

**ÉTUDE DE SYSTÈMES DE CULTURE
POUR LA PRODUCTION DES FORMES PROMASTIGOTES
ET AMASTIGOTES DES LEISHMANIES**

**Application au diagnostic sérologique
et aux essais thérapeutiques**

I. VOULDOUKIS*, C. ALFRED*, L. MONJOUR*, D. MAZIER*, O. BRANDICOURT*,
I. PLOTON*, Y. TSELENTIS**, K. K. NZUZI* et M. GENTILINI*

RÉSUMÉ. Plusieurs espèces de leishmanies et trois systèmes de culture : monophasique, biphasique et co-culture, ont été utilisés dans une étude comparative portant sur la production intensive des leishmanies. Par ailleurs, un nouveau modèle, *in vivo*, comportant, d'une part, l'injection à la souris BALB/c de cellules sarcomateuses et de formes promastigotes, d'autre part, une extraction à travers un gradient de Radioselectan, a permis d'obtenir des isolats de formes amastigotes hautement purifiés. L'utilisation des deux antigènes : formes promastigotes et amastigotes est à préconiser pour le diagnostic sérologique, par immunofluorescence indirecte, du Kala-Azar. Enfin, le nouveau modèle, *in vivo*, est à valoriser pour la recherche de nouvelles molécules actives contre les leishmanies.

A study of methods of cultivation for the production of promastigote and amastigote forms of Leishmania. (Their application to serological diagnosis and therapeutic trials)

SUMMARY. Several species of leishmania and three methods of cultivation : monophasic, biphasic and co-cultivation were used in a compared study bearing on the intensive production of leishmania. In addition by applying, a new *in vivo* model, comprising an injection of sarcomatous cells and promastigotes into BALB/c mice and also an extraction on a discontinuous gradient (Radioselectan® 60 %), it was possible to obtain highly purified isolates of amastigote forms. The use of two antigens : promastigotes and amastigotes, is to be recommended for the serological diagnosis, by indirect immunofluorescence, of Kala Azar. The new *in vivo* model merits further consideration for research concerning new molecules active against leishmania.

* Service de Parasitologie et Médecine tropicale, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47 bd de l'Hôpital, F 75651 Paris Cedex 19.

** Laboratoire de Parasitologie, Hôpital Laïkon Gaudi, Athènes (Grèce).

Accepté le 14 mars 1985.

Introduction

Une vingtaine de milieux de culture, favorables à la multiplication des formes promastigotes de leishmanies, ont été proposés depuis le début du siècle (cf. : Marin et coll., 1982). La plupart, comme le milieu NNN classique (Novy et Mac Neal, 1904 ; Nicolle, 1908), contient de la gélose, du sang ou des protéines apparentées aux hémoglobines. En raison de leur contamination par des débris solides, on doit leur préférer, aujourd'hui, des milieux monophasiques liquides dont nous présentons un nouvel exemple. Ils permettent d'obtenir une multiplication rapide de formes promastigotes convenant particulièrement aux études biochimiques et à la réaction d'immunofluorescence indirecte.

Si la production des formes amastigotes *in vitro* a été signalée (Hendricks et coll., 1978), en fait, elle n'est réellement privilégiée que par un système de co-culture (Chang, 1978 ; Chang, 1980 ; Murray, 1981) ou encore une méthode de culture *in vivo* qui développe le cycle complet du parasite (Monjour *et al.*, 1984).

En utilisant divers procédés de développement du parasite, nous avons tenté de montrer l'intérêt du choix de deux antigènes (promastigotes et amastigotes) pour le diagnostic sero-immunologique du Kala-Azar ; en outre, le test *in vivo* a permis de vérifier l'efficacité thérapeutique d'un médicament classique antileishmanien vis-à-vis des formes amastigotes.

