

ARTICLES ORIGINAUX

Culture de *Trypanosoma congolense* Broden 1904 en milieu diphasique en vue de la préparation d'un antigène

par J.-P. BERSON

RÉSUMÉ

Dans le but de cultiver *Trypanosoma congolense*, l'auteur propose un milieu de culture diphasique, composé d'une gélose nutritive au sang total de lapin comme base, et d'une solution de chlorure de sodium comme phase liquide. Les parasites sont ensuite récoltés. On prélève d'abord le surnageant, puis la surface de la base est lavée avec une solution de Hank modifiée. Le liquide de lavage est mélangé au surnageant. Après concentration et purification la suspension de Trypanosomes est utilisée comme antigène pour des études immunologiques.

Les nombreux travaux et essais relatifs à la culture des *Trypanosomidae* ainsi que les difficultés rencontrées dans ce domaine sont connus de tous. Un récent travail (JADIN et WERY, 1963) a suffisamment précisé la question pour qu'il ne soit pas nécessaire d'y revenir.

En ce qui concerne plus particulièrement l'espèce *congolense* il convient de signaler les observations de TOBIE (1958) et de LEHMANN (1961).

La culture de souche de Trypanosomes est effectuée dans deux buts distincts :

1° Pour porter un diagnostic : on pratique alors une simple hémoculture.

2° Pour faire des études immunologiques ; il faut alors pouvoir produire un volume de culture relativement important ce qui nécessite de nombreux repiquages.

Cette première note est destinée à exposer une méthode ayant permis d'obtenir une suspension de parasites suffisante pour pouvoir servir d'antigène.

Soulignons que, les corps trypanosomiens de l'espèce *congolense* utilisés pour des études immunologiques ont toujours jusqu'à maintenant été isolés du sang d'animaux parasités et jamais de cultures.

Nous pensons donc que cette manière de produire un antigène à partir de culture sans être tout à fait originale, présente cependant un réel avantage sur la production de corps trypanosomiens à partir d'un sang parasité.

Dans l'exposé qui suit il n'est pour l'instant question, que de cultures en tubes. Les modifications apportées à la technique pour obtenir des volumes de culture beaucoup plus importants feront l'objet d'une note ultérieure.

I. — Matériel et méthodes

1° Souche.

La souche de *Trypanosoma congolense* mise en culture a été isolée d'un bœuf trypanosomé de la station de Bewiti (*).

Elle a été immédiatement passée sur cobayes, rats et souris. Les hémocultures sont faites à partir de sang de rats et de souris parasités, prélevé par ponction cardiaque.

2° Milieu.

Le milieu diphasique utilisé dans cette expérimentation est composé d'une base solide et d'une phase liquide. Le rapport de volume des deux composants est 10/2 ou 10/3.

La composition de la base est la suivante :

Gélose nutritive Biolyon	11,5 g
Chlorure de Sodium	2,5 g
Sang total de lapin	50 ml
Bicarbonate de Sodium q. s. p. Ph.	7,2
Eau distillée	500 ml

La composition de la phase liquide est :

Chlorure de Sodium	4,5 g
Tréhalose ou Glucose	2,5 à 5 g
Bicarbonate de Sodium q. s. p. Ph.	7,2
Eau distillée	500 ml
Pénicilline	5 millions U.
Dihydrostreptomycine	7,5 g

(*) Centre d'expérimentation sur les Trypanosomiasés animales situé à 60 km à l'ouest de Bouar.

Le milieu est réparti en tubes de 16 × 160. Dans un premier temps tous les éléments constitutifs de la base sont mélangés et dissous dans l'eau chaude sauf le sang. On stérilise les tubes 30 minutes à 110° C. Les tubes stérilisés sont ramenés à une température voisine de 45 à 50° C. On y ajoute alors le sang total de lapin, stérile. Les tubes sont inclinés et laissés à la température du laboratoire pendant 4 heures. Ils sont ensuite placés à + 4° C où la coagulation se termine. Le lendemain on ajoute la phase liquide.

Ainsi stérilement préparés, les milieux peuvent semble-t-il se garder plus de trois mois.

3° Inoculum d'hémoculture.

Son volume est fixé à 4 ou 6 gouttes de sang de raton ou de souris par tube.

4° Inoculum de repiquage.

Son volume est fonction de la richesse de la culture servant de point de départ. On utilise généralement 8 à 15 gouttes de pipette Pasteur pour obtenir un bon démarrage des cultures de repiquage.

5° Conditions de culture.

Les tubes inoculés sont inclinés et placés à l'obscurité. Température ambiante : 25 ± 3° C.

