

## EVALUATION DE LA SENSIBILITÉ *IN VITRO* DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* À LA CHLOROQUINE PAR LE DELI-MICROTEST DANS LA RÉGION DE DAKAR (SÉNÉGAL)

T. DIENG, I.B. BAH, P. M. NDIAYE, I. DIALLO, B.M. DIOP, P. BRASSEUR, S. MBOUP, D. WIRTH, O. NDIR

*Med Trop* 2005 ; 65 : 580-583

**RÉSUMÉ** • En 2000 et 2001, nous avons étudié la sensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine à Pikine, région de Dakar en utilisant le DELI-microtest (Double-site Enzyme-linked Lactate dehydrogenase Immunosorbent assay). Cette méthode repose sur la détermination du taux de lactate déshydrogénase (LDH) de *P. falciparum* qui est proportionnelle à la croissance parasitaire. Les isolats étaient cultivés en microplaques de 96 puits en milieu RPMI-1640 supplémenté en hypoxanthine et albumax en présence de concentrations croissantes de sulfate de chloroquine de 5,6 nM/L à 2 870,8 nM/L. Les microplaques étaient incubées à 37°C en cloche à bougie pendant 48 heures puis congelées à -20°C. Le DELI-microtest était pratiqué sur les surnageants de culture hémolysés. La quantité de LDH libérée qui est proportionnelle à l'intensité de la croissance parasitaire est évaluée en densité optique. Le niveau de sensibilité de l'isolat était évalué en IC<sub>50</sub> en considérant le seuil de sensibilité à la chloroquine à 100 nM/L. Les moyennes géométriques de IC<sub>50</sub> observées étaient de 41 nM/L (4,8 nM/L à 1 435 nM/L) et 135 nM/L (8,63 nM/L à 2 153 nM/L) en 2000 et 2001 respectivement. Cette étude montre que le niveau de résistance *in vitro* de *P. falciparum* à la chloroquine à Pikine a augmenté considérablement passant de 30 % en 2000 à 59,6 % en 2001. Ces résultats indiquent l'importance d'une surveillance *in vitro* de la résistance aux antipaludiques pour anticiper la survenue d'échecs thérapeutiques et modifier à temps les recommandations de santé publique.

**MOTS-CLÉS** • Sensibilité *in vitro* - *Plasmodium falciparum* - DELI-microtest - Dakar - Sénégal.

**IN VITRO EVALUATION OF THE SENSITIVITY OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* TO CHLOROQUINE USING THE DELI-MICROTEST IN REGION OF DAKAR, SENEGAL**

**ABSTRACT** • This study was carried out between 2000 and 2001 in the peri-urban Pikine area located 15 km from Dakar, Senegal. The purpose was to evaluate the *in vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* isolates to chloroquine, which was the recommended first-line drug for uncomplicated malaria treatment in Senegal. Testing was carried out using the double-site enzyme-linked lactate dehydrogenase immunosorbent (DELI) microtest. The DELI-microtest is an ELISA method using 2 monoclonal antibodies against 2 antigenic sites of the specific *P. falciparum* lactate dehydrogenase (LDH) enzyme. The level of LDH is proportional to the extent of parasite growth. *P. falciparum* isolates were cultured in 96-well plates in RPMI 1640 medium supplemented with hypoxanthine and albumax, in the presence of chloroquine sulphate concentrations ranging from 5.6 nM/L to 2 870.8 nM/L. Plates were incubated in a candle-jar for 48 hours at 37°C and frozen at -20°C. The DELI-microtest was performed using the supernatant of hemolysed cultures. The amount of pLDH released was evaluated based on optical density. The chloroquine sensitivity of the isolate was estimated based on IC<sub>50</sub> with a cut-off of <100 nM/L. Geometric mean IC<sub>50</sub> values were 41 nM/L (range: 4.8 nM/L to 1 435 nM/L) and 135 nM/L (range: 8.63 nM/L to 2 153 nM/L) in 2000 and 2001 respectively. This study demonstrated a dramatic increase in the *in vitro* resistance of *P. falciparum* to chloroquine from 30 % in 2000 to 59.6 % in 2001. These findings suggest that regular surveillance of *in vitro* drug resistance is important to predict *in vivo* drug resistance and allow timely changes in public health recommendations.

