l'halofantrine dans 5 cas et la méfloquine dans 4 cas.

## Chimiosensibilité des isolats sans chimioprophylaxie ou traitement avant prélèvement

163 tests de chimiosensibilité (152 à Paris, 11 à Marseille) ont été réalisés. La moitié (47 %) de ces tests a présenté un échec de culture lié à la présence de médicament ou à une altération du parasite.

La sensibilité à la quinine a été déterminée sur 11 isolats, aucune résistance in vitro n'a été décelée.

La sensibilité à l'halofantrine a été mesurée sur 11 isolats dont 10 interprétables. 2 isolats ont montré une résistance in vitro.

La sensibilité à la chloroquine a été mesurée sur 57 isolats (47 %) ont montré une résistance in vitro à la chloroquine, toutes régions confondues. En 2000, en fonction des groupes de pays définis par le CSHPF, il n'est pas mis en évidence de différence significative de la proportion de chloroquino-résistance entre le groupe 2 et le groupe 3. En agrégeant les données concernant la chimiorésistance à la chloroquine de 1996 à 2000, il existe une différence significative entre la proportion de chloroquino-résistance des pays du groupe 2 (39 %) et du groupe 3 (70 %) [9].

La sensibilité à l'amodiaquine (AQm) a été mesurée sur 76 isolats, 5 isolats ont montré une résistance in vitro (CI50 63 à 88 nM). Les CI50 de la CQ et de l'AQm sont corrélées (r=0,8).

La sensibilité au cycloguanil (CG) a été mesurée sur 270 isolats par détermination du codon DHFR 108 et 27 par test in vitro. Toutes régions confondues, en 2000, le pourcentage d'isolats présentant la mutation ponctuelle S108N dans le gène DHFR est de 53 %. Il n'existe pas de différence significative entre 1996 et 2000, sauf en comparant les pays du groupe 2 et 3 [9].

La sensibilité à la fois à la chloroquine et au cycloguanil a été mesurée sur 53 isolats. En 2000, toutes régions confondues, la proportion observée de bi-résistance est de 27 % et calculée (produit de la proportion de chloroquino-résistance et de celle de cycloguanilo-résistance) de 26 % (IC<sub>95</sub> = 14-34 %). Quels que soient les groupes considérés, cette proportion est stable entre 1996 et 2000 : il n'existe pas de différence significative. En 2000, il existe une différence significative de la proportion de bi-résistance calculée entre le groupe 2 et le groupe 3 (p<0,001). Pour les cinq années écoulées, la proportion de bi-résistance observée est de 15 % [IC<sub>95</sub> 8,1-22] dans les pays du groupe 2 et de 39 % [IC<sub>95</sub> 21-45] dans les pays du groupe 3 [9].

## DISCUSSION

L'évaluation de la chimiosensibilité du paludisme nécessite des études dans les pays d'endémie ainsi que l'étude des souches d'importation. Faute de données sur le nombre de sujets pour lesquels la chimioprophylaxie a prévenu le paludisme, cette évaluation n'est qu'une estimation.

La disponibilité à partir de l'an 2000 d'un nouveau marqueur génomique, *pfcr*, associé à la résistance à la chloroquine, et ce de manière plus importante que *Pfcr2* [5], pourrait constituer un progrès important pour la surveillance de la sensibilité à cette molécule. Pour l'instant cet outil reste en phase d'évaluation. La présence à 100 % de l'allèle mutant de *pfcr* observée dans une série d'échecs prophylactiques vrais à l'association chloroquine plus proguanil confirme l'intérêt de ce marqueur [8].

La différence significative entre la proportion de souches présentant la mutation ponctuelle S108N dans le gène DHFR dans la population non soumise à chimioprophylaxie ou à un traitement antérieur (52 %) et celle ayant reçu une prophylaxie par proguanil ou chloroquine plus proguanil (98 %) [8] confirme l'intérêt de ce marqueur. La fréquence importante de triple mutants DHFR observée parmi les échecs prophylactiques chloroquine plus proguanil [8] plaide pour l'emploi de l'étude des codons 51 et 59 de la DHFR dans la surveillance de la résistance aux antifoliques.

