

# Culture *in vitro* de *Trypanosoma theileri* sur des cellules thyroïdiennes bovines

par NGUYEN-BA-VY

Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, Laboratoire de Virologie, 10, rue Pierre-Curie, 94704 Maisons Alfort Cedex.

## RÉSUMÉ

Une souche de *Trypanosoma theileri* a été cultivée avec succès *in vitro* pendant 5 mois, respectivement à 37 °C et à 23 °C, sur des cellules thyroïdiennes de fœtus bovin avec du milieu RPMI 1640 additionné de 10 p. 100 (v/v) de sérum fœtal bovin. L'emploi de cellules rénales et testiculaires d'origine bovine et ovine a donné des résultats comparables, mais la survie de ces cellules était relativement plus courte dans ce milieu.

La culture à 37 °C a produit des trypomastigotes ; celle à 23 °C des épimastigotes et des formes intermédiaires ayant un kinétoplaste situé en arrière mais très près du noyau.

Le développement des colonies d'amastigotes à 23 °C correspond vraisemblablement à un mode de multiplication des protozoaires dans un environnement défavorable.

L'amphotéricine B, ajoutée au milieu à la dose de 0,5 µg/ml, a montré un effet trypanocide vis-à-vis de *T. theileri*.

## INTRODUCTION

*Trypanosoma theileri*, décelé par THEILER en 1902 dans le sang des bovidés au Transvaal, a été décrit par LAVERAN (8) et BRUCE (1). Retrouvé non seulement en Afrique mais dans le monde entier (9, 6) sur des bovidés et des bubalins, son existence a souvent été révélée lors de cultures de leucocytes (12) ou de cellules provenant de fœtus infectés *in utero* (10). Ces parasites, qui appartiennent à la section de *Stercoraria*, sous-genre *Megatrypanum*, sont essentiellement transmis par des Tabanidés ; ils sont peu ou pas pathogènes pour les animaux. Ils n'en constituent pas moins, lors d'infestations massives, une cause défavorable à la santé des animaux infectés et à l'économie des élevages.

Des essais de culture *in vitro* ont été entrepris depuis de nombreuses années, pour *T.*

*theileri* comme pour les autres espèces. Des milieux organiques, semi-définis ou synthétiques ont d'abord été enrichis avec des globules rouges ou leurs extraits : milieu de NOVY et MAC NEAL (11, 13), milieu biphasique de TOBIE (17, 18), milieu de SPLITTER et SOULSBY (16). Puis les hématies ont été remplacées par des explants tissulaires (19), des cellules d'insectes (2) ou des cellules animales (3, 4, 5).

Pendant une longue période, la majorité des méthodes proposées n'a pas donné de résultats satisfaisants, soit à cause de la complexité de la composition finale des milieux de culture, soit par la brièveté de la survie des trypanosomes à 37 °C (14, 15), soit par la perte de leur virulence.

Les travaux de HIRUMI et collab. (7), en prouvant la possibilité de cultiver des formes infectantes de *T. brucei* à 37 °C pendant plus

de 310 jours sur des cellules fibroblastiques bovines, ont ouvert une nouvelle étape dans l'histoire de la culture des trypanosomes.

Nous exposons dans ce travail les résultats des cultures de *T. theileri* que nous avons entreprises sur des cellules thyroïdiennes bovines et les essais de culture sur quelques autres types de cellules animales.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Souche de Trypanosoma theileri*

Le Laboratoire Vétérinaire Départemental de Saint-Brieuc (France) a décelé des trypanosomes dans une culture de leucocytes bovins. Ces parasites ont été identifiés par le Service d'Entomologie-Protistologie (Dr ITARD) de l'I.E.M.V.T. à Maisons-Alfort, comme étant *Trypanosoma theileri*, LAVERAN, 1902.

