

## EVALUATION DE LA SENSIBILITE *IN VITRO* DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* AUX ANTIMALARIQUES PAR UN TEST COLORIMETRIQUE (DELI-MICROTEST)

P. BRASSEUR, P. AGNAMEY, A. MORENO, P. DRUILHE

*Med. Trop.* 2001 ; **61** : 545-547

**RESUME** • La méthode colorimétrique de détermination de la sensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum* aux antimalariques ou DELI-microtest (Double-Site Enzyme Linked LDH Immunodetection) est basée sur la détection de la lactate deshydrogénase spécifique de *Plasmodium falciparum* (pLDH) par 2 anticorps monoclonaux reconnaissant 2 sites différents de l'enzyme. Le second anticorps monoclonal est biotinylé et peut ainsi fixer une streptavidine marquée à la peroxydase, qui en présence de son substrat développe une réaction colorée. La mesure des densités optiques permet d'évaluer quantitativement la pLDH libérée par la croissance parasitaire avec lesquelles elles sont parfaitement corrélées. Il existe une excellente corrélation entre les CI50 obtenues avec le DELI-microtest et le classique microtest isotopique et la plus grande sensibilité du DELI-microtest permet de déterminer des CI50 sur des prélèvements de faibles parasitémies allant jusqu'à 0,005%. Il est plus facile et plus rapide à exécuter et moins coûteux que le microtest isotopique permettant une utilisation plus facile pour des enquêtes de terrain. Enfin sa grande sensibilité permet d'inclure dans les études des isolats de *Plasmodium falciparum* de faible parasitémies.

**MOTS-CLES** • DELI-microtest - Chimiosensibilité *in vitro* - *Plasmodium falciparum*.

### EVALUATION OF *IN VITRO* DRUG SENSITIVITY FOR *PLASMODIUM FALCIPARUM* USING A COLOURIMETRIC ASSAY (DELI-MICROTEST)

**ABSTRACT** • The DELI-microtest (Double-Site Enzyme Linked LDH Immunodetection) is a colorimetric method for determination of *Plasmodium falciparum in vitro* sensitivity to antimalarial drugs. This method is based on the capture of the specific lactate deshydrogenase of *Plasmodium falciparum* (pLDH) using 2 monoclonal antibodies which recognize 2 different sites of the enzyme. The second monoclonal antibody is biotinylated and may catch a peroxidase-labelled streptavidine and develop a colorimetric reaction in the presence of peroxidase substrate. The level of pLDH released by parasite growth is determined by the measure of optical densities. An excellent correlation has been observed between the IC50's obtained using the DELI-microtest and the classical isotopic microtest, and the high sensitivity of the DELI-microtest can be used to measure the IC50's for isolates with parasitemia as low as 0.005%. It is easier and faster to process than isotopic microtest in field conditions. In addition, due to high sensitivity of the DELI-microtest, isolates with a low parasitemia may be included in the studies.

**KEY WORDS** • DELI-microtest - *In vitro* chemosensitivity - *Plasmodium falciparum*.

La sensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum* aux antimalariques est déterminée classiquement par des méthodes isotopiques qui ne sont pas toujours faciles à utiliser sur le terrain. La méthode colorimétrique ou DELI-microtest (Double-Site Enzyme Linked LDH Immunodetection) est basée sur la détection de la lactate deshydrogénase spécifique de *Plasmodium falciparum* (pLDH) par 2 anticorps monoclonaux reconnaissant 2 sites différents de l'enzyme. Cette méthode s'est révélée très sen-

sible et les densités optiques (DO) obtenues par ce test colorimétrique étaient parfaitement corrélées avec les densités parasitaires.

### PRINCIPE DU DELI-MICROTEST

L'anticorps monoclonal Mab17E4 spécifique de la pLDH de *Plasmodium falciparum*, préalablement fixé dans les puits d'une microplaque pour ELISA, va capter la pLDH libérée au cours de la culture du parasite. L'addition d'un second anticorps monoclonal Mab 19G7 biotinylé va assurer sa fixation sur un second site de la pLDH. L'addition d'une streptavidine marquée à la peroxydase permet d'évaluer l'activité enzymatique par addition de son substrat (3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine) en présence de peroxyde d'hydrogène. La réaction enzymatique est ensuite bloquée par l'acide phos-

• Travail du Laboratoire de Parasitologie (P.B., Professeur ; P.A., Docteur en médecine), Faculté de Médecine-Pharmacie, Rouen et du Laboratoire de Parasitologie Bio-médicale (AM, Docteur en médecine, P.D., Docteur en médecine, Chef de Laboratoire, ), Institut Pasteur, Paris, France.

• Correspondance : P. BRASSEUR, Faculté de Médecine-Pharmacie, 22, boulevard Gambetta, 76183 Rouen, France • Fax: + 02 35 14 85 24 • e-mail : philippe.brasseur@wanadoo.fr •

• Article sollicité.

phorique et l'intensité de la coloration jaune développée est évaluée en DO au spectrophotomètre à 450 nm.

