

RÔLE DE LA DENSITÉ PARASITAIRE INITIALE SUR LA SENSIBILITÉ À LA CHLOROQUINE DES ISOLATS DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* EN CULTURE *IN VITRO*

KIPRE Gueyraud Rolland¹, GUEDE-GUINA Frédéric¹, DEPOIX Delphine²,
GRELLIER Philippe² et DJAMAN Allico Joseph^{1,3}

¹Laboratoire de Pharmacodynamie-biochimique, UFR Biosciences, Université de Cocody-Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire
kip_rolland@yahoo.fr / Tél : 06 09 70 01 91 / 26 rue du Jet d'eau, F-13003 Marseille, France.

²USM 0504 "Biologie fonctionnelle des protozoaires" EA 3335 Département "Régulation, Développement, Diversité Moléculaire" Muséum National d'Histoire Naturelle, Case Postale 52. 61 rue Buffon, F-75231 Paris Cedex 05, France.

³Laboratoire de biochimie, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, BP V 490, Abidjan.

Résumé

Cette étude a porté sur huit isolats de *Plasmodium falciparum* de densité parasitaire initiale (DPi) inférieure ou supérieure à 8000 GRP/ μ l), mis en culture *in vitro* selon la variante isotopique du microtest OMS en présence d'un antipaludique de référence, la chloroquine.

Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence deux isolats CQ-S (25%) contre six isolats CQ-R (75%). En considérant la répartition de la population des isolats par rapport à la DPi, il a été obtenu parmi les cinq isolats de DPi > 8000 GRP/ μ l (0,2%), quatre isolats de phénotype résistant (80%) contre un isolat de phénotype sensible (20%). Par contre, parmi les trois isolats de DPi compris entre 4000 (0,1%) et 8000 GRP/ μ l (0,2%), l'un d'entre eux était CQ-S (33%) pour deux isolats CQ-R (67%).

En définitive, un test Kappa a permis de conclure qu'il n'existe pas de corrélation entre la charge parasitaire initiale et le phénotype des isolats de *P. falciparum* (kappa = 0,14), malgré le nombre relativement faible d'isolat mis en culture.

Mots clés : Côte d'Ivoire, chloroquine, phénotype, *Plasmodium falciparum*, malaria, test *in vitro*

Abstract

This survey carried on eight isolates of *Plasmodium falciparum* whose initial parasites density (iPD) was lower or superior to 8000 GRP/ μ ls (0.2%) and put in *in vitro* culture according to the isotopic variable of OMS microtest in presence of a reference antimalarial drug (chloroquine).

The results of this study permitted to get two CQ-S isolates (25%) against six CQ-R isolates (75%). While considering the distribution of the population of *P. falciparum* malaria isolates in relation to the iPD, it was obtained among the five isolates which iPD > 8000 GRP/ μ l (0.2%), four phenotype resistant isolates (80%) against one sensitive isolate (20%). On the other hand, among the three isolates which an iPD lower than 8000 RBC/ μ l (0.2%), one among them was CQ-S (33%) for two CQ-R isolates (67%).

Finally, a Kappa test permitted to conclude that it doesn't exist any relationship between the initial parasites density and the phenotype of *P. falciparum* isolates (kappa =0.14), in spite of the relatively weak number of *P. falciparum* malaria isolates

Keywords : Côte d'Ivoire, chloroquine, phenotype, *Plasmodium falciparum*, malaria, *in vitro* test

1. Introduction

Le paludisme demeure l'une des maladies parasitaires les plus fréquentes dans le monde et probablement l'une des plus meurtrières de toutes les affections humaines. Le bilan n'est guère optimiste car 3,2 milliards de personnes sont exposées au méfait de cette pathologie, soit plus de 41 % de la population mondiale (OMS, 2008). Chaque année, 300 à 500 millions de personnes sont atteintes de paludisme, souvent sous sa forme grave, avec 1 million de décès (Greenwood & Mutabingwa, 2002; Bray *et al.*, 2006, OMS, 2008). Malheureusement, ce sont surtout les enfants de moins de 5 ans (OMS, 2008; Mabunda *et al.*, 2008) et les femmes enceintes (les primigestes) (Steketee *et al.*, 1996, Rogerson *et al.*, 2007 ; Tan *et al.*, 2008) qui payent le plus lourd tribut à ce triste record de mortalité pour la plupart en Afrique sub-saharienne.