6° Moment des repiquages.

Suivant la rapidité de croissance de la culture on peut situer les repiquages entre le 5^e et le 8^e jour suivant l'inoculation (Tableau I).

TABLEAU N°1

Croissance des cultures à 25 ± 3° C

	J	J+1	J+2	J+3	J+4	J+5	J+6	J+7	J+8	J+9	J+10	J+11
Hémoculture	1	5	10	40	150	200	400	200	200	150	100	100
Repiquage	7	15	20	90	125	140	250	200	120			
Repiquage	10	12	28	75	300							
Repiquage	3	5	27	29	250							
Repiquage				200	500							
Repiquage		35	150	400								
Repiquage				800								
Repiquage			400	400	1000							

Remarque : Chaque nombre correspond au total de trypanosomes observés pour 10 champs microscopiques

7° Stabilisation des cultures par le froid.

Pour un lot de tubes inoculés en même temps on n'a pas toujours une courbe de croissance identique. A défaut de stimuler des cultures retardataires on stabilise les cultures très riches par un séjour à + 4° C (Tableau II). En effet, à cette température, la croissance est stabilisée et la phase de multiplication en plateau, peut durer

8 à 10 jours, au lieu des 24 à 48 heures habituelles. Ce système permet d'avoir toujours un lot de tubes d'inoculation ancienne disponible et de récolter l'antigène de plusieurs lots en même temps.

Les repiquages à partir de tubes ayant séjourné au froid se font dans des conditions identiques à celles rencontrées lorsque la croissance se fait classiquement à la température du laboratoire.

TABLEAU N°II

Action du froid sur les cultures

J	J+1	J+2	J+3	J+4	J+5	J+6	J+7	J+8	J+9	J+10	J+11	J+12
	8		56	153	41				55		150	
			9	25	40				153		270	
		65		120	400	300		400		350		350
Conditions normales						Séjour à + 4° C						

II. — Résultats

1° Evolution de la croissance.

Le cycle d'une culture de trypanosomes pour un tube déterminé s'effectue en 1 à 3 semaines. L'optimum étant généralement atteint vers le 5^e ou le 6^e jour suivant l'inoculation. A la température ambiante cet optimum peut se maintenir pendant 24 à 72 heures, c'est la phase de multiplication en plateau ; nous avons signalé que cette phase s'allongeait si les tubes étaient placés à + 4° C.

2° Nombre de parasites.

Le nombre de parasites est variable suivant les lots de tubes considérés, ainsi que parmi les tubes d'un même lot. Les observations faites avec un objectif $\times 20$ et un oculaire $\times 10$ montrent 25 à 50 et quelquefois 100 trypanosomes par champ microscopique.

Les numérations faites à la cellule de Malassez, assez délicates d'ailleurs donnent un nombre de 5 à 10 millions de parasites par centimètre cube.

3° Evolution de la morphologie.

Aussitôt après l'inoculation de départ (hémoculture) on retrouve pendant 24 à 48 heures

les formes sanguines. Après trois jours apparaissent des formes longues flexueuses, assemblées à 2 ou 3 (formes de divisions). On peut également remarquer pendant cette période des rosaces de trypanosomes alors que dans les jours qui suivent il est impossible de mettre ces formations en évidence (sauf parfois dans la période de dégénérescence).

Le cytoplasme des parasites contient des granulations réfringentes beaucoup plus nombreuses que chez les formes sanguines.

Vers les 6^e-7^e jours commencent d'apparaître les premières formes de dégénérescence avec vacuole centrale dont le volume augmente à mesure que la culture vieillit. La mobilité décroît également.

Les formes globuleuses font ensuite place à des formes plasmodiales vacuolaires et granuleuses desquelles émergent des filaments très mobiles spirochétiformes, quelquefois rencontrés libres.

Il est difficile de leur donner une signification. Certaines formes jeunes de trypanosomes, très étroites, semblent pouvoir en dériver. D'après les différentes formes de parasites observées la multiplication pourrait se faire suivant deux modalités :

a) La bipartition classique ; les trypanosomes

étant alors appareillés par 2, 3 ou plus suivant le nombre de subdivisions.

b) Des divisions multiples à partir des masses plasmodiales apparemment en voie de dégénérescence, aboutissant généralement à plusieurs individus filiformes doués de mouvements serpentiformes très actifs.

Au sein de la culture les formes jeunes sont les plus fines et les plus mobiles. Leur présence est un gage de réussite pour les repiquages éventuels. Cependant une culture en voie de dégénérescence, présentant de nombreuses formes plasmodiales émettant des formes filamenteuses spirochétiformes, semble également pouvoir donner des cultures par repiquage.