**KEY WORDS** • *In vitro* sensitivity - *Plasmodium falciparum* - DELI-microtest - Dakar - Senegal.

• Travail du Service de Parasitologie de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal (T. D. Docteur ès sciences pharmaceutiques ; I.B.B. Docteur ès sciences pharmaceutiques ; P. M.N.D. Docteur en Pharmacie, I. DIALLO Docteur en Pharmacie ; O. ND. Professeur) ; du Service des Maladies Infectieuses CHU de Fann, (B.M.D. Professeur), Dakar, Sénégal ; du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Rouen (P. B. Professeur), France, du Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital le Dantec, (S. MB, Professeur), Dakar, Sénégal, du Département d'Immunologies Infectieuses, Harvard School of Public Health, (D.W. Professeur), Boston, USA..

• Correspondance : T. DIENG, Service de Parasitologie, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie, Université Cheikh Anta Diop, Avenue Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal • Fax : ( 221 ) 825 36 98.

• Courriel : thdieng@refer.sn

• Article reçu le 23/10/2003, définitivement accepté le 16/12/2005.

À Senegal, les premiers cas de chloroquino-résistance ont été observés en 1988 (1). Depuis la mise en œuvre du Programme national de lutte contre le paludisme, la surveillance de la chimio-sensibilité de *P. falciparum* est un des volets importants de la stratégie de prévention et de lutte antipaludique. Elle constitue également un des axes de recherche opérationnelle à retombée immédiate en santé publique. Cette surveillance est effectuée au niveau de sites sentinelles essentiellement par des tests *in vivo* réalisés selon les protocoles standards de l'OMS qui ont permis de déterminer et de suivre dans le temps l'efficacité des antipaludiques usuels tels la chloroquine, l'amodiaquine et la quinine (2, 3).

Les premiers tests de chimiosensibilité *in vitro* aux molécules antipaludiques ont été réalisés selon les protocoles de l'OMS avec la méthode microscopique et par la micro-

méthode isotopique. Ils ont fourni des données de base sur les niveaux de sensibilité des isolats des régions de Dakar, Thiès et Kaolack aux antipaludiques d'usage courant ou nouvellement commercialisés (4, 5). La micro-méthode isotopique a ensuite été utilisée dans d'autres régions du Sénégal (6, 7).

Une nouvelle technique très sensible d'évaluation de la chimiosensibilité *in vitro* de *P. falciparum* à lecture automatisable, le DELI-microtest, a été décrite (8), permettant d'évaluer la sensibilité pour une parasitémie de 0,005 %. Elle a en outre l'avantage de ne pas utiliser de radioéléments.

L'étude que nous présentons a pour but de déterminer la sensibilité d'isolats de *P. falciparum* recueillis dans le département de Pikine, dans la région de Dakar au moyen du DELI microtest.

## CADRE DE L'ÉTUDE

L'étude s'est déroulée en zone suburbaine à Pikine en août et septembre 2000, et en septembre et octobre 2001. Le département de Pikine est situé à 15 km de Dakar. D'une superficie de 111 km<sup>2</sup>, sa population totale était estimée à 1,2 millions d'habitants en 2001 ce qui représentait 51,8 % de la population de la région de Dakar. Pikine est localisée dans la région naturelle des Niayes qui sont des dépressions inter-dunaires inondables avec une nappe phréatique peu profonde. Le climat se caractérise par l'alternance d'une saison pluvieuse concentrée durant les mois de juillet, août et septembre, marquée par des précipitations de l'ordre de 350 mm, et d'une saison sèche qui correspond aux mois suivants.