Matériel et méthodes

ESPÈCES DE LEISHMANIES

Diverses espèces de leishmanies de l'Ancien et du Nouveau Monde ont été utilisées pour les essais de culture *in vitro* et *in vivo*. Elles comprenaient *Leishmania brasiliensis guyanensis* (L.b.g.), *Leishmania donovani* (L.d.), *Leishmania infantum* (L.i.) désignées LEM 311, LEM 139 et LEM 497 (Collection de Montpellier). Secondairement, l'isolat de *Leishmania infantum* LEM 497 a été réservé au diagnostic sero-immunologique de la leishmaniose viscérale. Les essais thérapeutiques ont été réalisés en choisissant ce même isolat.

MILIEUX DE CULTURE

L'étude comparative de la multiplication des formes promastigotes, *in vitro*, a été effectuée après décongélation des parasites conservés à -80° C dans une solution de RPMI + 20 % de sérum de veau foetal et 0,2 ml de DMSO (volume global = 1 ml). Elle a permis de tester trois milieux de culture.

Le premier, de type NNN (Novy et Mac Neal, 1904 ; Nicolle, 1908), comprenait

une gélose au sang humain (6 ml d'un mélange : Bacto Heart Infusion - Lab Difco (42 g/l) ; Agar - Lab Difco (15 g/l) et sang humain hémolysé groupe 0 (1 ml), coulée en pente dans des tubes 14 × 1,5 cm. On ajoutait dans la partie déclinée 3,5 ml de sérum physiologique, des antibiotiques (1 000 U.I. de pénicilline et 1 mg de streptomycine/ml) et $3,5 \times 10^6$ leishmanies décongelées à la température ambiante.

Le second contenait 3,5 ml de milieu de Parker 199 (Gibco-Europe) enrichi de 20 % de sérum de veau fœtal (SVF).

Enfin, le troisième était composé de 3,5 ml de milieu RPMI 1640 (Gibco-Europe) comportant 20 % de sérum humain fœtal (S.H.F.), disponible à partir d'un sang de cordon ombilical recueilli 30 minutes, au plus tard, après le post-partum. Des concentrations d'antibiotiques et de parasites analogues aux précédentes étaient déposées dans ces deux derniers milieux.

SYSTÈME DE CO-CULTURE « IN VITRO »

A titre comparatif, un système de co-culture *in vitro*, expérimenté par Chang (1980) pour la production des formes amastigotes, était développé pour la culture intensive des formes promastigotes de leishmanies. Ainsi à $2,5 \times 10^6$ macrophages de souris (lignée cellulaire J 774 G 8), déposés dans 1 ml de milieu RPMI 1640 enrichi de 20 % de sérum de veau fœtal décomplémenté + 25 m M de tampon HEPES, étaient ajoutés $3,5 \times 10^5$ promastigotes (*L. infantum* LEM 497 ou *L. donovani* LEM 139), décongelés à température ambiante. Les cultures, d'un volume total de 10 ml, étaient réalisées dans des flacons Falcon (50 ml) et maintenues, comme les milieux précédents, à 22° C.

La multiplication parasitaire *in vitro*, suivie dans le temps, était déterminée dans toutes les expériences (cultures ou co-cultures), à partir de 6 tubes ou flacons de milieux. Le nombre de formes promastigotes était recherché à la cellule de Thoma.

SYSTÈME DE CULTURE « IN VIVO »

La culture *in vivo* avait pour objectif d'obtenir une production massive de formes amastigotes par un artifice expérimental et en sélectionnant plusieurs modèles animaux. Elle était assurée par une lignée de cellules sarcomateuses (Sartorelli et Both, 1961) dénommée « TG 180 » (Couzineau et Baufine-Ducrocq, 1969), qui convient habituellement à la multiplication des toxoplasmes. Aux études préliminaires (Monjour et coll., 1984), comportant l'utilisation de 4×10^6 cellules sarcomateuses pour 2×10^6 formes promastigotes, il a été confronté les rapports suivants cellules-parasites (*L. infantum* LEM 497) $10^3/10^2$, $10^3/10^6$, $10^4/10^4$, $10^4/10^6$. Après centrifugation à 1 600 g/10 min chaque mélange était injecté en sérum physiologique (0,4 ml/animal) et par voie intrapéritonéale à des séries de 3 animaux : souris Swiss, BALB/c (Établissement Charles Rivers), A/J et CBA (Établissement Iffa-Credo) rats Wistar/Lewis Cobs (Et. Charles Rivers), hamsters (*Mesocricetus auratus*) et merions (*Meriones unguiculatus*).

