

Effet du surnageant de culture primaire d'hépatocytes de souris sur la prolifération *in vitro* des isolats sauvages de *Plasmodium falciparum*

Andrianantenaina HB¹, Randrianarivehojosa M^{1,*}, Jambou R^{1,2}

RESUME : La culture *in vitro* des stades sanguins de *Plasmodium falciparum* a de nombreuses applications. Des clones de *P. falciparum* sont maintenus en culture continue dans différents laboratoires travaillant sur le paludisme. Cependant, la recherche en génomique nécessite davantage l'obtention de molécules parasitaires à partir des isolats sauvages. Nous avons testé l'effet du surnageant de culture primaire d'hépatocytes sur la croissance *in vitro* de *P. falciparum* prélevé dans le sang de porteurs de parasites naturellement infectés à Madagascar. La prolifération des parasites a été évaluée par la méthode isotopique basée sur l'incorporation de l'hypoxanthine tritiée. On a comparé la culture pendant 42 heures soit dans le milieu standard à base de RPMI 1640 additionné de surnageant de culture d'hépatocytes à base de L15, soit dans le milieu standard seul. La moyenne des facteurs de prolifération des parasites était 1,5 fois plus élevée en présence de surnageant de culture d'hépatocytes de 10% à 15% (v/v). L'importance de la culture de *P. falciparum* *ex-vivo* et de celle des hépatocytes *in vitro* est discutée dans cet article.

Mots-clés : Culture *in vitro* - Hépatocytes - *P. falciparum* - Madagascar.

ABSTRACT : "Effect of the supernatant from mice liver cells primary culture on *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* isolates" : Cultivation of *Plasmodium falciparum* has been a major research success, leading to a greater understanding of the parasite. Despite the fact that several *P. falciparum* clones have been maintained in continuous culture in different laboratories, research in genomics and proteomics would require parasitic material produced from fresh wild isolates. We have tested the effect of the supernatant from primary culture of mice hepatocytes on *in vitro* growth of *P. falciparum* isolates. Parasitized blood samples were collected from Madagascan malarious patients naturally infected. Isolates proliferation was assessed by use of isotopic method. The asexual erythrocytic stages of *P. falciparum* were grown for 42 hours in RPMI 1640-based medium plus L15 medium-based supernatant from mice liver cells culture, and in standard RPMI 1640-based medium alone. The mean of parasite growth was 1.5 times greater when the standard medium was enriched with the liver cells layer supernatant at a proportion of 10% and 15% (v/v). The usefulness of *P. falciparum* *ex-vivo* culture and of the hepatocytes *in vitro* primary culture is discussed.

Key-words : *In vitro* cultivation - Hepatocytes - *P. falciparum* - Madagascar.

INTRODUCTION

La mise au point de la technique de mise en culture des stades érythrocytaires asexués de *Plasmodium falciparum* par Trager et Jensen [1] a marqué l'histoire de la recherche en paludologie. Par la suite, de nouvelles techniques de culture ont été développées pour améliorer le maintien en culture des isolats de *P. falciparum* afin de produire plus de matériels parasitaires. Différents laboratoires travaillant sur des modèles *in vitro* utilisent des clones de *P. falciparum* caractérisés pour documenter la résistance, l'inféctivité et la virulence des parasites [2-5]. L'importance des résultats des tests et études *in vitro* qui serviraient à expliquer ou prédire ce qui se produirait *in vivo*, chez l'hôte, est évidente. Mais la diversité de souches de

P. falciparum circulant dans les zones d'endémie de par le monde est un des facteurs limitants qui expliquent l'infirmité sur le terrain de certaines informations obtenues *in vitro* sur des clones de laboratoire. L'établissement en culture de souches sauvages est difficile, et une sélection des clones peut se produire au sein des isolats, compromettant l'interprétation finale des tests réalisés. Il s'avère donc important, non seulement de continuer à adapter et à maintenir en culture continue des isolats de *P. falciparum* fraîchement prélevés des malades, mais aussi de produire en un temps assez court, équivalent à un cycle schizogonique, des matériels parasitaires pouvant servir aux analyses phénotypiques, génomiques ou protéomiques. Les travaux de Mazier *et al.* [6] ont montré la capacité nourricière *in vitro* des hépatocytes vis-à-vis de *P. falciparum*. Ainsi, nous nous proposons de tester l'effet du surnageant obtenu à partir des cultures primaires de cellules hépatiques de souris sur la prolifération des isolats de *P. falciparum*.

