

## PROTOCOL



# UTILISATION DU SERUM HUMAIN NON DECOMPLEMENTE POUR LA CROISSANCE ET L'ETUDE DE LA CHIMIOSENSIBILITE DE *Plasmodium*

## USE OF THE NON-DECOMPLEMENT HUMAN SERUM FOR GROWTH AND STUDY OF PLASMIC CHEMOSENSITIVITY

| Gueyraud Rolland Kipré <sup>1\*</sup> | Philippe Grellier <sup>2</sup> | and | Allico Joseph Djaman <sup>1,3</sup> |

<sup>1</sup>. Université Félix Houphouët-Boigny | UFR Biosciences | Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique | Abidjan | Côte d'Ivoire |

<sup>2</sup>. Muséum National de Paris | EA 3335 Département « Régulation, Développement, Diversité Moléculaire » | USM 0504 « Biologie fonctionnelle des protozoaires » | Paris | France |

<sup>3</sup>. Institut Pasteur de Côte d'Ivoire | Laboratoire de Biochimie | Abidjan | Côte d'Ivoire |

| Received 06 May 2019 |

| Accepted 19 June 2019 |

| Published 01 July 2019 |

| ID Article | Kipré-Ref.2-ajira040619 |

### RESUME

**Introduction :** La culture *in vitro* de *Plasmodium* reste indispensable pour l'identification phénotype et surveillance de l'efficacité des antipaludéens. La culture de *Plasmodium falciparum* nécessite l'utilisation du milieu Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640), dont l'efficacité dépend de l'addition de sérum humain. **Objectif :** Ce travail se propose à faire croître *Plasmodium falciparum* sur du sérum non décomplémenté provenant de donneur non paludéen vivant dans une zone d'endémie palustre. **Méthode :** C'est la variante isotopique du microtest OMS qui a été utilisée dans ce travail. Elle mesure la capacité de doses croissantes d'un antipaludique à inhiber la croissance de *Plasmodium* dans le milieu de culture (RPMI 1640) contenant du sérum humain. **Résultat :** Il ressort de cette étude que le milieu de culture avec du sérum non décomplémenté permet la croissance de *Plasmodium* et peut être utilisé pour des tests de chimiosensibilité. **Conclusion :** Le paludisme étant une maladie infectieuse qui touche particulièrement l'Afrique subsaharienne, l'utilisation de ce sérum additionné au RPMI est de permettre aux laboratoires du sud avec les moyens dont ils disposent de réaliser une surveillance des souches de *P. falciparum* circulant dans une zone donnée. **Mots-clés:** Antipaludique, Chimiosensibilité, *Plasmodium falciparum*,

### ABSTRACT

**Introduction:** The *in vitro* culture of *Plasmodium* remains essential for phenotypic identification and monitoring of antimalarial efficacy. Cultivation of *Plasmodium falciparum* requires the use of RPMI 1640 medium, the effectiveness of which depends on the addition of human serum. **Objective:** This work proposes to grow *Plasmodium falciparum* on serum containing *Plasmodium* antibodies. **Method:** This is the isotopic variant of the WHO microtest that was used in this work. It measures the ability of increasing doses of an antimalarial to inhibit the growth of *Plasmodium* in the RPMI culture medium containing human serum with *Plasmodium* antibodies. **Result:** This study shows that culture medium with non-decomplemented serum allows the growth of *Plasmodium* and can be used for chemosensitivity tests. **Conclusion:** As malaria is an infectious disease that particularly affects sub-Saharan Africa, the use of this serum added to the RPMI is to allow laboratories in the south with the means at their disposal to monitor *P. falciparum* strains circulating in sub-Saharan Africa.