L'une des difficultés de l'utilisation des amino-4-quinoléines, et des antimétabolites (antifoliques, antifoliniques) en particulier, est la propagation des isolats résistants (Djaman *et al.*, 2004). La résistance aux antipaludiques peut être déterminée, soit après un test *in vivo* appelé test d'efficacité thérapeutique, soit après un test *in vitro* dont le plus utilisé est le microtest OMS, soit encore après un test moléculaire grâce aux marqueurs génétiques de la résistance. Ces différents tests peuvent être couplés pour permettre une meilleure surveillance de la chimiorésistance de *P. falciparum* (Basco & Ringwald, 2000 ; OMS, 2002). Si les sujets à inclure dans le test d'efficacité thérapeutique doivent avoir une densité parasitaire comprise entre 2000 et 200 000 parasites asexués par microlitre dans les zones de paludisme à transmission permanente comme la Côte d'Ivoire, la densité parasitaire des sujets à inclure dans le test de chimiosensibilité *in vitro* nécessite une parasitémie initiale supérieure

ou égale à 4000 globules rouges parasitée par microlitre de sang (OMS, 1984). Dans ce dernier cas, lorsqu'il s'agit des tests réalisés sur des isolats de la "nature" (par opposition à une souche de laboratoire), la CI_{50} déterminée est la résultante de la sensibilité de la population des plasmodies de cet isolat. Ainsi, se pourrait-il qu'il y ait une relation entre la densité parasitaire initiale et le phénotype de l'isolat.

Dans la présente étude, nous présentons les résultats de l'analyse de l'influence du niveau de la parasitémie initiale sur l'expression de la sensibilité des isolats de *P. falciparum* à la chloroquine.

2. Sujets, matériel et méthodes

2.1. Sujets

Le Centre de Santé Communautaire de Koumassi a servi de cadre au recrutement de sujets atteints de paludisme non compliqué dont les prélèvements de sang satisfaisaient aux critères majeurs d'inclusion du test *in vitro*, densité parasitaire ≥ 4000 (0,1%) globules rouges parasités (GRP)/ μ l de sang et infection mono spécifique à *P. falciparum* (OMS, 1984). Tout sujet présentant un cas de paludisme grave et un taux d'hémoglobine inférieur à 8 g/dl a été exclu de l'étude. Les sujets inclus dans cette étude ont subi un prélèvement d'environ 5 ml de sang veineux sur anticoagulant (EDTA), nécessaire pour la réalisation du test de chimiosensibilité *in vitro*.

2.2. Milieu de culture et matériel biologique

Le RPMI 1640 contenant de l'HEPES [acide N-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-N'-(2-éthanesulfonique)] 25 mM final, du bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) (Merck, Mannheim, Allemagne) 25 mM final a été nécessaire pour la préparation du milieu de culture initial encore appelé RPMI de lavage. Le milieu complet (RPS) est préparé par addition de 10% de sérum humain au RPMI de lavage.

Des globules rouges parasités (GRP) et des globules rouges sains (GRS) ont été utilisés en guise de matériel biologique pour préparer l'inoculum (milieu complet et sang parasité). Les plaques de 96 puits étaient pré-chargées en chloroquine (Aventis, Antony, France) dont les concentrations finales variaient de 12,5 nM à 1600 nM.

2.3. Méthodes

2.3.1. Préparation des globules rouges parasités

Le culot globulaire obtenu après lavage des GRP trois fois avec le RPMI de lavage a permis de sélectionner les parasites de *P. falciparum* au stade jeune parasite ou "ring". Toutefois, les isolats dont la densité parasitaire initiale étaient supérieure à 8000 GRP / μ l ($> 0,2\%$) ont été dilués à l'aide des globules rouges sains pour ramener le nombre de GRP entre 0,1 et 0,2%, avec un hémocrite de 50%.

2.3.2. Test *in vitro* de chimiosensibilité

Les isolats de *P. falciparum* sont maintenus en culture selon la méthode de Trager et Jensen (Trager & Jensen, 1976 ; Trager, 1990) dans le milieu RPMI 1640 contenant 10% de sérum humain. Après 42 heures d'incubation dans une étuve à CO₂, les nucléoprotéines et les membranes érythrocytaires et plasmodiales sont recueillies sur un papier filtre à l'aide d'un collecteur cellulaire (Skatron Titertex Cell Harvester, Lier, Norway), puis, la quantité d'hypoxanthine tritiée incorporée par les parasites est donnée en coup par minute (cpm) grâce à un compteur à scintillation liquide. Les résultats obtenus ont permis de tracer des droites de régression linéaire, puis de déterminer pour chaque isolat étudié la CI₅₀ de la chloroquine en nanomolaire (nM). Le phénotype de l'isolat est noté, soit R pour résistant, soit S pour sensible selon que la CI₅₀ soit supérieure ou inférieure à 100 nM.

2.3.3. Méthode statistique

Le test de Kappa de Cohen a permis de déterminer la concordance entre le niveau de densité parasitaire initial et le phénotype des isolats (Com-Nougue & Rodary, 1987). Ainsi, le degré de l'accord entre deux tests peut être qualifié comme suit : très bon, le coefficient kappa de Cohen sera $\geq 0,81$; bon, 0,61 - 0,80 ; modéré, 0,41 - 0,60 ; médiocre, 0,21 - 0,40 ; mauvais, 0 - 0,20 ; très mauvais, < 0 .