¹ Institut Pasteur de Madagascar, Groupe de Recherche sur le Paludisme, BP 1274 - 1001 Antananarivo - Madagascar.

² Institut Pasteur de Dakar, Unité d'Immunologie, BP 220 - Sénégal.

MATERIEL ET METHODES

Culture de cellules hépatiques de souris suisse albinos

Dans notre étude, la technique de Seglen [7] pour la mise en culture des cellules hépatiques des rats a été adaptée pour les cellules hépatiques murines. Des souris suisses albinos consanguines de 6 semaines ont été utilisées. Le lobe gauche du foie prélevé chez une souris anesthésiée a été recueilli dans la solution de Hank's Balanced Salt Solution normal (HBSS 1X) à 37°C et de pH 7,4 dans une boîte de pétri. Sous une hotte à flux laminaire, 200 ml de solution de collagénase (Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, Mannheim, Allemagne) à 0,25 g/l dans du HBSS 1X à 37°C additionné de 0,75 g/l de CaCl₂ ont été injectés à l'organe à un débit de 40 ml/mn. Le foie, devenu blanchâtre à la fin de la perfusion, a été recueilli dans une autre boîte de pétri, et broyé délicatement avec un piston de seringue stérile. Le broyat obtenu a été récupéré dans 50 ml de HBSS 1X à 4°C, puis filtré sur une compresse stérile. Le filtrat a été centrifugé à 1000 tours/mn pendant 3 mn à 4°C. Le surnageant a été éliminé. Un deuxième lavage a été fait avec du HBSS 1X à 4°C. Le culot a été récupéré dans 17,5 ml de milieu de culture L15 ou Leibovitz 15 (Sigma chemical, MO, Etats Unis), puis déposé délicatement sur une colonne de solution de Percoll iso-osmotique (5 ml) dans un tube à fond conique (Falcon, ref. 352098, Becton Dickinson Labware, NY, USA). Le tube a été centrifugé à 2000 tours par minute pendant 10 mn à 4°C. Le culot obtenu a été remis en suspension dans 10 ml de L15 additionné de 2 g/l de SAB ou sérum albumin bovine (Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, Mannheim, Allemagne) et de 10 mg/l d'insuline bovine (Sigma chemical, MO, USA). Après une centrifugation à 1 000 tours/mn pendant 3 mn à 4°C, un deuxième lavage a été fait dans les mêmes conditions. Le culot d'hépatocytes a été repris dans le milieu L15 complet *i.e.* additionné de sérum de veau fœtal 10% (v/v) (Gibco BRL, Paisley, Ecosse), 10 mg/l d'insuline bovine, de 2 mM de L-glutamine (Gibco BRL, Paisley, Ecosse), et mis en culture sur une plaque de culture à fond plat (Costar, Corning Incorporated, NY, Etats Unis) à raison de 200 µl de suspension cellulaire contenant 30 000 à 40 000 hépatocytes par puits. De la gentamicine, pénicilline et streptomycine ont été rajoutées au milieu de culture pour avoir respectivement les concentrations finales de 5 µg/ml, 100 UI/ml et 100 µg/ml. La plaque de culture a été incubée à 37°C en atmosphère humide et microaérophile (cloche à bougie). Le milieu de culture a été renouvelé 3 h

plus tard, en rajoutant de l'hémisuccinate d'hydrocortisone (Roussel, Paris, France) à 3.10⁻⁵M. Les hépatocytes ont été maintenues en culture pendant 48 h. Le gazage a été renouvelé toutes les 24 h. Un examen quotidien au microscope inverse à l'objectif X40, a été réalisé pour contrôler l'état des hépatocytes. Au bout de 48 h, le surnageant de culture de cellules hépatiques a été récupéré et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Isolats de *P. falciparum* testés

