

Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie

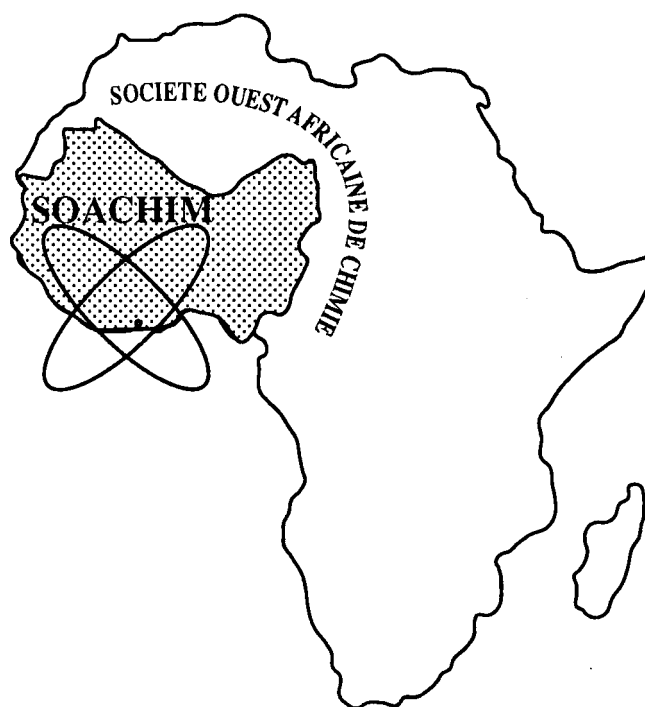
J. Soc. Ouest-Afr. Chim.

Code Chemical Abstracts : JSOCF2

Cote INIST (CNRS France) : <27680>

ISSN 0796-6687

17^{ème} Année, Juin 2012, N° 033



Site Web: <http://www.soachim.org>

Absence de corrélation entre la résistance *in vitro* de *P. falciparum* à la chloroquine et l'expression de l'allèle *pfcr*t 76T au Mali

Mamadou Wélé^{1*}, Abdoulaye Djimdé², Aminatou Koné², Stephanie Valderramos³,
Marcus Lee³, Seydou Z Maiga¹ et David A. Fidock³

1. Laboratoire des Sciences Biologiques Appliquées/ Faculté des Sciences et Techniques/ Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako, Mali
2. Malaria Research and Training Center, Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie/ Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako, Mali
3. Department of Microbiology and Immunology, College of Physicians and Surgeons Columbia University, New York, USA

(Reçu le 17/ 12/2011 – Accepté après corrections le 25 /03/2012)

Résumé : La mutation ponctuelle *pfcr*t K76T a été associée à la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine dans les études *in vitro* et *in vivo*. Cependant le mécanisme exact de cette résistance encore mal connu. Ainsi, dans le but d'élucider ce phénomène de résistance, cette étude visait à évaluer la corrélation entre le niveau de résistance *in vitro* d'une part, le taux de protéine PfCRT et d'autre part le niveau d'expression de son gène chez des parasites chloroquino-résistants du Mali. Les parasites de terrain ont été adaptés à la culture et les protéines et ARNm parasitaires ont été extraits pour déterminer le taux de PfCRT et le niveau d'expression du gène *pfcr*t. Nous avons après screening obtenus cinq souches résistantes à la chloroquine identifiées M1, M2, M3, M4 et M5 dont les CI₅₀ étaient entre 193,52±13,30 nM et 124,74±10,29 nM. Les souches M4 et M5 avaient les taux de PfCRT les plus élevés, cependant la souche M1 a montré le meilleur niveau d'expression du gène. Toutes nos souches portaient l'haplotype CVIET qui est présent chez le témoin résistant Dd₂. En somme nous n'avons pas trouvé de corrélation significative entre la résistance *in vitro* d'une part, le taux de PfCRT et l'expression du gène *pfcr*t d'autre part. Ces résultats apportent des éléments en faveur de l'hypothèse selon laquelle le phénomène de chloroquino-résistance serait soumis à un contrôle multi-génique impliquant plusieurs mécanismes.