---

### TECHNIQUE

---

#### Culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum*.

Le milieu de culture utilisé est le RPMI 1640 (Gibco BRL Grand Island, NY) contenant 35 mM d'HEPES (Sigma), 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 % d'albumax (Gibco BRL Grand Island, NY), 1 mg d'hypoxanthine (Sigma) et 5 µg de gentamycine (Gibco BRL Grand Island, NY). Les conditions de culture en microplaques de 96 puits en présence de différentes concentrations d'antimalariques sont les mêmes que celles habituellement utilisées pour le test isotopique (1) à l'exception de l'addition d'hypoxanthine tritiée. Les plaques obtenues après culture sont congelées à -20°C, décongelées pendant 30 min à l'étuve à 37°C et ceci 3 fois de suite pour obtenir une hémolyse complète des hématies.

#### Marquage des plaques par le Mab 17 EA.;

Une dilution de Mab 17 EA, fourni par le Dr Makler (2, 3) en tampon PBS, pH 7,4 (NaCl : 6,8 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1,48 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,43 g, H<sub>2</sub>O qsp 1000 ml) pour obtenir une concentration de 1 µg/ml (quantités pour une plaque de test ELISA de 96 puits (Nunc Maxisorb, Danemark) : Mab 17 EA : 5,8 µl et tampon PBS : 10,5 ml). On place ensuite 100 µl de cette dilution dans chaque puits. On couvre la plaque et on la laisse une nuit à 4°C. Les plaques sont vidées et lavées 2 fois avec du tampon PBS-SAB 1 % (sérum albumine bovine Fraction V, Boehringer Mannheim). On ajoute dans chaque puits 300 µl de tampon PBS-SAB et on laisse 30 min à la température du laboratoire. Les plaques sont vidées et peuvent alors être ainsi gardées à 4°C dans du papier d'aluminium et utilisées dans le mois qui suit le marquage.

#### Recherche de la dilution de l'hémolysat de culture à utiliser.

Prélever trois fois 100 µl à partir de 2 puits témoins de la plaque de culture et les déposer dans 3 puits d'une plaque marqué par Mab 17 AE et 100 µl de dilution au 1/10 dans 3 autres puits. Préparer ces 6 puits pour chaque échantillon de sang cultivé. Incuber la plaque pendant 1h à 37°C. Laver les puits 3 fois avec du tampon PBS-SAB.

Préparer une dilution à 1/4 000 de Mab 19G7, fourni par le Dr Makler (2, 3) dans du tampon PBS-SAB (quantités pour une plaque : (Mab 19G7 : 2,75 µl et tampon PBS-SAB : 11 ml). Ajouter 100 µl de cette dilution dans chaque puits et incuber pendant 1h à 37°C. Laver les puits 3 fois avec le tampon PBS-SAB.

Préparer une dilution à 1/10 000 de streptavidine marquée à la peroxydase (Boehringer, Mannheim) dans le tampon PBS-SAB. (quantités pour une plaque : streptavidine peroxydase : 1,1 µl et tampon PBS-SAB : 11 ml). Ajouter 100 µl de la dilution dans chaque puits et incuber 30 min à la température du laboratoire. Laver la plaque 3 fois avec du tampon PBS-SAB.

Préparation un mélange à volume égal du substrat (3,3',5,5'- tetramethyl benzidine) (Kirkegaard and Perry) et d'une solution d'O<sub>2</sub>H<sub>2</sub> à 0,02 % à la température du laboratoire. (quantités pour une plaque : substrat : 5,5 ml et

O<sub>2</sub>H<sub>2</sub> : 5,5 ml). On dépose 100 µl du mélange dans chaque puits et on laisse la coloration bleue se développer pendant 5-10 min. On bloque ensuite la réaction par addition de 100 µl d'acide phosphorique 1 M dans chaque puits. La coloration jaune se développe. On mesure la DO de chaque puits au spectrophotomètre (Titertek Multiskan, MCC/340) à 450 nm.

On choisira la dilution correspondant à une DO entre 0,4 et 0,8 pour l'appliquer à la dilution de tous les puits de culture d'un même échantillon. La réaction se fera en duplicate selon le protocole décrit ci-dessus.

Les résultats sont exprimés en concentration inhibitrice 50 % (CI<sub>50</sub>), qui est la concentration d'antimalarique inhibant de 50 % la quantité de pLDH libérée par rapport au témoin sans antimalarique. Elle est déterminée par l'analyse de la courbe log-dose/réponse en DO.

---

### RESULTATS

---

Les résultats obtenus par Druilhe (4) avec le DELI-test sur la souche de *Plasmodium falciparum* résistante à la chloroquine Palo Alto (FUP/C), la souche sensible NF 54 ou le clone résistant 3D7 ont montré une relation linéaire entre la densité parasitaire et les valeurs de la DO et une plus forte concentration en pLDH pour les schizontes que pour les trophozoïtes jeunes. La très grande sensibilité du DELI-microtest permet de déterminer des CI<sub>50</sub> sur des prélèvements de faibles parasitemies allant jusqu'à 0,005 %. Il existe une franche corrélation entre les CI<sub>50</sub> obtenues avec le DELI-microtest et le microtest isotopique que l'on observe aussi bien pour les souches Palo Alto, NF 54 et le clone 3D7 que pour des isolats de patients avec des coefficients de corrélations supérieurs à 0,95 pour les antimalariques testés (chloroquine, quinine, mefloquine et artesunate) (4). Au cours des premières enquêtes de terrain effectuées en parallèle avec les 2 méthodes sur 110 tests au Sénégal en 1997 et sur 69 tests au Burkina Faso en 1998, le coefficient de corrélation était égal à 0,79 dans les 2 études (5).