**Keywords:** Antimalarial, Chemosensitivity, *Plasmodium falciparum*,

## 1. INTRODUCTION

Dans la lutte contre le paludisme, l'étude *in vitro* permet d'évaluer la sensibilité intrinsèque des parasites aux antipaludiques et de caractériser au plan épidémiologique la nature des isolats de *Plasmodium* circulant dans une zone donnée [1]. Cette étude donne la possibilité de mesurer l'efficacité d'un antipaludique sans que n'interviennent les facteurs d'interférences dans la multiplication des parasites telle que l'immunité de l'hôte [2]. La culture de *Plasmodium falciparum* nécessite un milieu de culture, le Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640), dont l'efficacité est liée à l'addition de sérum humain dépourvu d'anticorps antiplasmodiaux, soit décomplémenté lorsque le sérum provient de sujet, vivant en zone d'endémie palustre [3,4]. En effet, la présence d'anticorps antiplasmodiaux, tout comme les leucocytes dans le sang ajoute ses effets schizonticides à ceux du médicament étudié *in vitro*.

La croissance des plasmodies est alors impossible par suite d'inhibition des jeunes trophozoïtes [5]. Si le sérum dépourvu d'anticorps est difficilement accessible à cause de son coût élevé, le deuxième type de sérum décomplémenté nécessite un travail supplémentaire de décomplémentation et de stérilisation sur filtre millipore. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'efficacité du sérum humain non décomplémenté dans la culture *in vitro* de souches de *P. falciparum*.

## 2. MATERIELS AND METHODES

Trois souches de *Plasmodium falciparum* PFB et FCB1 (souches résistantes à la chloroquine et sensible à la Pyriméthamine) et K1 (souche résistante à la chloroquine et à la Pyriméthamine) ainsi que des globules rouges sains du groupe 0<sup>+</sup> ont servi de matériels biologiques. Ces hématies saines ont servi pour la dilution du sang parasité lorsque la densité parasitaire était supérieure à 8 000 parasites asexués par microlitre de sang. Le RPMI 1640 contenant de l'HEPES 25 mM et du bicarbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>) 25 mM a été utilisé comme milieu de culture pour les souches de *P. falciparum*. L'HEPES et le NaHCO<sub>3</sub> jouent un rôle de double tampon et maintiennent le milieu de culture à un pH compris entre 7,2 et 7,4 [6]. A ce milieu de culture, il est ajouté 10% de sérum humain non décomplémenté (contenant des anticorps antiplasmodiaux). Les souches PFB, FCB1 et K1 conservées dans l'azote liquide sont décongelées et maintenues en culture (en absence d'antipaludique) pendant quelques jours afin d'obtenir une bonne densité parasitaire. Avant la culture en présence d'antipaludique, on réalise une synchronisation de la culture par un traitement du sang parasité par du sorbitol à 5% afin d'obtenir pour les tests des parasites au stade de jeunes parasites («ring») uniquement [7].

Le sang est ensuite dilué si nécessaire par des globules rouges non parasités préalablement lavés. Dans la première partie du travail, les souches sont maintenues en culture dans le RPS (RPMI 1640 appauvri en acide folique et contenant 10% de sérum humain non décomplémenté) dans une étuve réglée à 37°C en présence de gaz carbonique et 95% d'humidité pendant 42 heures dans une jarre à bougie [8, 9].

La vérification de la maturation est faite après 42 heures d'incubation par le comptage du nombre de schizontes pour 200 parasites asexués, après lecture des gouttes épaisses réalisées à partir des cultures en absence d'antipaludique.

La deuxième partie de ce travail a été consacrée au test de chimiosensibilité à la pyriméthamine en utilisant le humain non décomplémenté pour vérifier la sensibilité des souches à la pyriméthamine. C'est la variante isotopique du microtest OMS qui a été utilisée dans ce travail [2]. Elle mesure la capacité de doses croissantes d'un antipaludique à inhiber la croissance de *Plasmodium* dans un milieu de culture (RPMI 1640 contenant du sérum humain). Après 42 heures d'incubation, l'ADN est recueilli après lavage sur un papier de fibre de verre à l'aide d'un collecteur cellulaire, puis, la quantité d'hypoxanthine incorporée par les parasites est mesurée par un compteur à scintillation liquide (WALLAC, 1450 Microbeta TRILUX) en coup par minute. Une droite de régression tracée par un programme à partir de ces valeurs permet de déterminer la CI<sub>50</sub> de chaque produit.