Mots Clés: Paludisme; *pfcr*t 76T ; Expression de gène; taux de protéine; résistance *in vitro*

Lack of correlation between *P. falciparum* *in vitro* chloroquine resistance and the expression of *pfcr*t 76T allele in Mali

Abstract : *Pfcr*t K76T point mutation has been associated with *in vitro* as well as *in vivo* chloroquine resistance of *P. falciparum*. However, the exact mechanism of the chloroquine resistance in parasites is still unclear. So in order to better understand this phenomenon of resistance, this study aimed to evaluate the correlation between the *in vitro* resistance with the rate of expressed PfCRT protein and level of *pfcr*t gene expression in field parasites from Mali. Field parasites were culture adapted, parasite proteins and mRNA were extracted for PfCRT protein rates and *pfcr*t gene expression evaluation. We found five chloroquine resistant strains identified as M1, M2, M3, M4 and M5 IC₅₀ ranged from 193,52±13,30 nM et 124,74±10,29 nM. The strains M4 and M5 had the highest PfCRT protein rates, however M1 had shown the highest level of *pfcr*t gene expression. Our all strains carried out CVIET haplotype which is present in resistant control Dd₂. In some we didn't find a significant correlation between *in vitro* chloroquine resistance with the rate of PfCRT protein and *pfcr*t gene expression. These results provide the evidence for the hypothesis that the phenomenon of chloroquine resistance may be under multi-genic control including different transporters.

Keys words: Malaria; *pfcr*t 76T, gene expression; protein rate; *in vitro* resistance

* Auteur de correspondance: welemadou@yahoo.fr

1. Introduction

Le gène *pfcr*t (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) a été identifié comme marqueur de la résistance de *P. falciparum* à la chloroquine (CQ). Des études *in vitro* ainsi que de terrain ont précisé l'importance de la mutation *pfcr*t K76T dans la chloroquine-résistance (CQR) [1-3]. Ainsi la présence de l'allèle *pfcr*t 76T est intimement liée au risque de survenue d'un échec thérapeutique à la CQ [4, 5] ou à la résistance à la CQ *in vitro* [5]. Il a été montré que le degré de l'association *pfcr*t 76T et CQR est plus élevé dans des études *in vitro* que dans les études de terrain.

Cependant, les mutations à elles seules ne suffisent pas pour l'expression du phénotype de la CQR *in vivo*, certainement à cause de facteurs additionnels tels la prémunition de l'hôte [6,7]. Des études récentes ont aussi montré la présence de l'allèle mutant *Pfcr*t76T chez des parasites ayant un phénotype chloroquine sensible [8, 9], ce qui signifierait que d'autres facteurs contrôlèrent l'expression de ce phénotype CQR.

Ainsi, il est important de comprendre le mécanisme d'expression de cet allèle mutant chez des parasites CQR avec des niveaux de résistance *in vitro* différents. Le but de ce travail était de déterminer la corrélation entre la résistance *in vitro* d'une part, le taux de protéine PfCRT, et le niveau d'expression du gène *pfcr*t d'autre part chez des parasites de terrain du Mali.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Criblage des souches parasites chloroquine-résistantes

Nous avons recueilli des parasites de sujets souffrant de paludisme dans la localité de Faladié, cercle de Kati au Mali. Les parasites ont été réveillés avec des solutions de chlorure de sodium et une adaptation de la méthode de Trager a été utilisée pour leur culture continue [10]. Il a été procédé à une sélection rapide de souches ayant une résistance *in vitro* par un test d'inhibition de la croissance avec une incubation des parasites avec 15 ng/mL de CQ

pendant 48 heures (Fidock, communication orale).

2.2. Tests de chimiosensibilité

Les réponses parasitaires *in vitro* à la CQ ont été mesurées dans des essais d'incorporation de l'hypoxanthine radioactive à 72 heures [11]. La série de dilutions décroissantes de 260 à 0,5 ng/ mL a été utilisée. Les calculs des concentrations inhibitrices (CI₅₀) ont été effectués sur le logiciel Excel par analyse de régression de la droite dose-réponse. Les souches 3D7 et Dd₂ ont servi respectivement de témoins sensible et résistant dans ces essais.