Dix jours après l'injection, 5 ml de liquide d'ascite, en cas d'infection positive,

étaient aspirés à la seringue. Après 3 lavages par centrifugation, à 1 600 g pendant 10 minutes, le culot de formes amastigotes était remis en suspension dans 1 ml de sérum physiologique. Une goutte de 10 μ l était déposée sur 5 lames, étalée en frottis mince et colorée au May-Grünwald-Giemsa. Le nombre moyen de parasites intra- et extracellulaires était estimé par une lecture, à l'immersion (objectif \times 100), de 100 champs microscopiques/lame.

RÉACTIONS D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

La possibilité d'obtenir des formes amastigotes purifiées, après broyage des macrophages de souris J 774 G8 (Chang, 1980) ou des cellules sarcomateuses infectées, suivi d'un passage à travers un gradient de Radioselectan (Monjour et coll., 1984), permettait de comparer par rapport aux formes promastigotes, leur qualité antigénique lors de la réaction d'Immunofluorescence Indirecte (I.F.I.). Cette technique classique (Monjour et coll., 1978), utilisant, comme antigène, un isolat de *L. infantum* LEM 497, ne comportait aucune originalité, se ce n'est l'absence de fixation par l'acétone des amastigotes sur les lames tests. 10 sérums de malades, d'origine méditerranéenne et atteints de leishmaniose viscérale (confirmation parasitologique), ont été examinés au cours de cette étude comparative. Une autre technique, l'immuno-électrodifusion sur membrane d'acétate de cellulose (Monjour et coll., 1978) permettait une interprétation plus systématique des résultats.

ÉPREUVES THÉRAPEUTIQUES

Des épreuves thérapeutiques ont tenté d'évaluer l'effet antileishmanien du Glucantime (R) dans le modèle de référence décrit précédemment (Monjour et coll., 1984). 4×10^6 cellules sarcomateuses « TG 180 » et 2×10^6 formes promastigotes (*L. infantum* LEM 497) étaient injectées par voie intrapéritonéale à la souris BALB/c. 3 jours après l'infection (J3), la présence de formes amastigotes était confirmée par un prélèvement à la seringue du liquide d'ascite. Après 5 jours d'évolution (J5) des parasites *in vivo*, 3 schémas de traitement, fondés sur des propositions antérieures (Trotter et coll., 1980a ; Trotter et coll., 1980b ; Peters et coll., 1980), étaient appliqués. Ils comportaient des injections quotidiennes, par voie sous-cutanée, de 60 (groupe I), 120 (groupe II) ou 400 mg/kg (groupe III) de Glucantime. L'efficacité du traitement était analysée sur des séries de 5 animaux, quinze jours après l'infection. 5 souris non traitées, recevant 4×10^6 cellules sarcomateuses et 2×10^6 formes promastigotes servaient de contrôle.

Résultats

RENDEMENT DES DIFFÉRENTS SYSTÈMES DE CULTURE ET CO-CULTURE « IN VITRO »

Si l'on considère le rendement des 3 types de culture à J20 (*tableau I*), il est indiscutable que le milieu de Parker 199 + SVF assure la meilleure production de

TABLEAU I. — Développement de 3 espèces de leishmanies dans 3 milieux de culture (* millions de parasites/ml). Après J12, la densité parasitaire dans le milieu de Parker 199 est particulièrement élevée. Une différence significative ($p < 0,001$), par rapport aux deux autres milieux, est obtenue par le test U. Mann Whitney.

