

## Recherches sur la biologie de *Trypanosoma congolense* Broden 1904

### II. — Isolement et entretien de souches « sauvages » sur milieu de culture monophasique solide au sang total de zébu

par J.-P. BERSON

#### RÉSUMÉ

L'auteur propose la préparation et l'emploi d'un milieu gélosé contenant 15 p. 100 de sang total de veau zébu. Il s'agit essentiellement d'une phase solide sur laquelle un artifice de manipulation permet d'entretenir *Trypanosoma congolense*. Ce milieu est préconisé pour l'isolement direct des trypanosomides parasitant les petits ruminants et les équidés, également les animaux de laboratoire expérimentalement infectés. *Trypanosoma congolense* est entretenu *in vitro* sur cette base depuis près de huit mois grâce à vingt-neuf repiquages effectués de janvier à août 1966.

Un mémoire déjà ancien (TOBIE, 1958) a fait état de la difficulté d'isoler *in vitro* les trypanosomes de l'espèce *congolense*. La méthode recommandée était un milieu gélosé diphasique contenant du sang humain pour l'hémoculture et la période d'adaptation du parasite ; ensuite du sang de lapin pour les repiquages. Les hémocultures étaient réalisées à partir d'animaux de laboratoire infectés.

Récemment l'auteur a montré (BERSON, 1966) la possibilité d'utiliser un milieu diphasique au sang total de lapin aussi bien pour les hémocultures que pour les repiquages. Il a également constaté que si un tel milieu était très satisfaisant pour faire des isollements à partir des animaux de laboratoire il était d'une qualité inconsistante lors des hémocultures sur ruminants et équidés domestiques naturellement infectés.

Le présent travail propose l'emploi d'un milieu monophasique gélosé au sang total de veau zébu (STZ) pour réaliser des hémocultures à

partir de chèvres, de moutons et d'équidés naturellement infectés par *Trypanosoma congolense*. Cette souche est dite « sauvage » pour la différencier des mêmes souches obtenues après passages sur animaux de laboratoire. On doit signaler que les hémocultures faites à partir du sang de zébus parasités ont également donné des résultats positifs et qu'on a obtenu une culture simultanée de *Trypanosoma congolense* et de *T. theileri* ; cette dernière espèce parasitant dans une très forte proportion les animaux de Béwiti où les cultures étaient faites. On constate alors que par compétition *T. theileri* élimine rapidement *T. congolense*. Un milieu sélectif est actuellement à l'étude dans le but de permettre des hémocultures différentielles.

\* La première partie de ce mémoire est parue sous le titre : Culture de *T. congolense* Broden 1904, in : Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, 1966 tome XIX, page 1 et suivantes.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1<sup>o</sup> Souches :

Les souches utilisées proviennent de la station de Béwiti où règne une enzootie à *T. congolense*. Les hémocultures ont été faites directement à partir de sang des animaux suivants : chèvre, mouton, âne.

### 2<sup>o</sup> Milieu de culture :

Le milieu uniquement composé d'une gélose au sang diffère peu de la base constituant le milieu diphasique précédemment décrit (BERSON, 1966).

Gélose nutritive Biolyon .....	11,5 g
Agar-Agar .....	1 g
Sang total de veau .....	75 ml
Bicarbonate de sodium QSP ph.....	7,5
Eau distillée.....	500 ml

La base est autoclavée, le sang est ensuite ajouté stérilement. La répartition en tubes de 16 x 160 se fait à raison de 10 ml par tube. L'adjonction d'agar augmente la tenue du milieu et la solidité de la pente sans nuire pour autant à ses propriétés nutritives. Le sang provient d'un veau âgé de quatre mois ; on remarquera qu'il n'y a pas d'antibiotiques incorporés à la base.

### 3<sup>o</sup> Volume de l'inoculum :

Le sang infecté prélevé stérilement sur anticoagulant est inoculé à raison de 1 à 2 ml par tube de 16 x 160 bouché au caoutchouc et contenant 10 ml de base et 1,5 ml de sang total de veau préalablement incorporé.

### 4<sup>o</sup> Technique de repiquage :

Le tube d'hémoculture est le seul à contenir un volume de liquide important. Pour assurer le premier repiquage on prélève X gouttes de sa phase liquide (essentiellement du sérum) qui sont déposées sur la gélose d'un nouveau tube « sec » ou contenant quelques traces d'eau de condensation. Au moment du deuxième repiquage on ajoute dans le tube à repiquer 1 à 2 ml surnageant préparé à part et stérilisé sur filtre

— C'est la phase liquide du milieu diphasique au sang total de lapin (STL), voir BERSON 1966.

EKS Seitz. Ce surnageant est isotonique et contient des antibiotiques et du glucose ce qui facilite les manipulations éventuelles.

La culture mise en suspension dans ce surnageant est repiquée sur des tubes « secs » neufs à raison de X gouttes par tube. On procède de la même manière pour les repiquages suivants.