2.3. Western Blot des protéines parasitaires

Les protéines parasitaires extraites ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose incubée dans du tampon phosphate avec l'anticorps primaire, ensuite traitées avec l'anticorps secondaire lié à la peroxydase, dont l'activité est révélée par la chimiluminescence. L'analyse densitométrique des bandes réalisée avec le logiciel *WCIF Image J* [12] a permis d'évaluer les différents taux de PfCRT.

2.4. Détermination du niveau d'expression relative de *pfcr*t

Les ARN ont été extraits des parasites et utilisés pour la réalisation des réactions de PCR quantitative en temps réel (qPCR) et de la PCR de l'exon 2 de *pfcr*t. L'expression de *pfcr*t a été évaluée par la qPCR effectuée avec le *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* (Qiagen).

La réaction de PCR de l'exon 2 du gène *pfcr*t a été réalisée avec des amorces décrites ailleurs [13] et les produits de l'amplification de 650 Pb ont été découpés après migration dans un gel à 0,8% selon la méthode décrite dans le Qiagen Protocole (*QIAquick Gel Extraction Kit Protocol/ Spin Protocol*). Nous avons utilisé l'amorce CF5C pour le séquençage avec la séquence suivante: 5' ATTCAAGCAAAAATGACGAGCG

3. Résultats

A l'issue de l'adaptation des parasites à la culture *in vitro* et du criblage, il a été identifié cinq souches résistantes : M1, M2, M3, M4 et M5 et une souche sensible M0.

3.1. Tests *in vitro* de chimiosensibilité

Toutes ces souches étaient chloroquino-résistantes car ayant des CI_{50} supérieures à 100 nM, les profils avaient des allures similaires à celui du Dd₂. Les profils des témoins sensible 3D7 et résistant Dd₂ étaient différents. Le **tableau I** illustre les CI_{50} des différentes souches parasitaires.

Tableau I: Concentrations Inhibitrices (CI_{50}) des souches

Souches	CI_{50} minimum, nM	CI_{50} maximum, nM	CI_{50} moyenne, nM
M1	152,60	174,19	160,66±12,14
M2	113,70	134,28	124,74±10,29
M3	139,27	171,87	156,08±16,31
M4	130,01	150,86	141,07±9,21
M5	183,98	206,07	193,52±13,30

La souche de contrôle M0 avait une CI_{50} moyenne de 28 nM. La souche M5 était la plus résistante et M2 la moins résistante avec respectivement des CI_{50} moyennes de 193,52±13,30 nM et 124,74±10,29 nM.

3.2. Western Blot de PfCRT

Les mesures des indices densitométriques (ID) des bandes de PfCRT ont donné les résultats consignés dans le **tableau II**.

Tableau II: Indices densitométriques (ID) des bandes

Souches	ID1, pixels	ID2, pixels	Moyennes ID, pixels
M1	191	186	189±2
M2	184	189	186,5±2,5
M3	187	180	183,5±3,5
M4	191	197	194±3
M5	196	188	192±4

3.3. Séquençage du produit de la RT-PCR

Au niveau des codons 72-76 toutes les souches CQR portaient l'haplotype CVEIT contrairement à la souche chloroquino-sensible M0 qui portait l'haplotype CVMNK(**figure 1**)

H ₂ NGNGSRLGGGSLGKCAHVFKLIFKEIKDNIFYILSIYLSV CVMNK IFAKRTLNKIGNY YSFVTSETHNFCIMIMFFIVYSLFGNKGNSKERHRSFNLFQFAISMLDACSVILAFIGLTRT TGNIQSFVLQSLPINMFFCFLILRYRYHLYNYLGAVIIVVTIALVEMKLSFETQEENSIIIFNL VLISALMP COOH
H ₂ NGNGSRLGGGSLGKCAHVFKLIFKEIKDNIFYILSIYLSV CVIET IFAKRTLNKIGNY FVTSETHNFCIMIMFFIVYSLFGNKGNSKERHRSFNLFQFAISMLDACSVILAFIGLTRT TGNIQSFVLQSLPINMFFCFLILRYRYHLYNYLGAVIIVVTIALVEMKLSFETQEENSIIIFNLV LISSALMPV COOH

Figure 1: Séquences des acides aminés de l'exon 2 de *pfcr* des parasites sensibles et résistants

3.4. Niveau d'expression relative de *pfcr*

La souche M1 avait un niveau d'expression relative *pfcr/actine* nettement supérieur aux autres comme le montre la **figure 2**. Le **tableau III** montre les coefficients de corrélation entre les différents paramètres mesurés.