Dans les cultures en voie de dégénérescence les trypanosomes morts ne gardent pas longtemps leurs formes et se lysent très rapidement.

4^o Récolte des parasites et préparation de la suspension antigénique.

Arrivées à leur optimum les cultures sont récoltées et les 2 ou 3 ml de surnageant sont d'abord recueillis.

La pente de gélose est ensuite rincée avec une solution de Hank glucosée glycinée dont nous avons mis les propriétés protectrices en évidence dans un précédent travail (BERSON, 1962).

Le liquide de rinçage est généralement plus riche en parasites que le bouillon de culture lui-même, ce qui tendrait à prouver que les trypanosomes ne cultivent pas en suspension dans le surnageant mais plutôt à l'interface liquide-base.

On mélange ensuite les deux pools de liquide et suivant le nombre de globules rouges de lapin présents (généralement moins de 1 pour 15 trypanosomes) on purifie la suspension.

Deux méthodes ont été utilisées :

a) Une centrifugation légère (2 à 3 minutes à 500 T).

b) L'emploi d'un sérum hémolytique anti-lapin préparé sur cobaye.

La suspension de trypanosomes est alors concentrée ad libitum par une centrifugation poussée (30 minutes à 4.000 tours). La suspension finale (culot de centrifugation redissous dans un volume de surnageant approprié) est mélangée à un égal volume de glycérine.

III. — Discussion — Conclusion.

Le milieu de culture au sang total de lapin nous a donné d'excellents résultats et les repiquages ont été pratiqués dans des conditions de réussite égale si ce n'est supérieure à celles dont il est fait mention dans les travaux traitant du même sujet.

La souche de *Trypanosoma congolense* isolée d'un zébu trypanosomé et mise en culture, est actuellement entretenue en deux lignées de cultures parallèles. La plus ancienne est maintenant vieille de 8 mois (*).

38 passages ont permis sa conservation, c'est-à-dire l'hémoculture d'isolement et 37 repiquages.

Pour la préparation de l'antigène, l'inconvénient de ce milieu de culture réside dans la présence des hématies de lapin qui en se détachant de l'interface surnageant-base sont libérées dans la phase liquide. Si les deux procédés de purification de la suspension de trypanosomes proposés sont efficaces, l'idéal serait d'avoir un milieu dépourvu d'éléments figurés, et dont le surnageant ne contiendrait que les parasites.

*Institut d'Elevage et de Médecine vétérinaire
des Pays Tropicaux. Centre de Recherches
sur les Trypanosomiasés animales.
Bouar. République Centrafricaine.*

(*) Août 1965.

SUMMARY

Culture of *Trypanosoma congolense* Broden, 1904, in diphasic medium for the antigen preparation

The author proposes a diphasic culture medium in order to culture *Trypanosoma congolense*. This medium consists of a whole rabbit blood nutrient agar as solid phase and of a sodium chloride solution as liquid phase. After growth, the flagellates are harvested. For this purpose, at first the supernatant is taken, then the agar surface is washed with a Hank's modified solution. The wash out liquid is mixed with the supernatant. After purification and concentration the trypanosoma suspension is used as antigen in view of further immunologic studies.

RESUMEN

Cultivo de *Trypanosoma congolense* Broden 1904 en medio difásico para la preparación de un antígeno

Teniendo por objeto cultivar *Trypanosoma congolense*, el autor propone un medio de cultivo difásico, compuesto por una gelosa nutritiva con sangre total de conejo como base, y por una solución de cloruro de sodio como fase líquida. Después se recogen los parásitos. En primer lugar se toma lo que sobrenada, luego se lava la superficie de la base con una solución de Hank modificada. Se mezcla el líquido de lavado a lo que sobrenada. Después de la concentración y de la purificación, se utiliza la suspensión de tripanosomas como antígeno para estudios inmunológicos.

BIBLIOGRAPHIE

- BERSON (J. P.). — Utilisation du liquide de Hanks pour la conservation de *Trypanosoma congolense* par le froid. Bull. Soc. Path. Exot. 1962, 55 : 804-7.
- JADIN (J.) et WERRY (M.). — La culture des *Trypanosomidae*. Ann. Soc. belge Med. Trop. 1963, 5 : 831-42.
- LEHMAN (D. L.). — Attempts at the selective cultivation of *T. rhodesiense*, *T. brucei* and *T. congolense*. Ann. Trop. Med. Parasit. 1961, 55 : 440-6.
- TOBIE (E. J.). — The cultivation of *Trypanosoma congolense* in vitro. J. Parasit. 1958, 44 : 241-2.