

Culture *in vitro* d'isolats de terrain de *Plasmodium falciparum* au Mali.

A. A. Djimde (1), L. Kirkman (3), L. Kassambara (1), M. Diallo (1), C. V. Plowe (2), T. E. Wellems (3)
& O. K. Doumbo (1)

(1) Centre de recherche et de formation sur le paludisme, Département d'épidémiologie des affections parasitaires, Faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie, Université de Bamako, Mali. Point G, BP : 1805 Bamako, Mali. Tél./fax : (223) 222 8109, e-mail : adjimde@mrtcbko.org

(2) Section paludisme, Centre pour le développement des vaccins, Université du Maryland, École de médecine, Baltimore, MD, USA.

(3) Laboratoire de recherche sur le paludisme et ses vecteurs, Institut national des allergies et des maladies infectieuses, Instituts nationaux de la santé, Bethesda, MD, USA.

Manuscrit n° 2883. "Parasitologie". Reçu le 25 novembre 2005. Accepté le 11 avril 2006.

Summary: *In vitro* cultivation of field isolates of *Plasmodium falciparum* in Mali.

Malaria immunology, molecular biology and pathogenicity studies often require the adaptation of Plasmodium falciparum field isolates to continuous in vitro cultivation. For this purpose we have established propagation protocols of asexual erythrocytic stages of P. falciparum samples from malaria patients or asymptomatic carriers in Mali. The parasites were grown in standard culture medium supplemented by human serum and in a culture medium without human serum but supplemented by AlbuMax 1™. The candle jar environment and tissue culture flasks gassed with 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ obtained from a portable gas mixer were used. Protocols for parasite cultivation in a resource-poor setting were developed. These protocols were successfully applied to fresh isolates in Mali as well as to blood samples frozen in liquid nitrogen and shipped to a laboratory in USA.

Résumé :

Les études d'immunologie, de biologie moléculaire et de pathogénicité de Plasmodium falciparum requièrent souvent l'adaptation d'isolats naïfs de terrain à la culture in vitro. Pour ce faire, nous avons élaboré différents protocoles de propagation des formes asexuées sanguines de P. falciparum provenant de malades ou de porteurs asymptomatiques du Mali. Ces parasites ont été cultivés dans le milieu classique RPMI 1640 supplémenté soit par du sérum humain, soit par l'AlbuMax1™. Nous avons pratiqué la méthode de la « cloche à bougie » et la culture dans des flacons soumis à un mélange gazeux constitué de 5 % de CO₂, 5 % d'O₂ et 90 % de N₂ obtenu d'un mélangeur portable. Ces protocoles ont été appliqués avec succès sur des isolats sauvages au Mali ainsi que sur des échantillons sanguins congelés dans de l'azote liquide transportés hors du Mali.

**Plasmodium falciparum
in vitro cultivation
field protocol
laboratory
Mali
Sub-Saharan Africa**

**Plasmodium falciparum
culture in vitro
protocole de terrain
laboratoire
Mali
Afrique intertropicale**

Introduction

Une meilleure compréhension de la biologie de *Plasmodium falciparum*, ainsi que les études de chimiosensibilité, d'immunologie et de pathogénicité, exigent la culture *in vitro* du parasite. Si la culture des clones de laboratoire est tout à fait routinière aujourd'hui, l'adaptation des isolats de terrain aux conditions de prolifération *in vitro* demeure incertaine et bien souvent infructueuse (1). De plus, la faiblesse de l'équipement, ainsi que la rareté des ressources dans les laboratoires des pays d'endémie palustre, rendent l'adaptation des plasmodies locales particulièrement ardue. Nous rapportons ici les premiers essais réussis de l'adaptation des isolats de *P. falciparum* recueillis au Mali. Ces cultures ont été réussies, aussi bien avec la « cloche à bougie » (2) qu'avec un mélange gazeux enrichi en gaz carbonique en présence ou en l'absence de sérum humain dans le milieu de culture.

Matériel et méthodes

Les milieux de culture classiques à base de sérum humain non immun ont été employés. Un milieu de culture « incomplet »

(MCI) composé de RPMI 1640 (Gibco BRL), de 5,4 g/l de HEPES (Calbiochem, CA), 0,5 g/l d'hypoxanthine (Sigma, MO) était préparé et conservé à 4 °C. Au moment de l'emploi, un milieu de culture « complet » (MCC) était préparé en ajoutant au MCI 15 % de sérum humain non immun, 25 mM de bicarbonate de sodium (Biofluids, MD) et 0,01 % de gentamicine (Sigma, MO). Tous les milieux de culture étaient rendus stériles par filtration (Nalgene Filterware, Fisher Scientific, Pittsburgh) avant usage. Un milieu identique sans sérum, mais supplémenté par de l'AlbuMax1™ à 2,5 % a été utilisé pendant les trois à quatre premières semaines d'adaptation des isolats puis à 0,5-1 % pour le reste de la culture.