3. Résultats

Au cours de cette étude, les 8 isolats mis culture avaient une parasitémie initiale variant de 4000 globules rouges parasités par μ l de sang (GRP/ μ l) (0,1%) à 130000 GRP/ μ l (3,25%). Parmi ces 8 isolats, 3 (37,5%) avaient une densité parasitaire comprise entre 0,1% et 0,2%

(8000 GPR/ μ l), contre 5 isolats (62,5%) à densité parasitaire supérieure à 0,2%. Les CI_{50} déterminées ont permis d'identifier 6 isolats chloroquinorésistants (CQ-R) (75%) et 2 isolats chloroquinosensibles (CQ-S) (25%) avec des CI_{50} variant de 31,25 nM à 280 nM. La moyenne arithmétique des CI_{50} variait de $205,5 \pm 69,69$ nM pour les isolats CQ-R contre une moyenne de $26,95 \pm 6,08$ nM pour les isolats CQ-S.

L'analyse de la corrélation DPi/phénotype (R ou S) des isolats a permis d'obtenir parmi les 6 isolats chloroquinorésistants, 4 isolats (67%) de DPi > 0,2%, contre 2 isolats (33%) de DPi \leq 0,2%. Dans la population des isolats chloroquinosensibles, 1 isolat (50%) avait une DPi > 0,2% pour 1 isolat CQ-S (50%) de DPi \leq 0,2% (Tableau 1).

La recherche de la corrélation entre l'expression des phénotypes des isolats et la densité parasitaire initiale nous a donné une valeur de Kappa égale 0,14 (Tableau 2). Cette valeur nous a permis donc d'affirmer qu'il n'y a pas de corrélation entre l'expression du phénotype d'un isolat et sa densité parasitaire initiale.

Tableau 1 : Expression du phénotype des isolats en fonction de la Dpi

N° ISOLATS	DP INITIALE EN GRP x 1000 (% GRP)	CI_{50} en nM	PHÉNOTYPE
AM	6 (0,15%)	140	R
AO	25 (0,62%)	280	R
KM	15 (0,37%)	250	R
IB	130 (3,25%)	31,25	S
LF	6 (0,15%)	22,65	S
SM	24 (0,6%)	275	R
TA	20,5 (0,51%)	138	R
TM	4 (0,1%)	150	R

Tableau 2 : Concordance entre la densité parasitaire initiale et le phénotype des isolats de *P. falciparum*

DENSITÉ PARASITAIRE EN GPR/ μ L*	PHÉNOTYPE DES ISOLATS		Total
	CQ-R	CQ-S	
Supérieure à 8000 (0,2 %)	4	1	5
Comprise entre 4000 (0,1%) et 8000 (0,2%)	2	1	3
Total	6	2	8

*Kappa = 0,14

4. Discussion

Le rôle de la densité parasitaire dans l'expression clinique et biologique du paludisme a déjà fait l'objet de quelques travaux (Touze et al., 1989 ; Guiguemdé et al., 1992 ; Djaman et al., 2007). Il est ressorti de ces travaux qu'il n'existait pas de corrélation statistiquement significative entre la densité parasitaire et les symptômes cliniques et biologique du paludisme, bien qu'un niveau de parasitémie plus élevée soit constaté dans les formes aiguës du paludisme à *P. falciparum*. Malheureusement, au plan phénotypique, très peu d'études ont été consacrées à la relation entre le niveau de la parasitémie des isolats fraîchement récoltés provenant des malades présentant un accès palustre non compliqué et la survenue d'une chimiorésistance à *Plasmodium falciparum* en culture *in vitro*.

Les résultats de cette étude ont montré que l'expression du phénotype d'un isolat à la chloroquine n'était pas liée à la densité parasitaire initiale de celui-ci. En effet, l'isolat TM avec une parasitémie initiale de 4000 Grp/ μ l de sang était de phénotype résistant alors que l'isolat IB avec une parasitémie initiale de 130000 Grp/ μ l de sang avait un phénotype sensible à la chloroquine. Ce manque de corrélation entre expression du phénotype et densité parasitaire s'est donc traduit par une valeur de Kappa très petite.

Cependant, il faut noter que le plus grand nombre d'isolats résistants à la chloroquine provenaient d'isolats à forte densité parasitaire initiale (supérieure à 8000 Grp/ μ l).

Il est important de préciser que tous les isolats de cette étude provenaient de sujets atteints de paludisme non compliqué et non de porteurs asymptomatiques. Toutefois, étant donné que le test *in vitro* ne donne qu'une réponse globale de la population parasitaire prélevée et mise en culture, si la fraction de la population résistante (R) est de faible proportion, elle peut être méconnue, alors qu'elle pourrait être à la base d'une rechute chez le sujet malade (Charmot & Rodhain, 1982).