Les taux de résistance par pays sont généralement similaires dans le paludisme d'importation et dans l'analyse des échantillons de terrain que nous avons effectuée à l'IMTSSA ou au CNRCP entre 1996 et 2000 [9].

Depuis 1996, il n'a pas été mis en évidence d'évolution de la bi-résistance (chloroquine et cycloguanil) entre les années. L'efficacité attendue de la prophylaxie chloroquine plus proguanil est de 85 % pour les voyageurs effectuant un séjour similaire aux malades de cette étude dans les pays du groupe 2 contre 61 % pour les pays du groupe 3.

L'efficacité attendue de la prophylaxie par la méfloquine que nous avons déterminée de façon similaire en 1995-97 était de 91,5 % en Afrique [10]. Il a été précédemment montré que la résistance à la méfloquine était sporadique et sans regroupement géographique [10].

## CONCLUSION

Les données du CNRCP indiquent, en 2000, une stabilité de la chimio-résistance du paludisme d'importation dans les zones d'où proviennent en plus grand nombre les isolats reçus. La bi-résistance (chloroquine plus cycloguanil) est stable, toutes zones confondues, entre 1996 et 2000. Le traitement de première intention de l'accès simple de paludisme à *Plasmodium falciparum*, en 2000, est la monothérapie par la quinine ou la méfloquine. Pour ces molécules, la résistance est rare en Afrique et sans évolution au cours des 15 dernières années. L'autorisation de mise sur le marché de la Malarone en prophylaxie comme en curatif nécessite la surveillance de la chimiosensibilité des souches d'importation à l'atovaquone et au cycloguanil dans les années à venir. Nous confirmons que la principale origine du paludisme d'importation est le défaut d'observance de la chimioprophylaxie et que les échecs thérapeutiques sont le plus souvent dus à un défaut d'observance du traitement. Une meilleure connaissance des risques du paludisme nous semble importante pour éviter les prises en charge retardées. Un suivi clinique et biologique rigoureux s'impose pour renforcer nos connaissances sur les antipaludiques utilisés en France.

## RÉFÉRENCES

- [1] Conseil supérieur d'hygiène publique de France. Recommandation sanitaires pour les voyageurs. *BEH*, 2000, 28.
- [2] Qari SH, Shi YP, Pieniazek NJ, Collins WE, Lal AA. Phylogenetic relationship among the malaria parasites based on small subunit rRNA gene sequences : monophyletic nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Phylogenet Evol* 1996, 6 : 157-65.
- [3] Le Bras J, Ringwald P. Situation de la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* en Afrique en 1989. *Med. Trop.*, 1990, 50: 11-16.
- [4] Durand R, Ramiliarisoa O, Sécardin Y, de Pécoulas PE, Basco LK, Le Bras J. DHFR gene point mutation as a predictor of *P. falciparum* resistance to cycloguanil in malaria cases from Africa imported to France. *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.* 1997, 91, 460-461.
- [5] Durand R, Sayeh J, Vauzelle J, Delabre F, Jesic Z, Le Bras J. Analysis of pfrct point mutation and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 2001, 114: 95-102.
- [6] Touze JE, Keudjian A, Fusai T, Doury JC. Human pharmacokinetics of chloroquine and proguanil delivered in a single capsule for malaria chemoprophylaxis. *Trop Med Parasitol*, 1995, 46: 158-160.
- [7] XII<sup>e</sup> Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse de la Société de pathologie infectieuse de langue française. Prise en charge et prévention du paludisme d'importation à *P. falciparum*. *Méd. Mal. Infect.* 1999, 29: 375-379.
- [8] Durand R, Sayeh J, Bouchaud O, Ralaimazava P, Keudjian A, Le Bras J. *Plasmodium falciparum* : pfrct and DHFR mutations are associated with Chloroquine plus Proguanil Prophylaxis failures in travelers. *J Inf Disease* 2001, 184 :1633-1634.
- [9] Le Bras J, Ralaimazava P, Godineau N, Keudjian A, Zorica J, Bouchaud O, Pradines B, Durand R. Chimiosensibilité du paludisme importé en France en 2000. Rapport d'activité 2000, Centre national de référence pour la chimiosensibilité du paludisme CHU Bichat-Claude-Bernard.
- [10] Le Bras J, Durand R, Di Piazza JP, Pradines B, Longuet C, Parzy D. Prise en compte des disparités de résistance de *Plasmodium falciparum* en Afrique dans la décision chimioprophylactique. *Presse Med* 1998, 27 : 1419-1423.