Deux types d'isolats de *P. falciparum* ont été testés : 2 isolats préalablement adaptés en culture, et 19 isolats fraîchement prélevés des malades. Ces isolats ont été collectés dans les sites sentinelles de l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM), à Saharevo et à Ankazobe. Le recrutement des patients s'est fait en consultation externe, sans distinction d'âge ni de sexe. Chaque sujet a été enrôlé dans cette étude avec son consentement éclairé. Après un examen clinique, un frottis sanguin coloré au Giemsa a été examiné au microscope pour chaque patient. A l'exception de malades présentant des signes cliniques d'anémie ou un état général altéré, un prélèvement de 3 à 5 ml de sang veineux a été fait chez des sujets âgés de 15 ans et plus, ayant une parasitémie supérieure à 2 000 trophozoïtes par microlitre de sang. Les traitements des malades ont été décidés et suivis par le médecin traitant.

Milieus utilisés pour la mise en culture des isolats de *P. falciparum*

Le milieu RPSH *i.e.* RPMI 1640 (Gibco BRL, Paisley, Ecosse) additionné de sérum humain AB+ 10% (v/v) servait de milieu standard utilisé pour la culture *in vitro* des isolats de plasmodies. Le surnageant de culture d'hépatocytes a été rajouté à ce milieu RPSH aux proportions de 5%, 10% et 15% (v/v), pour tester son effet sur la prolifération des isolats de *P. falciparum*. Un même lot de surnageant a été utilisé pour tous les tests.

Mise en culture des parasites

Les échantillons de sang prélevés sur tube vacutainer à ACD ont été acheminés à l'IPM à Antananarivo. La mise en culture, basée sur la technique de Trager et Jensen [1], concernait des isolats de *P. falciparum* parvenus au laboratoire en moins de 48 h après le prélèvement, et ont été acheminés en chaîne de froid entre 4 et 8°C. Les isolats n'ont pas été cultivés quand la notion de prise d'antipaludiques en moins d'une semaine avant la consultation était reconnue par les malades. Le tube de sang a été centrifugé à 1800 tours/mn pendant 10 mn. Après avoir éliminé le surnageant, le culot

de globules rouges parasités a été lavé 3 fois en RPMI 1640 (Gibco, BRL, France). La mise en culture a été effectuée dans 3 puits par type de milieu de culture, sur des plaques à 96 puits à fond plat selon la méthode isotopique [8,9]. L'hypoxanthine marquée au tritium (Amersham, Buckinghamshire, Angleterre) a été rajoutée au milieu de culture à raison de 0,5 µCi par puits afin d'évaluer le taux de croissance des parasites. Les parasites ont été ensuite incubés à 37°C dans une atmosphère microaéroophile pour une durée totale de 42 h. Après une congélation/décongélation, le contenu des puits a été collecté sur un filtre en fibre de verre (Wallac, Turku, Finland). Une fois séché à l'étuve à 50°C, le filtre a été imbibé avec 2 ml de liquide scintillant BCS (Amersham, Buckinghamshire, Angleterre). La radioactivité a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide MicroBeta Wallac. La prolifération des parasites a été évaluée en fonction de la valeur de la radioactivité, exprimée en coups par minute traduisant le taux d'incorporation d'hypoxanthine tritiée. La moyenne des valeurs de radioactivité des trois puits a été calculée. Un test n'était pas considéré quand cette moyenne était inférieure à 1000 coups/mn. Le facteur de prolifération du surnageant a été calculé selon la formule suivante :

$$Fp = \frac{\text{radioactivité en (RPSH + surnageant)}}{\text{radioactivité en RPSH}}$$

RESULTATS

Les tests préliminaires ont été faits avec deux isolats, codés 99534 et 99734, préalablement adaptés en culture en milieu RPSH dans notre laboratoire. Le rajout au milieu RPSH du surnageant de culture d'hépatocytes de souris à 5% à 15% (v/v) améliorait la prolifération de ces 2 isolats de *P. falciparum*. La comparaison de la croissance de parasites, en milieu standard RPSH et en milieu RPSH additionné de surnageant à 5%, 10% et 15% (v/v), a montré que le facteur de multiplication variait de 1,55 à 1,90 et de 1,60 à 1,85 respectivement pour les isolats 99534 (figure 1) et 99734.