Des puits sans margelle appelés « céanes » construits par les maraîchers servent de source d'approvisionnement en eau pour les cultures et constituent des collections d'eau temporaires, gîtes larvaires potentiels. Le paludisme y représente la première cause de consultation médicale en particulier durant la période de transmission du paludisme qui s'étend de juillet à décembre.

## PATIENTS ET MÉTHODES

### Patients

Les patients étaient recrutés au dispensaire municipal de Pikine parmi les malades venus en consultation. Exceptés les sujets présentant des accès palustres graves et les femmes enceintes, était inclus dans l'étude tout sujet fébrile suspect de paludisme, n'ayant pris aucun antipaludique les 7 jours précédents et ayant donné son consentement éclairé. En 2000, tous les sujets répondant aux critères d'inclusion ont été enrôlés dans l'étude. Durant l'année 2001, seuls les adultes de plus de 18 ans ont été recrutés, cette étude ayant été effectuée parallèlement à une autre étude sur l'infection à VIH chez les adultes.

Pour effectuer le DELI-microtest, on prélevait 5 ml de sang sur EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) chez les patients ayant une parasitémie d'au moins

1 000 formes asexuées de *P. falciparum* par  $\mu\text{L}$ . Les prélèvements étaient conservés à 4°C jusqu'à la mise en culture.

### Culture des isolats

Les cultures étaient réalisées dans un délai maximal de 8 heures après le prélèvement sanguin selon une méthode précédemment décrite (9). Brièvement, le sang parasité était centrifugé à 2000 g pendant 10 min., lavé 2 fois avec du milieu RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) et la parasitémie était ajustée si nécessaire entre 0,5 % et 1 % avec des hématies d'un donneur sain. Un troisième lavage était effectué avec du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 0,5 % d'albumax (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) et 1 mg par litre d'hypoxanthine (Sigma, Saint Louis, MO, USA) et ajusté à 2 % d'hématocrite. Le sang était mis en culture en microplaques de 96 puits (Nunc, Denmark) avec du RPMI 1640 supplémenté en présence de concentrations croissantes de sulfate de chloroquine (Rhône Poulenc Rorer, Vitry sur Seine, France) de 5,6 nM/L à 1435 nM/L en 2000 et de 11,19 nM/L à 2870 nM/L en 2001, afin de détecter plus facilement les fortes résistances. Deux puits sans chloroquine servaient de contrôle de culture et un dernier puits contenait le sang du donneur sain. Chaque isolat était testé en duplicate. La culture était effectuée pendant 48h à 37°C dans une cloche à bougie (5 % de CO<sub>2</sub>) et ensuite congelée à -20°C jusqu'à la réalisation du DELI-microtest.

### DELI-microtest

Le DELI-microtest est une méthode d'immunodétection en ELISA double sandwich décrite par Druilhe (8) qui utilise 2 anticorps monoclonaux 17EA et 19G7 (Flow Laboratories Portland, OR, USA) dirigés contre 2 épitopes différents de la lactate deshydrogénase spécifiques de *P. falciparum* (pLDH).

### Réalisation du DELI-microtest

On a utilisé des plaques de microtitration ELISA à fond plat de 96 puits (Nunc, Maxisorb, Denmark) sur lesquelles a été fixé l'anticorps 17EA dilué à 1  $\mu\text{g/ml}$  dans du tampon PBS (phosphate-buffered saline) pH 7,4 pendant 12h à 4°C.

