

L'utilisation des cultures *in vitro* dans l'étude de *Schistosoma mansoni*

I. Le maintien en survie des adultes

par Félix LANCASTRE et Yves GOLVAN

*Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine de Paris-St-Antoine,
27, rue de Chaligny, F 75012 Paris*

Résumé

Les auteurs décrivent deux procédés de culture *in vitro* de *Schistosoma mansoni* (et applicables à d'autres Trématodes et aux Cestodes).

La première méthode, appliquée en 1967, a prouvé que la survie en anaérobiose de *S. mansoni* est possible pour des durées allant de trois à six semaines, la ponte paraissant toutefois inhibée dans ces conditions.

La deuxième méthode consiste dans le maintien de *S. mansoni* sur des cellules KB ou HeLa entretenues en lignée continue. Les premiers résultats indiquent une survie plus longue (jusqu'à 120 jours), et de meilleure qualité (ponte d'œufs au 15^e jour dans une expérimentation en cours). Les vers semblent se nourrir à la fois par ingestion des cellules de culture et absorption transtégumentaire des substances nutritives.

Summary

Two methods for cultivation *in vitro* of *Schistosoma mansoni* (also suitable when applied to others Trematodes and to the Cestodes) are described by the authors.

1) The survival of *S. mansoni* under anaerobic conditions is obtained for periods reaching three or six weeks. However, under such conditions, egg-laying seems inhibited.

2) In the second method, *S. mansoni* is cultivated on Kb or HeLa cells. Then, the survival reaches 120 days and is of best quality (egg-laying on the 15th day in an experimentation on hand). Worms seem to live on the culture cells and by integumentary absorption of nutritive substances.

A côté des études portant sur le rôle pathogène ou sur les conditions du maintien et de la transmission des parasites dans la nature, les essais de culture *in vitro* se sont multipliés ces dernières années. Cette méthode a plusieurs buts :

- 1) observer le déroulement du cycle vital du parasite et les étapes de sa morphogénèse ;
- 2) tenter d'élucider les modalités de sa nutrition et de sa reproduction, au besoin par des cultures organotypiques ;
- 3) permettre l'étude biochimique et immunologique des produits d'excrétion et de sécrétion ;
- 4) tester l'action de diverses substances à visées pharmacologiques et thérapeutiques.

Si l'on reprend les trois premiers de ces buts, on se rend compte qu'ils concourent à une approche des relations entre le parasite et son hôte. A la limite, il s'agit de trouver une définition expérimentale du parasitisme. Bien évidemment ce projet idéal est loin de sa réalisation, étant donné la multitude des facteurs entrant en jeu tant du côté de l'hôte que de celui du parasite et le caractère dynamique de leurs interactions.

Plus modestement, nous nous sommes proposés par la méthode des cultures *in vitro* de réaliser la survie de certains parasites et d'obtenir leur développement dans les conditions expérimentales les moins traumatisantes et les plus simples possibles. Le Trématode Distomien *Schistosoma mansoni*, dont l'importance est considérable en pathologie humaine, s'est alors imposé à nous. On sait que les Schistosomes, et plus particulièrement celui-ci, constituent, pour les zones chaudes, un obstacle majeur à leur développement économique et posent aux médecins et aux épidémiologistes des problèmes difficiles à résoudre.

Le ver vit à l'état adulte dans les veines du système porte de l'homme qui est son hôte habituel, mais aussi dans celles des Rongeurs (souris et hamsters) qui sont utilisés comme hôtes expérimentaux. La partie larvaire du cycle se déroule chez des Mollusques Gastéropodes pulmonés, de la famille des Planorbidés, en particulier chez *Australorbis (Biomphalaria) glabratus*. Pour que la lutte contre les Bilharzioses soit menée de façon aussi spécifique que possible, il est nécessaire que nos connaissances sur la biologie et le comportement tant du parasite que de son hôte intermédiaire progressent encore. A côté des indispensables recherches sur le terrain, les études cytogénétiques et physiologiques s'imposent de plus en plus.

I. — Cultures de Schistosomes adultes

Le premier travail connu sur ce sujet est celui de Lee et Chu (1935) qui maintinrent en survie des adultes de *S. japonicum* pendant 82 jours dans du sérum de lapin ou du liquide d'ascite renouvelé tous les 8 ou 15 jours (cité *in* Silverman, 1965).