Pour les isolats fraîchement prélevés des malades qui ont mûri *in vitro* (7/19, soit 36,8%), le facteur de prolifération a varié selon l'isolat (figures 2a; 2b; 2c). Le rajout de surnageant à 5%, 10% et 15% (v/v) a augmenté respectivement les moyennes de facteurs de prolifération de 1,15 (extrêmes de Fp : 1,12 - 1,47); de 1,44 (extrêmes de Fp : 1,02 à 2,11) et 1,47 (extrêmes de Fp : 1,10 - 1,86). Les différences entre les facteurs de prolifération

obtenues avec le milieu standard et le milieu standard additionné de surnageant de culture d'hépatocytes ont été statistiquement significatives ($P < 0,01$).

Figure 1 : Prolifération de l'isolat de *Plasmodium falciparum* 99534, préalablement adapté en culture continue, en fonction de la quantité de surnageant de culture d'hépatocytes rajouté au milieu standard

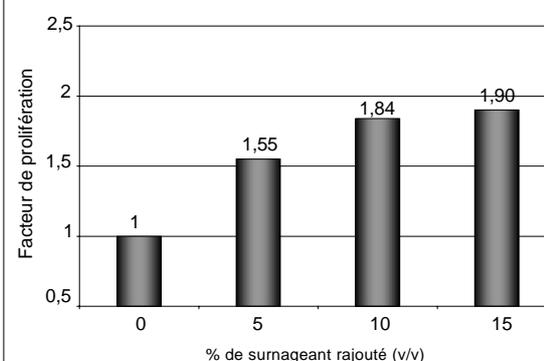
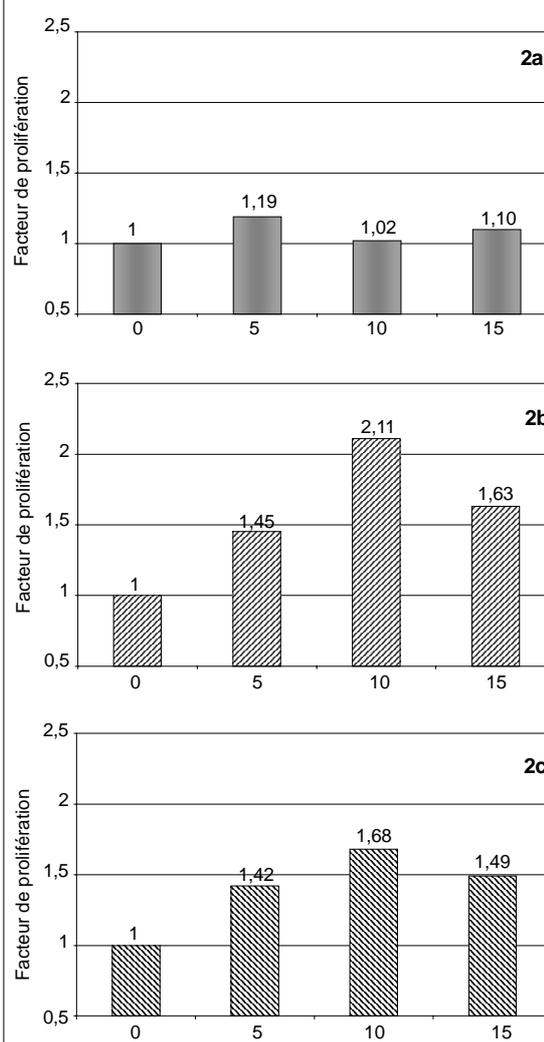