Les plaques de culture étaient congelées et décongelées 3 fois pour lyser les hématies. On déposait 100  $\mu\text{L}$  des surnageants de culture dans les puits de la plaque. Après incubation à 37°C pendant 1 heure, les plaques étaient lavées 3 fois avec du PBS-BSA à 1% (sérum albumine bovine fraction V, Sigma St Louis, MO, USA). On déposait ensuite l'anticorps 19G7 biotinylé dilué (1/4000) dans du PBS-BSA. Après une heure d'incubation à 37°C, les plaques étaient lavées 3 fois avec du PBS-BSA. On ajoutait une solution de streptavidine marquée à la peroxydase (Boehringer Mannheim, Germany) et après une incubation de 30 min à température ambiante, les plaques étaient lavées 3 fois avec du PBS-BSA 1%. La révélation de la peroxydase était réalisée par un mélange extemporané à parties égales de tétraméthylbenzidine et d'eau oxygénée à 0,02 % (Kirkegaard & Perry Laboratories,

Maryland, USA). Le développement de la réaction enzymatique était arrêté après 5 minutes par addition de 100  $\mu$ L par puits d'acide phosphorique 1M. L'intensité de la coloration jaune obtenue était évaluée en densité optique (DO) à 450 nm avec un spectrophotomètre (Metertech Sigma 960, Bioblock Scientific). Le test est interprétable quand la DO du puits témoin dépourvu d'antipaludique est comprise entre 0,4 et 1,5, au delà de cette valeur, l'hémolysat doit être dilué.

Les résultats du test sont exprimés en concentration inhibitrice à 50 % ( $CI_{50}$ ) qui est la concentration de chloroquine qui inhibe de moitié la croissance du parasite. Elle correspond ici à la DO de la concentration de chloroquine qui est la moitié de la DO du témoin. En tenant compte de l'étroite corrélation qui existe entre le DELI-microtest et le microtest isotopique (8, 10, 11), tout isolat ayant une  $CI_{50}$  supérieure à 100 nM/L est considéré comme résistant à la chloroquine. Les  $CI_{50}$  étaient calculées à partir de la courbe dose/densité optique.

## RÉSULTATS

En 2000, 42/47 isolats (89,4 %) et 47/60 (78,3 %) en 2001 ont été cultivés avec succès et sur l'ensemble des 89 tests, deux seulement n'ont pu être interprétés. Les  $CI_{50}$  obtenues la première année variaient de 4,8 nM/L à 1 435 nM/L avec une moyenne de 191,7 nM/L (moyenne géométrique : 41 nM/L). L'année suivante les  $CI_{50}$  étaient comprises entre 8,6 nM/L et 2 153,1 nM/L avec une moyenne de 277,9 nM/L (moyenne géométrique : 135 nM/L). Les  $CI_{50}$  moyennes différaient de façon significative en 2000 et en 2001. La figure 1 montre la répartition des  $CI_{50}$  durant ces deux années d'étude.

Douze sur 40 isolats testés en 2000 (30%) et 28 sur 47 testés en 2001 (59,6%) qui avaient des  $CI_{50}$  supérieures à 100 nM/L étaient considérés comme résistants à la chloroquine. On observe une augmentation significative du nombre d'isolats résistants à la chloroquine en 2001 par rap-

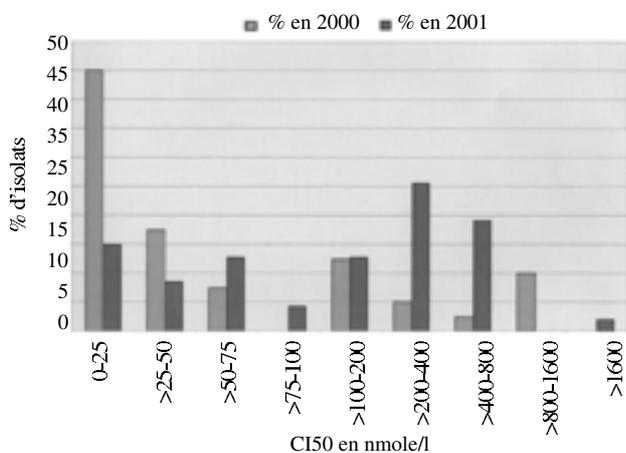


Figure 1 - Test de sensibilité *in vitro* à la chloroquine : répartition des  $CI_{50}$  des isolats de *P. falciparum*.