Jours		Espèces		
		L. brasiliensis guyanensis L E M 311	L. donovani L E M 139	L. infantum L E M 497
J4	NNN	1,10*	1,25	1,50
	P. 199	1,30	1,37	1,90
	RPMI	1,25	1,32	1,80
J8	NNN	3,40	3,70	4
	P. 199	5,20	6,30	6,80
	RPMI	4,90	5,10	6,40
J12	NNN	6,20	6,80	7,50
	P. 199	8,10	9,40	9,90
	RPMI	7,10	7,65	8,10
J14	NNN	7,10	7,70	8,80
	P. 199	9,90	10,40	11,80
	RPMI	8,10	8,50	9,60
J20	NNN	7,60	7,90	9,50
	P. 199	12,50	14,20	15,60
	RPMI	10,20	11,70	13,30

NNN : Milieu de type NNN

P. 199 : Milieu de Parker 199 + SVF

RPMI : Milieu RPMI + SHF.

formes promastigotes. Le mélange RPMI et sérum humain fœtal, particulièrement favorable au développement des stades intra-érythrocytaires de *Plasmodium falciparum* (Druilhe et coll., 1983), ne joue pas un rôle déterminant sur la multiplication des parasites. Quelle que soit l'espèce de leishmanie sélectionnée, il apparaît que le nombre moyen de formes promastigotes, est toujours relativement faible en milieu NNN.

En revanche, le système de co-culture est remarquable, pouvant assurer un rendement moyen de 30×10^6 parasites extracellulaires/ml en quatre jours. On a pu noter, cependant, une différence extrême de 4×10^6 formes promastigotes/ml en faveur de la première espèce, en comparant l'évolution de *L. infantum* (LEM 497) et de *L. donovani* (LEM 139).

AMÉLIORATION ET SPÉCIFICITÉ DE LA PRODUCTION DES FORMES AMASTIGOTES « IN VIVO »

La culture *in vivo*, visant à obtenir une production massive de formes amastigotes dans la cavité péritonéale de la souris BALB/c est favorisée par le choix des rapports cellules sarcomateuses-promastigotes = $10^4/10^4$ et $10^4/10^6$. Le nombre

moyen de formes amastigotes de *L. infantum* LEM 497/champ microscopique — calculé à partir des séries de 3 animaux — dix jours après l'infection, est alors respectivement de 4 800 et 8 600.

Des résultats comparables peuvent être observés en utilisant des souris BALB/c et A/J ; en revanche, les autres animaux d'expérience = souris Swiss, CBA, rats, hamsters et mérions ne sont pas favorables au développement intrapéritonéal des parasites injectés.

VALEUR COMPARATIVE DES TESTS D'IMMUNOFLUORESCENCE

Les formes amastigotes, isolées par passage à travers un gradient de Radio-sélectan, conviennent, autant que les formes promastigotes, au dépistage par I.F.I. de la leishmaniose viscérale. Mais les résultats apparaissent variables. Vis-à-vis des antigènes amastigotes et promastigotes de *L. infantum*, les titres d'anticorps de 7 sérums de malades sont respectivement $\geq 1\ 600$ et ≤ 800 , et vice versa pour les 3 autres sérums. La présence d'une leishmaniose immunologique a été, par ailleurs, confirmée, pour l'ensemble des échantillons par la technique d'immunoélectrodiffusion.

ÉVALUATION DES ÉPREUVES THÉRAPEUTIQUES

Enfin, le modèle proposé pour les essais thérapeutiques permet de constater que, seules, les doses de 400 mg/kg/jour de Glucantime s'avèrent constamment létales pour les leishmanies (*L. infantum*). A 60 et 120 mg/kg/jour, le nombre de formes amastigotes est respectivement de 50 à 70 % inférieur à celui observé au cours de l'infection expérimentale, non traitée.