Figure 2 : Illustration de la variation individuelle de la prolifération des isolats sauvages de *Plasmodium falciparum* en présence du surnageant de culture d'hépatocytes rajouté au milieu standard

Le surnageant n'a pas d'effet sur la faible croissance de l'isolat 99816 (2a); par contre les valeurs du facteur de prolifération oscillent entre 1,42 à 2,11 pour les isolats 99818 et 99850 après 42 h de culture (figures 2b et 2c)



DISCUSSION

Cette étude montre que le rajout du surnageant permet d'améliorer la croissance *in vitro* des isolats de *P. falciparum* par rapport à ce que donne le milieu standard RPSH. Ces résultats semblent confirmer le rôle nourricier des hépatocytes vis-à-vis de *P. falciparum* comme l'ont décrit *Mazier et al.* [6].

Le faible nombre de tests interprétables (36,8%) illustre la difficulté pour les parasites de s'adapter aux conditions de culture. Ni la durée qui s'écoule entre le prélèvement et l'arrivée des parasites au laboratoire, ni la parasitémie initiale ne sont forcément des facteurs limitants pour la réussite de la culture. Pour 4 isolats sur les 7 qui ont maturés en culture, la parasitémie était < 5000 trophozoïtes par μ l. 5 isolats sur ces 7 ont été mis en culture entre la 36^{ème} et la 48^{ème} h après le prélèvement.

Chez l'homme, les formes schizontes de *P. falciparum* séquestrent. Les échantillons de sang parasité prélevés des malades contiennent principalement la forme jeune (trophozoïtes) du stade asexué érythrocytaire. L'augmentation du facteur de prolifération de *P. falciparum* en 42 h, *i.e.* sur une durée équivalente à un cycle schizogonique, pourrait être due soit à l'augmentation du pourcentage de parasites maturant effectivement, soit à l'augmentation du nombre de mérozoïtes moyen par schizontes. Ces deux hypothèses ont des implications importantes pour produire *ex-vivo* et étudier des molécules parasitaires exprimées au stade schizonte, dont celles qui seraient impliquées par exemple dans la virulence des parasites [2,10,11,12].

Les études précédentes réalisées dans notre laboratoire ont montré la difficulté de l'adaptation en culture des isolats de *P. falciparum*. Sur les 60 isolats mis en culture continue, deux ont pu être adaptés avec succès [*Randrianariveolojosa, communication personnelle*]. Le maintien des parasites en culture est onéreux et contraignant. Mais il est à noter que différentes études ont montré que des isolats de *P. falciparum* adaptés aux conditions de culture perdent certaines propriétés (par exemple la perte de protubérance communément appelée knobs sur la membrane des globules rouges infectés) et des souches de ces isolats peuvent être sélectionnées [2,13]. Si certains clones de *P. falciparum* perdent en culture la capacité de produire des gamétocytes, les isolats malgaches 99534 et 99734 (sensibles à la chloroquine et à la pyriméthamine) continuent à en produire, même après un certain nombre de congélation en azote liquide. Les gamétocytes produits *in vitro* pourront servir à des infections

expérimentales [14,15]. Il s'avère important de continuer à adapter en culture des isolats "sauvages" fraîchement prélevés des malades.

Notre étude montre que le surnageant de culture d'hépatocytes stimule la prolifération des isolats de *P. falciparum* qui ont maturé *ex-vivo* en 42 h. Ceci ouvre des perspectives sur des études génomiques de *P. falciparum*. L'augmentation du facteur de prolifération des parasites ne permet pas de prédire une amélioration du taux de ré-invasion des mérozoïtes au bout d'un cycle si on continue la culture. Ainsi, l'effet du surnageant de culture d'hépatocytes, pour maintenir des parasites en culture continue, mérite d'être testé.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement les malades qui ont accepté de donner de leur sang pour cette étude. Nous sommes très reconnaissants envers l'équipe du Groupe de Recherche sur le Paludisme de l'Institut Pasteur de Madagascar, notamment les Drs Lucie Raharimalala, Laurence Randrianasolo et Arsène Ratsimbasoa, qui ont participé activement à la collecte des prélèvements. Nous remercions également le Dr Vincent Robert qui a bien voulu relire et commenter cet article. Les souris suisses albinos étaient fournies par l'animalerie de l'Unité de Recherche de Virologie de l'Institut Pasteur de Madagascar. Cette étude a été financée par le Ministère de la Coopération française via le projet FAC 950009.