port à 2000 ( $p < 0,01$ ). En 2000, les  $CI_{50}$  des isolats sensibles étaient comprises entre 4,8 nM/L et 62,8 nM/L (moyenne géométrique : 16,2 nM/L ; intervalle de confiance (IC 95 %) 14,8-17,5) et celles des isolats résistants entre 112 nM/L et 1 435 nM/L (moyenne géométrique : 366,5 nM/L ; Intervalle de confiance (IC 95 %) 364,7- 368,3). En 2001, les  $CI_{50}$  des isolats sensibles variaient de 8,6 nM/L à 91,9 nM/L (moyenne géométrique : 33,7 nM/L ; IC 95 % : 32,3-35,2) et celles des isolats résistants de 102,3 nM/L à 2 153 nM/L (moyenne géométrique : 347,1 nM/L ; IC 95 % : 346,4-348,9). En 2000, 45 % des  $CI_{50}$  étaient inférieures à 25 nM/L alors qu'en 2001, il n'y en avait plus que 15 %.

## DISCUSSION

Entre 2000 et 2001, le pourcentage d'isolats résistants *in vitro* de *P. falciparum* a doublé passant de 30 % à 59,6 %. Des études de chimio-sensibilité *in vitro* ont été effectuées antérieurement au Sénégal. Les premières réalisées par Bah (5) dans les départements de Dakar et de Pikine par la technique microscopique de l'OMS indiquaient 6,7 % de résistance en 1987, période d'émergence de la chloroquino-résistance, 9,8 % en 1988-1989, 72,7 % en 1990-1991 et 31,7 % en 1994-1995. Des études utilisant le microtest isotopique en 1995 (6) montraient 29 % de résistance à la chloroquine dans les villages de Dielmo et Ndiop et au niveau du poste de santé de Toubakouta, tous situés dans la région de Fatick. Entre octobre et décembre 1996, 49,4 % des isolats de *P. falciparum* testés chez des patients de Dielmo, Ndiop et Pikine étaient résistants à la chloroquine, sans cependant connaître la part des isolats de Pikine. Entre septembre et décembre 1999 (7) le taux de résistance atteignait 55 % à Dielmo et Ndiop avec une  $CI_{50}$  en moyenne géométrique de 102 nM/L montrant ainsi une augmentation progressive en 3 ans de la résistance à la chloroquine dans la région de Fatick. Cette progression de la résistance s'observe aussi très rapidement dans la région de Dakar comme le montre notre étude.

Ce travail souligne aussi l'intérêt du DELI-microtest qui présente comme l'a montré Druilhe une excellente corrélation de l'ordre de 95 % avec le microtest isotopique pour la chloroquine (8). Il présente sur ce dernier l'avantage de pouvoir être utilisé dans des enquêtes de terrain car il ne nécessite pas de matériel sophistiqué pour sa lecture et de ne pas utiliser de radioéléments. Ce type d'enquête de terrain a déjà été réalisé avec succès au Burkina Faso (12), au Sénégal (11) et au Cameroun (13). Sa très grande sensibilité permet des études sur des patients asymptomatiques de faibles parasitémiés avec un taux de succès élevé comme celles réalisées dans deux zones rurales du Burkina Faso (12) ou en région forestière au sud Cameroun (13).

L'augmentation rapide de la résistance à la chloroquine en zone suburbaine comme Pikine rend de plus en plus nécessaire une surveillance régulière de la chimiosensibilité *in vitro* non seulement à la chloroquine mais aux autres antipaludiques de remplacement afin de déterminer quel est le meilleur candidat à recommander.