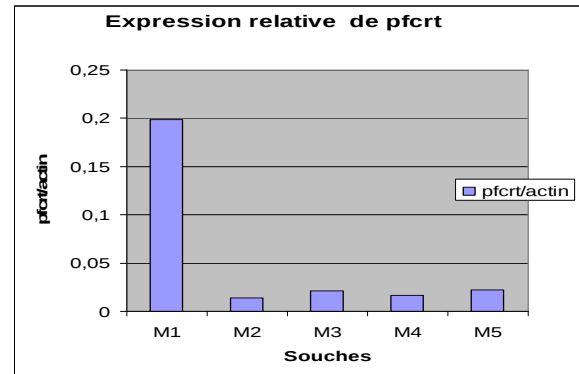


Figure 2: Expression relative de *Pfcr*/actine M1, M2, M3, M4 et M5 : souches parasitaires

Tableau III: Coefficients de corrélation entre les différents facteurs

Paramètres	CI_{50}	ID	ER
CI_{50}	1,00		
ID	r = 0,38 p = 0,52	1,00	
ER	r = 0,14 p = 0,81	r = -0,17 p = 0,77	1,00

Le coefficient de corrélation entre l'indice densitométrique (ID) et la CI_{50} est r = 38 % et le coefficient de corrélation entre l'expression relative (ER) de *pfcr* et la CI_{50} est plus faible r = 14%.

4. Discussion

Dans cette étude, nous avons évalué la corrélation entre la résistance *in vitro* de *P. falciparum* et le taux de protéine PfCRT d'une part, et le niveau d'expression de son gène *pfcr* d'autre part, chez des isolats de terrain au Mali. Nous avons identifié cinq souches de *P. falciparum* résistantes *in vitro* et mesuré leurs CI_{50} . Le séquençage de l'exon 2 du gène *pfcr* a montré que toutes ces souches portaient l'haplotype mutant CVIET correspondant aux codons 72-76. Par contre, la souche CQS portait l'haplotype sauvage CVMNK. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Durrand et collaborateurs au Cambodge qui ont montré que l'haplotype MNK était associé avec

la sensibilité à la chloroquine tandis que les haplotypes mutants comme IDT, IET l'était avec les CI_{50} élevées ^[8]. Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la résistance *in vitro* et le taux de protéine PfCRT ($r=38\%$, $p=0,52$). Ces résultats sont différents de ceux de Waller et collaborateurs qui ont montré qu'une diminution de la production de PfCRT chez des parasites affecte la réponse à la CQ ^[5]. Notons que cette étude a concerné des parasites monoclonaux génétiquement modifiés maintenus en culture. Le coefficient de corrélation entre la résistance *in vitro* et l'expression relative du gène *pfcr*t dans notre étude était faible ($r=14\%$, $p=0,81$). Ces résultats sont en conformité avec ceux de Durrand et collaborateurs qui ont évalué le niveau d'expression de *pfcr*t et la susceptibilité des isolats du Cambodge ^[8]. En Thaïland Chaijaroenkul et collaborateurs n'ont pas trouvé de relation entre le niveau d'expression des gènes *pfcr*t et *pfmdr1* et la résistance *in vitro* à la chloroquine. Ils suggèrent que d'autres gènes doivent contribuer à amplifier l'effet de la résistance une fois que le phénotype est établi par la présence des mutations *pfcr*t ^[14]. Les études de Mu et collaborateurs ont aussi identifié d'autres déterminants génétiques associés à la CQR sur les gènes *Pfmdr1*, *PfG7*, *PfG47*, *PfG30* et *PfG55* ^[15]. La limite de notre étude est la taille insuffisante de l'échantillon ($n=5$) pour mettre en évidence cette corrélation. Cela est dû au faible taux d'adaptation des parasites de terrain à la culture *in vitro* et du fait que l'étude a concerné surtout les souches CQR. Notons enfin que nous avons observé une faible dispersion des CI_{50} de nos souches. Ces observations ainsi que les précédentes apportent des éléments en faveur de l'hypothèse selon laquelle le phénomène de chloroquinorésistance est probablement soumis à un contrôle multi génique et pourrait inclure plusieurs mécanismes.