REFERENCES

- 1- **Trager W, Jensen JB.** Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976; **193** : 673-675.
- 2- **Langreth SG, Peterson E.** Pathogenicity, stability, and immunogenicity of a knobless clone of *Plasmodium falciparum* in Colombian owl monkeys. *Infect Immun* 1985; **47** : 760-766.
- 3- **Dessens JT, Mendoza J, Claudianos C, Vinetz JM, Khater E, Hassard S, Ranawaka GR, Sinden RE.** Knockout of the rodent malaria parasite chitinase PbCHT1 reduces infectivity to mosquitoes. *Infect Immun* 2001; **69** : 4041-4047.
- 4- **Pradines B, Rolain JM, Ramiandrasoa F, Fusai T, Mosnier J, Rogier C, Daries W, Baret E, Kunesch G, Le Bras J, Parzy D.** Iron chelators as antimalarial agents: *in vitro* activity of dicaticholate against *Plasmodium falciparum*. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50** : 177-187.
- 5- **Randrianariveolojosa M, Ariey F, Raharimalala LA, Parzy D, Rogier C, Jambou R.** Current absence of pyrimethamine-resistance of *Plasmodium falciparum* in Madagascar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002. (*sous presse*).
- 6- **Mazier D, Druilhe P, Guguen-Guillouzo C, Bayard P, Soeun V, Datry A, Gentilini M.** Hepatocytes as feeder-layers for *in vitro* cultivation of *Plasmodium falciparum* blood-stages. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984; **78** :330-334.
- 7- **Seglen PO.** Preparation of rat liver cells. III. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp Cell Res.* 1973, **86** : 391-398.

- 8- **Le Bras J, Deloron P.** *In vitro* study of drug sensibility of *Plasmodium falciparum* : An evaluation of a new semi-microtest. *Am J Trop Med Hyg* 1983; **32** : 447-451.
 - 9- **Randrianarivelosia M, Raharimalala LA, Randrianasolo L, Ratsimbasoa A, Rason MA, Arieu F, Jambou R.** Madagascan isolates of *Plasmodium falciparum* showing low sensitivity to artemether *in vitro*. *Ann Trop Med Parasitol* 2001; **95** : 237-243.
 - 10- **Hommel M.** Modulation of host cell receptors: a mechanism for the survival of malaria parasites. *Parasitology* 1997; **115** : S45-54
 - 11- **Scherf A, Hernandez-Rivas R, Buffet P, Bottius E, Benatar C, Pouvelle B, Gysin J, Lanzer M.** Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J* 1998; **17** : 5418-5426.
 - 12- **Chen Q, Schlichtherle M, Wahlgren M.** Molecular aspects of severe malaria. *Clin Microbiol Rev* 2000; **13** : 439-450.
 - 13- **Vaughan JA, Noden BH, Beier JC.** Prior blood feeding effects on susceptibility of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) to infection with cultured *Plasmodium falciparum* (Haemosporida : Plasmodiidae). *J Med Entomol* 1994; **31** : 445-459.
 - 14- **Awono-Ambene HP, Diawara L, Robert V.** Comparison of direct and membrane feeding methods to infect *Anopheles arabiensis* with *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 2001; **64** : 32-34.
 - 15- **Ponnudurai T, Lensen AH, Van Gemert GJ, Bensink MP, Bolmer M, Meuwissen JH.** Infectivity of cultured *Plasmodium falciparum* gametocytes to mosquitoes. *Parasitology* 1989; **98** : 165-173.
-