## CONCLUSION

Ces résultats montrent que le DELI-microtest constitue une alternative au microtest isotopique pour l'étude de la sensibilité *in vitro* des isolats de *P. falciparum* aux antipaludiques pour les études de terrain en pays endémique. Il permet de tester des isolats de faible parasitémie en raison de sa très grande sensibilité et ne nécessite pas d'équipements coûteux. Cette nouvelle technique est tout à fait adaptée pour la surveillance *in vitro* de la sensibilité de *P. falciparum* aux antipaludiques dans les sites sentinelles. La nature prédictive des informations fournies par les tests *in vitro* permettent d'anticiper la survenue d'échecs thérapeutiques et de modifier à temps les recommandations de santé publique

Remerciements • Au Dr. MAKLER qui a fourni les anticorps monoclonaux 17EA et 19G7, à Monsieur A.A. NDIAYE pour sa collaboration technique, à tout le personnel du dispensaire municipal de Pikine pour leur assistance et leur disponibilité et à tous les patients qui ont accepté de participer à cette étude.

## RÉFÉRENCES

- 1 - TRAPE JF, LEGROS F, NDIAYE P, KONATE L, BAH IB, DIALLO S, VERDIER F, HATIN I & LE BRAS J- Chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989 ; **83** : 761.
- 2 - SOKHNA CS, MOLEZ JF, NDIAYE P *et Coll* - Tests *in vivo* de chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum* à la Chloroquine au Sénégal : évolution de la résistance et estimation de l'efficacité thérapeutique. *Bull Soc Pathol Exot* 1997 ; **90** : 83-89.
- 3 - GAYE O, SOUMARE M, SAMBOU B *et Coll* - Hétérogénéité du paludisme chloroquine-résistant au Sénégal. *Bull Soc Pathol Exot* 1999 ; **92** : 149-152.
- 4 - BRANDICOURT O, DRUILHE P, DIOUF F *et Coll* - Decreased sensitivity to chloroquine and quinine of some *Plasmodium falciparum* strains from Senegal in September 1984. *Am J Trop Med Hyg* 1986 ; **35** : 717-721.
- 5 - BAH IB - Evolution de la sensibilité de *Plasmodium falciparum* Welch aux antipaludiques de 1987 à 1995, à Dakar (Sénégal). Résultats d'étude *in vivo* et *in vitro*. Thèse Doctorat ès Sciences Pharmaceutiques, Dakar, 1999 ; n° 9 : 150 p.
- 6 - PRADINES B, ROGIER C, FUSAI T *et Coll* - Sensibilité *in vitro* de 85 isolats de *Plasmodium falciparum* dans la région de Fatick, Sénégal. *Med Trop* 1996 ; **56** : 141-145
- 7 - PRADINES B, TALL A, PARZY D *et Coll* - *In vitro* activity of pyronaridine and amodiaquine against African isolates (Senegal) of *Plasmodium falciparum* in comparison with standard antimalarial agents. *J Antimicrob Chemother* 1998 ; **42** : 333-339
- 8 - 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
- 9 - BRASSEUR P, DRUILHE P, KOUAMOUO J *et Coll* - High level of sensitivity to chloroquine of 72 *Plasmodium falciparum* isolates from southern Cameroon in January 1985. *Am J Trop Med Hyg* 1986 ; **35** : 711-716.
- 10 - MORENO A, BRASSEUR P, CUZIN-OUATTARA N *et Coll* - Evaluation under field conditions of the colorimetric DELI-microtest for the assessment of *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001 ; **95** : 100-103.
- 11 - BRASSEUR P, AGNAMEY P, MORENO A, DRUILHE P - Evaluation de la sensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum* aux antimalariques par un test colorimétrique (DELI-microtest). *Med Trop* 2001 ; **61** : 545-547.
- 12 - MORENO A, CUZIN-OUATTARA N, NEBIE I *et Coll* - Use of the DELI-microtest to determine the drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Burkina Faso. *Ann Trop Med Parasitol* 2001 ; **95** : 309-312.
- 13 - AGNAMEY P, MOYOU SR, BRASSEUR P, GALEGA PF - Un foyer de paludisme multi-résistant en zone forestière au Cameroun revisité 14 ans après. *Med Trop* 2002 ; **62** : 141-144.