5. Conclusion

Le faible taux d'adaptation des parasites de terrain à la culture *in vitro* et le fait que notre étude a concerné surtout les souches CQR explique en partie la faible taille de notre

échantillon. Par conséquent ces résultats préliminaires doivent être confirmés avec un échantillon large afin d'évaluer clairement la corrélation entre la résistance *in vitro* et le niveau d'expression du gène *pfcr*t.

Bibliographie

- [1] Fidock, D.A., Nomura, T., Talley, A.K., Cooper, R.A., Dzekunov, S.M., Ferdig, M.T., Ursos, L.M., Sidhu, A.B., Naude, B., Deitsch, K.W., Su, X.Z., Wootton, J.C., Roepe, P.D., Wellems, T.E. Mol Cell (2000)6, 861–871.
- [2] Lakshmanan V, Bray PG, Verdier-Pinard D et al. EMBO Journal (2005) 24,2294–2305
- [3] Djimde, A., Doumbo, O.K., Cortese, J.F., Kayentao, K., Doumbo, S., Diourte, Y., Dicko, A., Su, X.Z., Nomura, T., Fidock, D.A., Wellems, T.E., Plowe, C.V., Coulibaly, D. N Engl J Med (2001) 344, 257–263.
- [4] Tinto H, Sanou B, Dujardin JC et al. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene (2005) 73, 171–173.
- [5] Waller KL, Muhle RA, Ursos LM, Horrocks P, Verdier-Pinard D, Sidhu AB, Fujioka H, Roepe PD, Fidock DA: J Biol Chem (2003) 278, 33593–33601
- [6] Wellems TE and Plowe CV, J. Infect. Dis. (2001)184, 770–776
- [7] Djimdé Adoulaye, Doumbo Ogobara, Traore Ousmane, Guindo Ando B, Kayentao Kassoum, Diourte Yacouba, Niare-Doumbo Safiatou, Coulibaly Drissa, Kone Abdoulaye, Sissoko Yacouba, Tekete Mamadou, Fofana Bakary, Dicko Alassane, Diallo Dapa A, Wellems Thomas E, Kwiatkowski Dominic and Plow Christopher V. Am. J. Trop. Med. Hyg (2003) 69(5), 558–563
- [8] Durrand V, Berry A, Sem R, Glaziou P, Beaudou J, Fandeur T. Mol Biochem Parasitol (2004) 136(2), 273–285
- [9] Basco Leonardo and Ringwald Pascal Journal of Infectious Diseases (2001) Vol183, Issue12, 1828–1831
- [10] Trager W and Jensen JB. Human Malaria parasites in continuous culture. Sciences. (1976) ;193:673–675
- [11] Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, J. Haynes David, and Chulay Jeffrey. Antimicrob Agents Chemother (1979) 16(6):710–718.
- [12] www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/imagej/ 25/08/2007
- [13]. Ariey F, Fandeur T, Durand R et al, Invasion of Africa by a single *pfcr*t allele of South East Asian type Malaria Journal. 2006;34, 365–369
- [14] Chaijaroenkul Wanna, Ward Stephen A, Mathirut Mungthin, Johnson David, Owen Andrew, G Bray Patrick, Na-Bangchang Kesara; Plasmodium falciparum: Malaria Journal, (2011) 10, 421–424
- [15] Mu Jianbing, Ferdig Michael, Feng Xiaorong, Joy Deirdre, Duan Junhui, Tetsuya Furuya, G. Subramanian, Aravind, Cooper Roland, Wootton John, Xiong Momiao and Su Xin-zhuan. 2003: Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine, Molecular Microbiology 49 (4), 977–989