Discussion

Les deux milieux de culture, supplémentés par du sérum de veau ou du sérum humain fœtal, peuvent être utilisés pour la production massive de formes promastigotes ; cependant, d'autres milieux paraissent aussi, sinon plus, performants (Marin et coll., 1982). Un large choix est donc proposé à l'utilisateur, mais il faut retenir que les cultures monophasiques, sans contaminants solides (gélose, hématies), sont plus adaptées à l'obtention de parasites convenant, notamment, aux études biochimiques.

Si l'on désire procéder à l'isolement des antigènes somatiques des formes promastigotes ou à des travaux de biogénétique, qui requièrent des dizaines de millions de protozoaires, il apparaît judicieux de retenir le système de co-culture, car il permet d'obtenir des rendements maxima (30×10^6 parasites/ml) en quatre jours. A 22° C, les formes promastigotes sont rassemblées autour des macrophages de souris, partie postérieure touchant la membrane. Cet aspect entraîne à envisager que la lignée

cellulaire joue un rôle dans leur nutrition. Les leishmanies se développent rapidement mais une plus faible concentration est observée, dans notre expérience, avec *L. donovani*.

Grâce au pouvoir de séparation des gradients de Radiosélectan, l'isolement des formes amastigotes est réalisé, sans contaminants cellulaires, quel que soit leur mode de production : à 37° C selon la méthode de Chang (1980) ou dans notre système de culture *in vivo* (Monjour et coll., 1984).

Plusieurs procédés d'extraction ont déjà été proposés utilisant des colonnes de cellulose (Brazil, 1978), des centrifugations en gradient de Percoll (Walter et coll., 1978 ; Chang, 1980) ou en Percoll-sucrose (Hart et coll., 1981) et bien d'autres modalités (Alexander et Vickerman, 1975 ; Childs et coll., 1976 ; Infante et coll., 1980). Mais la plupart ne présentent pas les avantages de la technique rapportée : simplicité, rapidité, coût négligeable et recueil d'un produit hautement purifié.

Les formes amastigotes s'avèrent infectieuses après extraction sur gradient de Radiosélectan, mais elles ne se multiplient pas dans la cavité péritonéale de divers rongeurs. Rats, hamsters et mérions ne sont pas favorables au développement des cellules sarcomateuses et, par conséquent, des parasites injectés. Chez les souris, les infections abortives pourraient s'expliquer par des considérations génétiques (Bjorvatn et Neva, 1979 ; Bradley, 1977 ; Bradley et Kirkley, 1977 ; Cox, 1981).

Les formes amastigotes isolées, à condition d'éviter la fixation sur lames par l'acétone, qui entraîne de fausses réactions positives, conviennent au diagnostic sérologique de la leishmaniose viscérale. Une étude complémentaire permettra de déterminer si, réellement, le choix de 2 antigènes (promastigotes et amastigotes) permet d'améliorer la fiabilité de l'immunofluorescence indirecte. La même question se pose pour les leishmanioses tégumentaires, au diagnostic sérologique rarement positif lors de l'évolution des lésions.

Enfin, en raison de sa simplicité et du court délai de réponse (12-15 jours), le modèle de culture *in vivo* doit retenir l'attention dans le cadre des tests d'efficacité thérapeutique. Il y a là, un système à valoriser pour déterminer l'intérêt de nouvelles molécules actives contre les leishmanies, qui font, on le sait, cruellement défaut.

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXANDER J., VICKERMAN K. : Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J. Protozool.*, 1975, 22, 502-508.
- BJORVATN B., NEVA F. A. : A model in mice for experimental leishmaniasis with a West African strain of *Leishmania tropica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1979, 28, 472-479.
- BRADLEY D. J., KIRKLEY J. : Regulation of *Leishmania* population within the host : I. The variable course of *Leishmania donovani* infection in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 1977, 30, 119-129.
- BRADLEY D. J. : Regulation of *Leishmania* population within the host : II. Genetic control of acute susceptibility of mice to *Leishmania donovani* infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 1977, 30, 130-140.
- BRAZIL R. P. : Isolation of the intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis* using cellulose column. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1978, 72, 579-580.
- CHANG K. P. : Intracellular multiplication of *Leishmania donovani* during repeated passages in primary cultures of hamster peritoneal macrophages. *J. Parasitol.*, 1978, 64, 931-933.
- CHANG K. P. : Human cutaneous leishmaniasis in a mouse macrophage line : Propagation and isolation of intracellular parasites. *Science*, 1980, 209, 1240-1242.