# Une épidémie d'infection à méningocoque de type B dans une commune du Jura, janvier-février 2000

M. Di Palma<sup>1</sup>, G. Colomb<sup>2</sup>, A. Perrocheau<sup>3</sup>, JM. Alonso<sup>4</sup>, M. Taha<sup>4</sup>, D. Levy-Bruhl<sup>3</sup>, P. Renault<sup>5</sup>, M. Lequelléc-Nathan<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Direction régionale des affaires sanitaires et sociales de Bourgogne - Cellule interrégionale d'épidémiologie Centre-Est ;

<sup>2</sup> Direction départementale des affaires sanitaires et sociales du Jura ; <sup>3</sup> Institut de veille sanitaire - Département des maladies infectieuses ;

<sup>4</sup> Centre national de référence des méningocoques ; <sup>5</sup> Direction générale de la santé

## INTRODUCTION

Entre le 21 janvier et le 16 février 2000, la survenue de 3 cas de méningite à méningocoque de formule antigénique B :15 : P1-7, 16 et d'1 cas suspect dans une commune de 12 000 habitants du département du Jura, a conduit les autorités sanitaires à décider la mise en œuvre d'une chimioprophylaxie à l'échelle de la population de deux quartiers. Ce travail décrit le contexte de survenue des cas, le processus de décision qui a permis la gestion de la crise et les modalités de mise en œuvre de la prophylaxie élargie.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### État des lieux

**La définition de cas :** tout patient présentant un tableau clinique évocateur d'infection invasive à méningocoque, hospitalisé entre le 21 janvier et le 16 février 2000 et résidant dans la commune de Saint-Claude. Un cas était confirmé quand la souche de méningocoque avait été isolée dans le sang ou le LCR ; les autres cas étaient des cas probables.

**Description temps-lieu-personnes :** les cas ont été décrits selon la date de survenue, l'âge, le sexe, le lieu de résidence et les collectivités fréquentées. Une analyse phénotypique et génotypique des souches de méningocoques isolées a été réalisée par le Centre national de référence des méningocoques (CNRM).

**Comparaison des taux d'incidence :** l'incidence a été comparée à celle des années antérieures et à celle des départements voisins. Une recherche active d'autres cas a été réalisée auprès des Directions départementales des affaires sanitaires et sociales (Ddass) des départements voisins et un contact a été pris avec les autorités sanitaires du Canton suisse adjacent.

### Processus décisionnel

**Création d'une cellule de crise :** elle a été réunie à l'initiative de la Direction générale de la santé (DGS). Elle était composée de la Direction départementale des affaires sanitaires et sociales (Ddass) du Jura, de la Cellule interrégionale d'épidémiologie (CIRE) du Centre-Est, du CNRM, de l'Institut de veille sanitaire (InVS), de la Direction générale de la santé, et d'un membre du Conseil supérieur d'hygiène publique de France.

**Une revue de la littérature** publiée et répertoriée sur Medline sur les expériences de chimioprophylaxie étendue dans les communautés ouvertes a été réalisée.

**Analyse de l'état des lieux :** deux conférences téléphoniques ont été organisées les 18 février et 2 mars.

• La première avait pour objectif de réunir et d'analyser l'ensemble des informations disponibles pour dresser un état des lieux de la situation et décider de la conduite à tenir autour du cas n° 3. Pour un éventuel élargissement de la prophylaxie, la décision a été d'attendre le résultat de l'analyse de la souche du 4<sup>e</sup> cas et la confirmation d'une infection à méningocoque pour le cas n° 2.