### 5<sup>o</sup> Croissance et examens des cultures :

Etant donné le faible volume de culture de chaque tube il va sans dire que ce type de milieu ne peut être utilisé que pour les hémocultures et l'entretien des souches. On a cependant constaté que lorsqu'on dilue la culture avec le surnageant dont il vient d'être question, il est possible de prélever ce liquide de lavage, et si on en laisse quelques gouttes dans le fond du tube, on voit généralement la culture redémarrer. On pourrait en principe procéder plusieurs fois de cette manière et 1 lot de tube du même âge devrait finalement fournir un certain volume de cultures diluées que l'on centrifugerait ultérieurement pour concentrer les parasites. En fait les risques de pollution sont toujours importants et il est préférable de se borner à ajouter le surnageant dans les tubes et à repiquer la suspension obtenue. De cette manière on n'a jamais plus de 0,5 ml de liquide par tube. Lorsqu'on veut suivre régulièrement la culture, ce qui nécessite un examen journalier il convient de faire les prélèvements au fond des tubes avec des pipettes Pasteur à double effilure, ce qui permet de n'entraîner qu'une microgoutte à chaque fois, et de garder la gélose humide.

Sur ce milieu les parasites se multiplient activement et dans la mesure où une numération optique peut donner des résultats exacts, les meilleures cultures présentent 1.500 et 1.800 parasites pour dix champs microscopiques. De telles croissances n'ont pu être obtenues avec le milieu diphasique au sang de lapin, mais il faut rappeler que ce milieu avait une phase liquide de 2 à 2,5 ml et non de 0,5 ml comme dans le cas présent. Ce qui revient à dire que pour permettre une croissance supérieure ou identique le milieu au sang de zébu nécessite une phase liquide presque nulle. C'est la faible quantité de liquide qui lui permet d'être finalement aussi nutritif que la phase liquide du milieu au sang de lapin. Une autre preuve du pouvoir nutritif réduit du

milieu STZ est que si sur la base on ajoute la même quantité d'un surnageant identique au milieu STL on observe une dégénérescence rapide des repiquages, ce qui est significatif d'un pouvoir nutritif modéré. Actuellement 29 passages sur STZ ont permis d'entretenir une souche de *T. congolense* depuis huit mois *in vitro*.

#### 6° Discussion — Conclusion :

Puisqu'on vient de voir que *T. congolense* cultive bien sur le milieu STZ on pourra donc l'employer pour l'entretien des souches lorsqu'on ne dispose pas de sang de lapin en quantité suffisante pour produire le milieu diphasique. Il convient également pour l'isolement direct des trypanosomes parasitant les petits ruminants et les équidés. Les hémocultures réalisées à partir de bovins infectés qui donnent une culture double de *T. congolense* et de *T. theileri* nécessitent une mise au point plus approfondie. Enfin on réalise des hémocultures florissantes à partir du sang des animaux de laboratoire parasités.

Il est certain que le milieu diphasique au sang de lapin dont la phase liquide est importante présente au moins deux utilités, celles de permettre

la production de suspensions antigéniques, et d'étudier le comportement des parasites en présence de substances médicamenteuses ou plus particulièrement trypanocides, ce qui bien entendu est impossible à faire avec le milieu sec dont il vient d'être question. Cependant les trypanosomes entretenus sur STZ peuvent être repiqués sur le milieu STL (diphasique au sang total de lapin), de telle manière que finalement ces deux milieux bien que d'utilisations différentes se complètent parfaitement. Si la préparation du milieu STL est plus longue que celle du milieu STZ, les manipulations faites avec ce dernier sont par contre plus délicates.

Il convient de préparer le milieu STZ en lots de tubes importants parmi lesquels des prélèvements seront faits pour tester sa valeur nutritive. En effet les facteurs intervenant dans la fabrication sont assez nombreux (à commencer par l'état de la verrerie employée) et constituent autant d'éléments susceptibles d'influencer les cultures. Les tubes seront ensuite stockés à  $+4 + 5^{\circ}\text{C}$ . On a constaté que des températures inférieures étaient susceptibles de détruire les hématies incorporées à la base, ce qui avait pour but de modifier ses propriétés.

### SUMMARY

#### Research on biology of *T. congolense* Broden 1904 Isolation and maintenance of « wild » strains in monophasic solid culture medium with whole blood of zebu

The author proposes the preparation and the use of an agar medium containing 15 p. 100 of whole blood of young zebu. Actually it is a solid medium on which *Trypanosoma congolense* is maintained by a technical artifice.

This medium is recommended for the isolation of trypanosoma which parasites small ruminants, horses and experimentally infected laboratory animals. *Trypanosoma congolense* is kept *in vitro* since nearly eight months on this medium by means of twenty nine subcultures.

### RESUMEN

#### Investigaciones sobre la biología del *Trypanosoma congolense* Broden 1904. II. Aislamiento y mantenimiento de cepas « salvajes » en medio de cultivo monofásico sólido con sangre completa de cebú

El autor propone la preparación y la utilización de un medio con gelosa cabiendo 15 por 100 de sangre completa de ternero cebú. Esencialmente se trata de una fase sólida sobre la cual una manipulación permite cultivar el

*Trypanosoma congolense*. Se preconiza el dicho medio para el aislamiento directo de los tripanosomas parasitando los pequeños rumiantes y los caballos, así que los animales de laboratorio infectados experimentalmente. Se está manteniendo el *trypanosoma congolense in vitro* sobre este medio desde unos ocho meses gracias a veinte y nueve transplantares.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BERSON (J. P.). — Culture de *Trypanosoma congolense* Broden 1904 en milieu diphasique, en vue de la préparation d'un antigène. *Rev. Elev. Méd. Vét. P. T.* 1966, **19**, 1-5.
- TOBIE (E. J.). — The cultivation of *Trypanosoma congolense* in vitro. *J. Parasit.* 1958, **14**, 241-2.
-