---

### COMMENTAIRES

---

Ce test est plus facile et plus rapide à exécuter que le microtest isotopique et permet une utilisation pour des enquêtes de terrain par des techniciens de santé. Il présente l'avantage de ne pas nécessiter de composé radioactif et de pouvoir ainsi être lu sans l'utilisation d'un compteur à scintillation qui n'est pas disponible dans de nombreux pays en raison de son coût élevé. Un spectrophotomètre pour microplaques ELISA est d'un coût très inférieur et d'usage courant en laboratoire de routine. Il permet avec le DELI-microtest de calculer les valeurs de CI<sub>50</sub>, mais on peut aussi en l'absence de cet équipement, différencier les isolats sensibles des isolats résistants en observant la différence d'intensité de coloration entre les 2 puits voisins correspondant à la brusque diminution de la pLDH libérée. Sa très grande sensibilité permet d'effectuer des tests de chimiosensibilité *in vitro* chez des patients ou des porteurs asymptomatiques ayant de faibles parasitemies qui ne

pouvaient être étudiés auparavant avec le microtest isotopiques. Il permet ainsi d'atténuer les biais de recrutement au cours de ces études qui ne permettaient pas d'inclure des patients avec des parasitemies inférieures à 0,01 %. Les avantages présentés par ce test ont permis son utilisation en conditions de terrain dans de nombreux pays africains et asiatiques.

### CONCLUSION

Les avantages présentés par le DELI-test permettent d'envisager de plus larges enquêtes sur le terrain dans les pays où le paludisme est endémique pour surveiller l'évolution de la chimiorésistance *in vitro* de *Plasmodium falciparum*. On sait que ces données sont prédictives et permettent de prévoir la survenue de résistances aux traitements chez des sujets immuns avant l'apparition de résistances *in vivo*. Elles permettent de modifier à temps les recommandations et les comportements thérapeutiques ■

### REFERENCES

- 1 - BRASSEUR P., KOUAMOUCO J., BRANDICOURT O. et Coll. - Patterns of *in vitro* resistance to chloroquine, quinine and mefloquine of *Plasmodium falciparum* in Cameroon, 1985-1986. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988; **39** : 166-172.
- 2 - DRUILHE P., MORENO A., BLANC C. et Coll. - A colorimetric *in vitro* drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; **64** : 233-241.
- 3 - MAKLER M.T., HINRICHS D.J. - Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993; **48** : 205-210.
- 4 - MAKLER M.T., RIES J.M., WILLIAMS J.A. et Coll. - Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993; **48** : 739-741.
- 5 - MORENO A., BRASSEUR P., CUZIN-OUATTARA N. et Coll. - Evaluation under field conditions of the colourimetric DELI-microtest for the assessment of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2001; **95** : 100-103.

## Consultations de Prévention des Maladies du Voyageur Centres de Vaccination anti-amarile des Hôpitaux d'Instruction des Armées

	Consultation pour le public	Renseignements téléphoniques (réservés aux médecins et pharmaciens)
<b>BORDEAUX</b> Hôpital Robert-Picqué Route de Toulouse	<b>05 56 84 70 99</b> Du lundi au jeudi sur rendez-vous	<b>05 56 84 70 38</b>
<b>BREST</b> Hôpital Clermont-Tonnerre Rue du Colonel Fonferrier	<b>02 98 43 76 16</b> Lundi et mercredi après-midi sur rendez-vous	<b>02 98 43 76 16</b> <b>02 98 43 73 24</b>
<b>LYON</b> Hôpital Desgenettes 108 Boulevard Pinel	<b>04 72 36 61 24</b> Du lundi au vendredi sur rendez-vous vendredi matin sans rendez-vous	<b>04 72 36 61 24</b>
<b>MARSEILLE</b> Hôpital Laveran Boulevard Laveran	<b>04 91 61 71 13</b> Vendredi sur rendez-vous	<b>04 91 61 71 13</b>
<b>METZ</b> Hôpital Legouest 27 avenue de Plantières	<b>03 87 56 48 62</b> Lundi, mercredi et jeudi après-midi sur rendez-vous	<b>03 87 56 48 62</b>
<b>SAINT-MANDE</b> Hôpital Bégin 59 avenue de Paris	<b>01 43 98 50 21</b> Lundi, mercredi et vendredi après-midi avec et sans rendez-vous	<b>01 43 98 50 21</b>
<b>TOULON</b> Hôpital Sainte-Anne Boulevard Sainte-Anne	<b>04 94 09 93 60</b> Lundi, mercredi et vendredi après-midi avec et sans rendez-vous	<b>04 94 09 93 60</b>