- CHILDS G. E., MC ROBERTS M. J., FOSTER K. A. : Partial purification of amastigotes from cutaneous lesions of american leishmaniasis. *J. Parasitol.*, 1976, 62, 676-679.
- COUZINEAU P., BAUFINE-DUCROCQ H. : Étude des possibilités d'utilisation du sarcome TG 180 de la souris. Application à la toxoplasmose. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1969, 44, 217-244.
- COX F. E. G. : Leishmaniasis and mouse genetics. *Nature*, 1981, 291, 111-112.
- DRUILHE P., MAZIER D., BRANDICOURT O., GENTILINI M. : One-step plasmodium falciparum cultivation. Application to *in vitro* drug testing. *Tropenmed. Parasit.*, 1983, 34, 233-234.
- HART D. T., VICKERMAN K., COOMBS G. H. : A quick, simple method for purifying *Leishmania mexicana* amastigotes in large numbers. *Parasitology*, 1981, 82, 345-355.
- HENDRICKS L. D., WOOD D. E., HAJDUK M. E. : Haemoflagellates : commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology*, 1978, 76, 309-316.
- INFANTE R. B., HERNANDEZ A. G., RIGGIONE F., DAWIDOWICZ K. : A new method for the partial purification of leishmania amastigotes from cutaneous lesions. *Parasitology*, 1980, 80, 105-112.
- MARIN F., GARCIA DE LOMAS J., PENARRUBIA M. P. G., PENALVER J. : Cultivation of *Leishmania* : comparison of different media for promastigote cultivation. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1982, 70, 607-613.
- MONJOUR L., VOULDOUKIS I., BRANDICOURT P., MAZIER D., ALFRED C., PLOTON I., GENTILINI M. : Rapid, large-scale production and isolation for *Leishmania* amastigotes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1984, 78, 423-425.
- MONJOUR L., MILLE C., DRUILHE P., GENTILINI M. : Application de l'immunoélectrodifffusion sur membrane d'acétate de cellulose du diagnostic de la leishmaniose viscérale humaine et canine. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 1978, 18, 293-300.
- MURRAY H. : Susceptibility of *Leishmania* to oxigen intermediates and killing by normal macrophages. *J. Exp. Med.*, 1981, 153, 1302-1315.
- NICOLLE CH. : Culture du parasite du bouton d'Orient. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 1908, 146, 842-843.
- NOVY F. G., MAC NEAL W. J. : On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J. Inf. Dis.*, 1904, 1, 1-30.
- PETERS W., TROTTER E. R., ROBINSON B. L. : The experimental chemotherapy of leishmaniasis V. The activity of potential leishmanicides against *L. infantum* L.V9 in NMR1 mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1980, 74, 289-298.
- SARTORELLI A. C., BOTH B. A. : *Fed. Proc.*, 1961, 20, 156-159.
- TROTTER R., PETERS W., ROBINSON B. L. : The experimental chemotherapy of leishmaniasis IV. The development of a rodent model for visceral infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1980, 74, 127-138.
- TROTTER R., PETERS W., ROBINSON B. L. : The experimental chemotherapy of leishmaniasis VI. The development of rodent models for cutaneous infection with *L. major* and *L. mexicana amazonensis*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1980, 74, 299-319.
- WALTER R. D., BUSE E., EBERT F. : Effect of cyclic AMP on transformation and proliferation of *Leishmania* cells. *Tropenmed. Parasitol.*, 1978, 29, 439-442.