Le prélèvement et la conservation des isolats de terrain étaient faits suivant les méthodes déjà décrites (3). Dans les cas où la culture était faite à partir de sang congelé, la décongélation avait lieu suivant les techniques décrites (3). Les hématies parasitées étaient mises en suspension dans 2 ou 5 ml d'une solution extemporanée de MCC. L'hématocrite était ensuite porté à 5 % avec des globules rouges non parasités. Cinq échantillons de sang parasités, prélevés à Mopti en 1991 (désignés M1 pour Mopti1, M2, M3, M4 et M5) et conservés au congélateur à -160 °C, ont été décongelés et mis en culture.

Cinq autres isolats de Bancoumana (BC1 pour Bancoumana 1, BC2, BC3, BC4 et BC5), un isolat de l'hôpital national Gabriel-Touré (HGT1) et trente-huit isolats de diverses origines du Mali (C1 à C38 pour culture 1 à 38) ont été mis en culture sans congélation. Les clones de laboratoire 3D7, FCR3, Dd2, Camp A ont été utilisés comme témoins positifs. La culture sous « cloche à bougie » était faite suivant la technique décrite par JENSEN et al. (2). L'authenticité des isolats de terrain a été vérifiée par la technique du « DNA fingerprinting » (4).

Dans les Instituts nationaux de la santé des États-Unis (NIH), les cultures étaient soumises à un mélange gazeux composé de 5 % d'O₂, 5 % de CO₂ et 90 % de N₂ pendant au moins 20 secondes. Les flacons étaient ensuite hermétiquement fermés, puis mis à incuber à 37 °C. Pour disposer du mélange ci-dessus décrit au Mali, nous avons utilisé un mélangeur portatif réglable (Proportional Gas Blender, Smith Equipment). Pour cela, des bouteilles individuelles contenant les trois types de gaz cités plus haut étaient branchées sur le mixeur et les commandes réglées de manière à produire le mélange convenable. Les cultures étaient soumises à ce mélange pendant 30 secondes avant d'être mises à incuber.

Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Microsoft Excel® version 5.0. Le protocole de cette étude a été soumis et approuvé par les comités d'éthique des Instituts nationaux de la santé (NIH) des États-Unis et de la Faculté de médecine de pharmacie et d'odonto-stomatologie de l'Université de Bamako, Mali.

Résultats

Culture d'isolats maliens de *P. falciparum* au NIH

Après plusieurs tentatives infructueuses, nous avons finalement réussi la culture des cinq isolats de Mopti à partir de la 3^e semaine. Pour nous assurer qu'il ne s'agissait pas de contamination des cultures par des clones de laboratoire, nous avons déterminé le génotype de chacune d'elle par la technique du « DNA fingerprinting » (4). Ces isolats étaient différents les uns des autres et différents des clones Dd2 et 3D7 (figure 1). Ces cinq isolats de *P. falciparum* ont été maintenus en culture pendant 2 mois avant d'être congelés pour conservation et utilisation future. Pendant ce temps, les clones témoins proliféraient normalement.

Culture de souches maliennes de *P. falciparum* au Mali

Les cultures « sous cloche à bougie » étaient faites concomitamment dans l'AlbuMax1™ à 2,5 % ou le sérum A+ à 15 %. Après plusieurs tentatives, nous avons réussi la culture du premier isolat, le BC5 au-delà de 3 semaines sur milieu AlbuMax1™ (figure 2a). Celui-ci a été maintenu en culture continue pendant 60 jours. Trente-huit isolats ont été cultivés avec le mélangeur portatif (C1 à C38), parmi lesquels cinq (C1, C2, C11, C13 et C38) ont pu s'adapter avec succès à la culture *in vitro* (figure 2b), tant dans le milieu à base de sérum qu'avec l'AlbuMax1™.

Discussion

Nous avons réussi à adapter à la culture continue *in vitro* des isolats de terrain de *P. falciparum* prélevés sur des malades du Mali atteints de paludisme ou des porteurs asymptomatiques. Ces adaptations ont été faites, tant dans les laboratoires des Instituts nationaux de la santé des États-Unis d'Amérique qu'au Centre de formation et de recherche sur

Figure 1.

Génotypage de quatre isolats de terrain et de Dd2 et 3D7; les points et les flèches indiquent les polymorphismes génétiques.

Genotyping of four field isolates and Dd2 and 3D7; the points and arrows indicate the genetic polymorphisms.

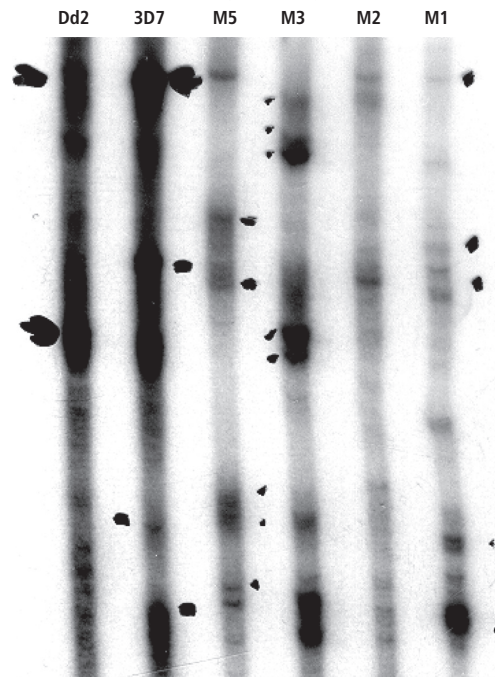


Figure 2a.