Par la suite, de nombreux auteurs, principalement nord-américains, mirent au point divers milieux [revue *in* Silverman (1965) et Silverman et Hansen (1971)]. Schématiquement, ces milieux sont composés d'une solution saline tamponnée et isotonique au plasma des Vertébrés, dans laquelle sont ajoutés, en proportions variables, des acides aminés, des vitamines et du glucose. Un apport nutritif supplémentaire est assuré par des sérums animaux et des extraits embryonnaires de poulet ou de bœuf. L'addition d'antibiotiques et d'antifongiques est utile contre la surinfection microbienne et mycosique.

Les plus intéressants de ces travaux nous semblent être ceux de Senft et Weller (1956), de Robinson (1960), de Senft et Senft (1962) et de Clegg (1965). Ce dernier, en particulier, a pu obtenir la croissance des schistosomules de *S. mansoni* et leur transformation en adultes, bien différenciés sexuellement mais stériles, au bout de six semaines. Ces auteurs utilisaient des appareillages complexes permettant une circulation continue du liquide nutritif et une phase gazeuse enrichie de 5 % de CO₂.

II. — Cultures en anaérobiose

En 1967, nous avons utilisé le milieu suivant (Bazin et Lancaster, 1967) :

— solution de Hanks	40 à 45 %
— milieu 199 de Morgan, Morton et Parker	40 à 45 %
— sérum de poulain ou de veau	20 à 10 %
— hématies lavées de lapin	5 %
— glucose	2 à 3 g
— pénicilline	200 U.I./ml
— streptomycine	200 U.I./ml
— amphotéricine B	0,005 mg/ml

Ensuite, les proportions d'antibiotiques furent portées à 1.000 UI/ml.

Les vers tirés du système porte de hamsters infestés depuis deux mois étaient alors lavés à plusieurs reprises dans une solution physiologique stérile tiède, additionnée d'antibiotiques, puis mis en culture dans des flacons d'Erlenmeyer gardés à 37 °C.

Nous avons voulu vérifier la capacité de survie des Schistosomes et d'autres Trématodes dans un milieu à basse teneur en O₂. Cette possibilité fut affirmée en 1950 par Ross et Bueding (*in* Silverman, 1965) qui maintinrent des Schistosomes en survie pendant cinq jours dans un milieu liquide sous atmosphère d'azote pur. Dans notre expérimentation, la protection contre l'oxygène de l'air fut assurée sim-

plement par la présence d'une couche d'huile de paraffine stérile au-dessus du milieu de culture. Le renouvellement du milieu se faisait par siphonage et apport de milieu nouveau une fois par semaine.

Dans ces conditions, la survie de *Schistosoma mansoni*, de la petite Douve (*Dicrocoelium dendriticum*) et aussi du Cestode *Hymenolepis nana* a été obtenue pendant des durées variant de trois à six semaines. Mais toutes les tentatives faites avec *Trichinella spiralis* et d'autres Nématodes se sont soldées par des échecs. Ce fait n'a rien d'anormal puisque la vie aérobie serait la règle chez les Nématodes (Smith, 1969). Les individus mis en culture gardaient leur mobilité pendant cette période et, en ce qui concerne les Trématodes, s'alimentaient normalement de globules sanguins. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Bénex (1966) avec *Fasciola hepatica* et *Dicrocoelium dendriticum*.

L'étude histologique des Schistosomes ainsi cultivés montre des cellules tégmentaires et mésenchymateuses en bon état, la lumière des caeca digestifs étant fortement dilatée, mais leur revêtement normal. Cependant, dans les deux sexes, les gonades et, chez les femelles les glandes vitellogènes, entrent bientôt en dégénérescence et on ne constate pas la présence d'œufs dans les cultures.

Diverses modifications portant sur la composition du liquide de base, les proportions de glucose ou de sérum de poulain, n'ont pas entraîné d'améliorations notables dans la durée de survie.

III. — Cultures sur des cellules en lignées continues

Devant ces résultats nous avons alors tenté le maintien en survie de Schistosomes adultes sur des cultures de cellules KB ou HeLa entretenues en lignée continue (1971).

Les cellules sont fournies par l'Institut Pasteur et entretenues sur des boîtes de Roux selon le protocole habituel (Cassagne, 1966). Le milieu nutritif est le suivant :

— hydrolysate de caséine	80 %
— sérum de poulain	20 %
— glucose	1,4 g pour 1.000
— pénicilline	1 000 U.I./ml
— colimycine	1 000 U.I./ml
— amphotéricine B (Fungizone)	0,005 mg/ml

Le pH se situe à 7,4 et la température des cultures est de 38 °C avec une tolérance de variation de plus ou moins 1 °C.