## 3. RESULTS

Le sérum humain non décomplémenté ajouté au RPMI 1640 de lavage a permis d'obtenir des maturations de trophozoïtes de *P. falciparum* en schizontes supérieur à 20% (taux de maturation référentiel pour valider la culture *in vitro*) et ce, quelque soit la souche plasmodiale. Cette maturation est de 77% pour la souche FCB1, 70% pour la souche PFB et de 80% pour la souche K1.

Les résultats obtenus dans les tests de chimiosensibilité *in vitro* des souches dans un milieu contenant du sérum non décomplémenté avoisinent ceux obtenus avec le sérum décomplémenté de la littérature.

**Tableau 1 :** Sensibilité des souches de *P. falciparum* aux molécules usuelles sur milieu contenant du sérum non décomplémenté.

| CI <sub>50</sub> des molécules usuelles en nM (*n = 3) |               |                  |
|--------------------------------------------------------|---------------|------------------|
| Souches de <i>Plasmodium</i>                           | Chloroquine   | Pyriméthamine    |
| FCB1                                                   | 105,41 ± 3,73 | 230,58 ± 29,69   |
| K1                                                     | 115,33 ± 0,02 | 4804,75 ± 216,37 |
| PFB                                                    | 112,74 ± 3,69 | 48,29 ± 0,04     |

## 4. DISCUSSION

L'intérêt de cette étude était d'obtenir au moins 20% de schizontes dans les cultures sans antipaludique et sans hypoxanthine qui nous ont servi de témoins afin de lancer nos tests isotopiques et de déterminer la CI<sub>50</sub> des souches vis-à-vis de la Pyriméthamine sur milieu contenant du sérum non décomplémenté. En effet, si certains auteurs ont démontré le rôle déterminant des anticorps antiplasmodiaux dans l'immunité contre les formes sanguines asexuées de *P. falciparum* [5], de nombreux travaux ont tenté de déterminer le mode d'action de ces anticorps [10]. Il a été mis en évidence à la surface des globules rouges parasités par *P. falciparum*, un antigène spécifique appelé antigène HRP2 (Histidine Rich Protein 2) qui est une glycoprotéine avec le galactose comme sucre. La reconnaissance de cette protéine par les anticorps antiplasmodiaux permet de former un complexe qui exerce une action destructrice sur le *Plasmodium* à l'intérieur du globule rouge. La série de lavage (trois fois) entreprise suivie de centrifugations puis de l'élimination de la couche leuco-plaquettaire avant la mise en culture des parasites, a pour but d'éliminer les protéines HRP2 présentes à la surface des hématies parasitées et nécessaires à la fixation des anticorps et à la formation du complexe anticorpsanti-

HRP2. A la fin de ce lavage, nous obtenons des globules rouges dépourvus ou faiblement pourvus de protéines HRP2 ; dès lors le *Plasmodium* peut subir une maturation par division mitotique de son noyau et atteindre le stade schizontes (stade à plusieurs noyaux). Dans ces conditions, il est possible avec le sérum non décomplémenté, de réaliser un test de chimiosensibilité qui permet de mesurer la capacité de concentrations croissantes d'un antipaludique à inhiber la formation des schizontes. Le paludisme étant une maladie infectieuse qui touche particulièrement l'Afrique subsaharienne [4], l'utilisation du sérum non décomplémenté additionné au RPMI 1640 est de permettre aux laboratoires du sud avec les moyens dont ils disposent de réaliser une surveillance des souches de *P. falciparum* circulant dans une zone donnée. Il a été possible de réaliser les cultures *in vitro* de *P. falciparum* en utilisant un sérum non décomplémenté.