5. Références

BASCO L. K., RINGWALD P. (2000)

Chimiorésistance du paludisme : problème de la définition et de l'approche technique. Cahiers Santé 10, 47-50.

BRAY P.G., MUNGTHIN M., HASTINGS I.M., BIAGINI G.A., SAIDU D.K., LAKSHMANAN V., JOHNSON D.J., HUGHES R.H., STOCKS P.A., O'NEILL P.M., FIDOCK D.A., WARHURST D.C., WARD S.A. (2006)

PFCRT and the trans-vacuolar proton electrochemical gradient: regulating the access of chloroquine to ferriprotoporphyrin IX. Mol. Microbiol. 62, 238-251.

CHARMOT G., RODHAIN F. (1982)

La chimiorésistance chez *Plasmodium falciparum* : Analyse des facteurs d'apparition de d'extension. Med. Trop. 42, 418-426.

COM-NOUGUE C., RODARY C. (1987)

Revue des procédures pour mettre en évidence l'équivalence de deux traitements. Rev. Épidemiol. Santé Publique 35, 416-30.

DJAMAN J.A., KAUFFY P.C., YAVO W., BASCO L.K., KONE M. (2004)

Évaluation *in vivo* de l'efficacité thérapeutique de l'association sulfadoxine-pyriméthamine au cours du paludisme non compliqué chez les enfants de Yopougon (Abidjan, Côte d'Ivoire). Bull. Soc. Pathol. Exot. 97, 180-182.

DJAMAN J.A., MAZABRAUD A., BASCO L. (2007)

Sulfadoxine-pyrimethamine susceptibilities and analysis of the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of *Plasmodium falciparum* isolates from Côte d'Ivoire. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 101, 103-112.

GUIGUEMDÉ T.R., TOÉ A.C.R., SADELER B.C., GBARY A.R., OUÉDRAOGO J.B., LOUBOUTIN-CROC J.P. (1992)

Variation de la densité parasitaire de *Plasmodium falciparum* chez les porteurs asymptomatiques : conséquences dans les études de chimiorésistance du paludisme. *Med. Trop.* 52, 313-315.

GREENWOOD B., MUTABINGWA T. (2002)

Malaria in 2002, *Nature* 415, 670-672.

MACETE E., APONTE J.J., GUINOVART C., SACARLAL J., OFORI-ANYINAM O., MANDOMANDO I., ESPASA M., BEVILACQUA C., LEACH A., DUBOIS M.C., HEPPNER D.G., TELLO L., MILMAN J., COHEN J., DUBOVSKY F., TORNIEPORTH N., THOMPSON R., ALONSO P.L. (2007)

Safety and immunogenicity of the RTS,S/AS02A candidate malaria vaccine in children aged 1-4 in Mozambique. *Trop. Med. Int. Health* 12, 37-46.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. (1984)

Mode d'emploi du nécessaire d'épreuve (Micro-test) pour l'évolution de la réponse de *P. falciparum* à la chloroquine *in vitro*, 7p.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. (2002)

Surveillance de la résistance aux antipaludiques, rapport d'une consultation de l'OMS, Genève, Suisse, WHO/CDS/CSR/EPH/2002.17, 35p.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ (2005)

Le rapport mondial sur le paludisme: Briefing de 5 mn sur le rapport mondial 2005 de l'OMS et de l'UNICEF sur le paludisme. 5p.

ROGERSON S. J., HVID L., DUFFY P. E., LEKE R. F. G., TAYLOR D. W. (2007)

Malaria in pregnancy : pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis*, 7 : 105-117.

STEKETEE R.W., WIRIMA J. J., SLUTSKER L., HEYMANN D. L., BREMAN J. G. (1996)

The problem of malaria and malaria control in pregnancy in sub-Saharan Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 2-7.

TAN S. O., MCGREADY R., ZWANG J., PIMANPANARAK M., SRIPRAWAT K., THWAI K. L., MOO Y., ASHLEY E. A., EDWARDS B., SINGHASIVANON P., WHITE N. J., NOSTEN F. (2008)

Thrombocytopaenia in pregnant women with malaria on the Thai-Burmese border. *Malaria Journal* 7, 209-218.

TOUZE J.E., CHAUDET H., BOURGADE A., FAUGÈRE B., HOVETTE P., AUBRY P., PÈNE P. (1989)

Aspect cliniques actuels et rôle de la densité parasitaire dans l'expression du paludisme à *Plasmodium falciparum*. *Bull. Soc. Exot.* 82, 110-117.

TRAGER W. (1990)

On the establishment in culture of isolates of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, p 466.

TRAGER W., JENSEN J.B. (1976)

Human malaria parasite in continuous culture. *Science* 193, 673-675.