Les Schistosomes sont recueillis par perfusion du système porte de souris infestées depuis au moins six semaines et, après plusieurs lavages dans le liquide nutritif, placés à raison de 10 à 50 individus dans les flacons de Roux fermés par des bou-

chons de caoutchouc. Le milieu liquide est totalement renouvelé tous les huit jours. Les résultats obtenus par cette méthode de culture sont supérieurs à ceux de la précédente technique. C'est ainsi que le nombre de vers morts en cours d'expérimentation est faible (de 10 % pour certains lots à 25 % pour d'autres, ces chiffres donnés par mois de culture). Les vers morts se reconnaissent facilement à leur aspect rigide et à leur coloration blanchâtre. Ils sont rapidement englobés dans des amas de cellules de culture, formant ainsi de véritables « pseudogranulomes » *in vitro*. L'examen des vers vivants nous incite à penser que les Schistosomes utilisent les cellules en culture de la même manière qu'ils le faisaient pour les hématies du milieu décrit en 1967 (1).

La durée totale de l'expérimentation a été de 120 jours. A cette date nous avons encore une demi-douzaine de vers en culture dans un flacon, les autres ayant été retirés pour examen ou fixation dans du Bouin ou encore perdus par souillure des flacons de culture lors des manipulations hebdomadaires.

Par ce procédé nous avons également cultivé des grandes Douves (*Fasciola hepatica*) pendant 60 jours et des *Dicrocoelium dendriticum* pendant 105 jours, mais avec des changements de milieu bi-hebdomadaires.

Pour ce qui concerne *Schistosoma mansoni*, les premières constatations histologiques montrent un aspect absolument normal des structures cellulaires. Nous avons constaté la présence de pontes au-delà de la deuxième semaine après la mise en culture, mais le contenu des œufs était inorganisé et grisâtre. Les caeca digestifs, parfois emplis d'une substance granuleuse et amorphe, peuvent présenter un aspect « soufflé » déjà observé dans les cultures en anaérobiose.

La section des vers juste en arrière de la ventouse ventrale entraîne la suppression de l'intestin antérieur et la rapide formation d'un bourrelet cicatriciel bien visible à la loupe et obturant la nouvelle extrémité du système digestif. Les vers ainsi mutilés gardent une mobilité normale pendant au moins 30 jours, mais le taux de mortalité ou de destruction par les cellules en culture est très supérieur à celui constaté chez les vers entiers. Les aspects histologiques sont, par contre, analogues, sauf pour les gonades où les signes de dégénérescence sont nets dès le huitième jour après la section. Les recherches sur le rôle du système nerveux central de *S. mansoni* dans le maintien des structures des glandes sexuelles sont poursuivies par l'un de nous.

Il existe dans la littérature des travaux importants consacrés à la fonction d'absorption des téguments des Trématodes. Les substances nutritives, en particulier le glucose, peuvent être absorbées activement par voie transtégumentaire chez *Fasciola hepatica* (Stephenson, 1947, Rohrbacher, 1957, Mansour, 1959, Bjorkman et Thorsell, 1964). Chu (1938) et Senft et Weller (1956) ont constaté la survie *in vitro* de fragments de Schistosomes pendant plusieurs semaines. Pour Senft et coll. (1961) les images du tégument, au microscope électronique, suggèrent très fortement cette fonction d'absorption. Robinson (1961) a établi la présence de phosphatases acide et alcaline dans le tégument de *S. mansoni* et a lié cette présence au transport actif des

(1) Dans une nouvelle série actuellement en cours (octobre 1972), de nombreux œufs, mais non embryonnés ou contenant des embryons importants, sont récupérés après 15 jours de culture, avec un changement bi-hebdomadaire du milieu nutritif.

hexoses. Les téguments sont même la seule partie du corps du ver où prédomine la phosphatase alcaline [Nimmo-Smith et Standen (1963)].

Pour Smyth (1966), la structure cytoplasmique du tégument et du tube digestif chez les Douves et les Schistosomes implique une fonction d'absorption, mais aussi de sécrétion.