Il est également possible de mesurer la sensibilité de ces souches par rapport aux antipaludiques usuels et permettre le criblage systématique de nouvelles substances antipaludiques comme celles issues de la pharmacopée traditionnelle africaine [12, 13] ce qui est un avantage pour les laboratoires du sud

## 5. CONCLUSION

Au terme de ce travail nous avons constaté que le sérum non décomplémenté a permis une maturation de 77% pour la souche FCB1, de 70% pour la souche PFB et de 80% pour la souche K1. Avec ce sérum nous avons obtenu des CI<sub>50</sub> avec la Chloroquine et la Pyriméthamine qui sont pratiquement identiques avec ceux des auteurs ayant utilisés le sérum décomplémenté.

## 6. REFERENCES

1. Guiguemde TR, Gbary AR, Coulibaly SO, Ouedraogo JB. Comment réaliser et interpréter les résultats d'une épreuve de chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* chez les sujets malades en zone tropicale. *Sante* 1996 ; 6 : 187-91.
2. Rieckmann KH, López-Antuñano FJ. Chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* in Brazil detected by a simple *in vitro* method. *Bull World Health Organ* 1971 ; 45 : 157-67.
3. Schlichtherle M, Wahlgren M, Perlmann H, Scherl A. Methods in Malaria Research. Third Ed. Available from Malaria Research and Reference Resource Center (MR4), Manassas, Virginia USA 2000; 77 p.
4. WHO. Paludisme. Aide-mémoire N° 94 révisé Octobre 1998 ; 6 p.
5. Danis M, Mouchet J. La réponse immune de l'hôte et l'adaptation du parasite et chimiorésistance des Plasmodiums in Paludisme. Marketing : Ellipses ed., 1991, 240p.
6. WHO. Mode d'emploi du nécessaire d'épreuve (Microtest) pour l'évaluation de la réponse de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine et à la méfloquine *in vitro*. OMS, Genève, MAP/84.2. 1984 ; 9p.
7. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 1979 ; 65 : 418-20.
8. Le Bras J, Deloron P. *in vitro* study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: evaluation of a new semi-micro test. *Am J Trop Med Hyg* 1983 ; 32 : 447-51.
9. Le Bras J, Deloron P, Ricour A, Andrieu B, Savel J, Coulaud JP. *Plasmodium falciparum*: drug sensitivity *in vitro* of isolates before and after adaptation to continuous culture. *Exp Parasitol* 1983 ; 56 : 9-14.
10. Bruce-Chwatt LJ, Black RH, Canfield GJ, Clyde DF, Peters W, Wernsdorfer WH. Rôle de l'immunité dans la chimiothérapie du paludisme in chimiothérapie du paludisme. 2e édition/OMS ed., Genève, 1984, 274 p.
11. Djaman JA, Coulibaly PA, Guédé-Guina F. Culture *in vitro* d'isolats de *Plasmodium falciparum* sur milieu contenant du sérum humain non décomplémenté. *Rev Iv Sci Tech* 2002 ; 3 : 119-26.
12. O'Neil MJ, Bray DH, Boardman P, Phillipson JD, Warhurst DC, Peters W *et al.* Plants as sources of antimalarial drugs: *in vitro* antimalarial activities of some quassinoids. *Antimicrob Agents Chemother* 1986 ; 30 : 101-4.
13. Phillipson JD, O'Neil MJ. Novel antimalarial drug from plants? *Parasitology Today* 1986 ; 2 : 355-8.



Cite this article: Gueyraud Rolland Kipré, Philippe Grellier, and Allico Joseph Djaman. UTILISATION DU SERUM HUMAIN NON DECOMPLEMENTE POUR LA CROISSANCE ET L'ETUDE DE LA CHIMIOSENSIBILITE DE *Plasmodium* *Am. J. innov. res. appl. sci.* 2019; 9(1): 1-3.

This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>