Culture sous « cloche à bougie » de l'isolat de terrain BC5 dans le sérum et AlbuMax1™.

Growth of a field isolate BC5 in serum and AlbuMax 1™ in candle jar environment.

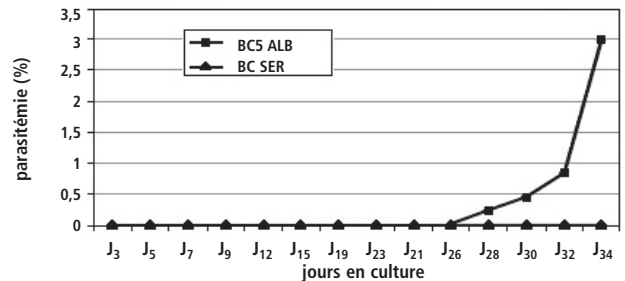
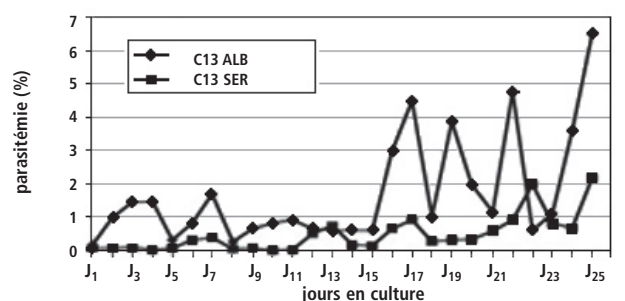


Figure 2b.

Culture de l'isolat de terrain C13 dans le sérum et AlbuMax1™ et un mélange de gaz obtenu avec un mélangeur portatif réglable.

Growth of a field isolate C13 in serum and AlbuMax 1™ in a gaz mixture obtained from a portable gas mixer.



le paludisme de l'Université de Bamako, Mali. Cependant, si la culture des clones de laboratoire a été aisée, l'adaptation des isolats sauvages n'a été rendue possible qu'après une longue période d'au moins trois semaines où la parasitémie était très faible. L'adaptation des isolats sauvages aux conditions culturelles *in vitro* serait particulièrement difficile (1, 2). Les isolats sauvages surtout d'origine africaine sont connus pour

être polyclonaux. Il semble que les premiers jours ou semaines de culture soumettraient les différents clones qui composent l'isolat à une sélection au cours de laquelle beaucoup de parasites meurent, laissant le champ libre à quelques clones seulement qui parviendront à proliférer.

Les isolats sauvages d'origine malienne ont pu être maintenus en culture continue, tant dans des milieux de culture à base de sérum humain que dans des milieux à base de succédanés de sérum. Ceci confirme les résultats des travaux antérieurs selon lesquels il était possible de remplacer le sérum humain par des solutions de compositions diverses (1).

L'impossibilité de trouver un mélange adéquat préparé à l'avance d'oxygène, de gaz carbonique et d'azote nous a conduit à expérimenter le mélange au laboratoire de ces différents gaz à l'aide d'un mélangeur de gaz réglable. La culture *in vitro* de nouveaux isolats de terrain par l'utilisation d'un tel mélange gazeux pourrait être particulièrement utile aux laboratoires des pays en développement. Cette stratégie pourrait aussi s'appliquer à la culture d'autres organismes qui nécessitent des proportions déterminées de certains gaz pour leur croissance.

Conclusion

Notre travail confirme l'adaptation des isolats sauvages de terrain aux conditions de la culture continue *in vitro* dans un laboratoire modeste de terrain. Ceci ouvre de nom-

breuses perspectives, dont celle d'étudier sur place divers aspects de la biologie du parasite afin d'améliorer le contrôle du paludisme.

Remerciements

Ce travail a été financé par le NIAID/NIH et par TDR (UNICEF-UNDP-World Bank-WHO *Special Program for Research and Training in Tropical Diseases*).

Nous remercions les D^r Robert GWADZ, Richard SAKAI pour leurs conseils et leurs appuis techniques et matériels. Nous remercions le D^r Steve DOLAN pour nous avoir offert les clones de laboratoire et sa contribution dans la collection des isolats de Bancoumana.

Références bibliographiques

1. DRUILHE P & GENTILINI M – Culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum*. Intérêt et limites – Méthodologie. *Méd Trop*, 1982, **42**, 437-462.
2. JENSEN JB & TRAGER W – *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J Parasitol*, 1977, **63**, 883-886.
3. READ M & HYDE JE – Simple *in vitro* cultivation of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* (erythrocytic stages) suitable for large-scale preparations. *Methods Mol Biol*, 1993, **21**, 43-55.
4. SU XZ & WELLEMS TE – *Plasmodium falciparum*: a rapid DNA fingerprinting method using microsatellite sequences within var clusters. *Exp Parasitol*, 1997, **86**, 235-236.