L'intérêt que peut présenter la méthode des cultures *in vitro* vient d'être renforcé par les récents travaux de Terry et coll. (1971) qui ont démontré que les Schistosomes pouvaient acquérir les antigènes de leurs hôtes. Ils apportent ainsi une confirmation expérimentale originale à l'hypothèse de Capron, Biguet et coll. (1968) selon laquelle les Schistosomes synthétiseraient des antigènes imitant les macromolécules de leurs hôtes. Là encore, ce sont les téguments qui sont en cause. L'analyse *in vitro* pourra se révéler très utile pour les études et la compréhension des mécanismes immunologiques mis en jeu.

Bibliographie

- BAZIN (J.-C.) et LANCASTRE (F.), 1967. — Méthode générale de culture d'Helminthes en anaérobiose. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, CCLXIV, 2907-2908.
- BENEX (J.). — Les possibilités de la culture organotypique en milieu liquide dans l'étude des problèmes parasitaires. III. Le maintien en survie *in vitro* de *Fasciola hepatica* et de *Dicrocoelium lanceolatum*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, LIX, 99-106.
- BJORKMAN (N.) et THORSELL (W.), 1964. — On the fine structure and resorptive function of the inside of the liver fluke, *Fasciola hepatica* L. *Expl. Cell. Res.*, XXXIII, 319-329.
- CASSAGNE (H.), 1966. — *Milieux de culture*. Collect. « Techniques de base », édit, La Tourelle, 94160 St-Mandé, 379 pp.
- CAPRON (A.), BIGUET (J.), VERNES (A.) et AFCHAIN (D.), 1968. — Structure antigénique des Helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Path. et Biol.*, XVI, p. 121-138.
- CHU (H. J.), 1938. — Certain behavior reactions of *Schistosoma japonicum* and *Clonorchis sinensis*. *Chin. Med. J.*, suppl. 2, 411-417.
- CLEGG (J. A.), 1965. — *In vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni*. *Expl. Parasit.*, XVI, 133-147.
- LANCASTRE (F.) et BAZIN (J.-C.), 1971. — Culture *in vitro* de *Schistosoma mansoni* (Trématode Distomien) sur des cellules en lignée continue. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, CCLXXIII, 2279-2280.
- MANSOUR (T. E.), 1959. — Studies on the carbohydrate metabolism of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Biochem. Biophys. Acta*, XXXIV, 456-464.
- NIMMO-SMITH (R. H.) et STANDEN (O. D.), 1963. — Phosphomonoesterases of *Schistosoma mansoni*. *Expl. Parasit.*, XIII, 305-322.
- ROBINSON (D. L. H.), 1960. — Egg-laying by *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, LIV, 112-114.
- , 1961. — Phosphatases in *Schistosoma mansoni*. *Nature, London*, CXCI, 473-474.

- ROHRBACHER jr. (G. H.), 1957. — Observations in the survival *in vitro* of bacteria free adult common liver fluke, *Fasciola hepatica* (Linné, 1758). *J. Parasit.*, XLIII, 9-18.
- SENFT (A. W.), PHILPOTT (D. E.) et PELDFSKY (A. H.), 1961. — Electron microscope observations of the integument, flame cells, and gut of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.*, XLVII, 217-229.
- et SENFT (D. G.), 1962. — A chemically defined medium for maintenance of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.*, XLVIII, 551-554.
- et WELLER (T. H.), 1956. — Growth and regeneration of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, XCIII, 16-19.
- SILVERMAN (P. H.), 1965. — *In vitro* cultivation procedures for parasitic helminths. *Advances in Parasitology* (edit. Ben Dawes), III, 159-222, Academic Press, London, New York.
- et HANSEN (E. L.), 1971. — *In vitro* cultivation procedures for parasitic helminths, recent advances. *Advances in Parasitology* (édit. Ben Dawes), IX, 227-258.
- SMITH (M. S.), 1969. — Do intestinal parasites require oxygen? *Nature, London*, CCXXIII, 1129-1132.
- SMYTH (J. D.), 1966. — *The physiology of Trematodes*, W. H. Freeman and Co., San Francisco.
- STEPHENSON (W.), 1947. — Physiology and histochemical observations on the adult liver fluke, *Fasciola hepatica* L. (Parts I-II-III-IV). *Parasitology*, XXXVIII, 116-144.
- TERRY (R. J.), SMITHERS (S. R.) et CLEGG (J. A.), 1971. — Studies on the acquisition of « host-like » antigens by Schistosomes. *1^{er} Multicolloque Européen Parasitol.*, Rennes, France, 1-4 sept. 1971.
-