### *Cultures cellulaires*

Les cellules d'explantation des glandes thyroïdiennes de fœtus bovins ont été utilisées à partir de la 3<sup>e</sup> subculture ainsi que celles d'une souche ayant subi 21 passages. Elles sont cultivées dans des tubes à lamelle (\*) avec un mélange à volume égal du milieu RPMI. 1640 (Roswell Park Memorial Institute) et du milieu à base d'hydrolysate de lactalbumine, additionné de 10 p. 100 (v/v) de sérum de veau. Dès la formation de la nappe cellulaire, les tubes sont rincés soigneusement avec une solution saline de Hanks, avant de recevoir 3 ml de milieu RPMI. 1640, additionné de 10 p. 100 (v/v) de sérum fœtal bovin et dépourvu de tout produit antifongique. Après une nuit d'incubation à 37 °C, ces cultures sont prêtes à recevoir des trypanosomes.

D'autres types de cellules, cellules rénales et testiculaires de fœtus de bovin et de mouton, ont été cultivées selon la technique courante. La veille de l'utilisation, la nappe cellulaire est rincée puis incubée avec le même milieu de culture que ci-dessus.

### *Numération des trypanosomes*

La numération a été effectuée sur des hématimètres de Malassez. Seuls les éléments mobiles ont été comptés après agitation des tubes de culture pour la mise en suspension.

## RÉSULTATS

### 1. Démarrage de la culture de *Trypanosoma theileri*

Nous avons ensemencé, à partir d'une suspension de leucocytes bovins contaminés par *T. theileri*, 10 tubes de cellules thyroïdiennes bovines et 5 tubes dépourvus de cellules.

Dans le premier lot, incubé à 23 °C, les parasites ont végété pendant 3-4 jours ; leur multiplication ne devint vraiment active qu'au bout d'une semaine. Ils furent transférés au 13<sup>e</sup> jour dans 20 autres tubes de cellules pour être cultivés respectivement à 37 °C pour la moitié du lot et à 23 °C pour l'autre. Nous avons obtenu depuis lors 2 lignées de *T. theileri* qui continuent à se multiplier séparément à ces différentes températures.

Dans les tubes dépourvus de cellules thyroïdiennes, les trypanosomes ont proliféré durant une dizaine de jours, grâce à la présence d'un certain nombre de leucocytes, puis ils ont disparu au bout de 3 semaines.

La présence des cellules semble donc indispensable à la multiplication de ces parasites : nos essais de culture, soit avec le milieu complet seul, soit avec celui débarrassé de cellules après un contact préalable de 1 à 5 jours, ont fourni des résultats négatifs.

Le modèle de tube en usage (\*) possède un côté plat pour recevoir une lamelle et un col relevé lors de l'incubation en position horizontale. En y mettant 3 ml de milieu de culture, on peut constater que l'épaisseur de la couche de liquide n'est pas uniforme d'un bout à l'autre. Les parasites se sont multipliés en abondance dans une petite zone faisant suite à la lamelle, du côté du col. Leur concentration restait plus faible dans les autres parties du tube : les uns collés partiellement aux cellules, les autres s'agitant librement dans une mince couche de milieu en contact avec la nappe cellulaire.

### 2. Culture à 37 °C :

La culture de *T. theileri* à 37 °C a été réalisée sans grande difficulté après la période de démarrage.

La durée d'un cycle de multiplication dépend de la richesse et de l'âge de la

(\*) Nunclon Delta.

semence ; nous avons obtenu de bons résultats à partir des parasites en phase de croissance exponentielle. Ils furentensemencés à 2 séries de 10 tubes de cellules et leur numération effectuée périodiquement à partir de la 24<sup>e</sup> heure :

a) 1<sup>ère</sup> série :

En partant d'une concentration initiale moyenne de  $5 \times 10^5$  trypanosomes par millilitre, le nombre de parasites atteignit en 24 h,  $1,3 \times 10^6$ /ml ; en 48 h,  $2,4 \times 10^6$ /ml ; en 72 h,  $2 \times 10^6$ /ml ; en 96 h,  $1,4 \times 10^6$ /ml.

Le milieu fut changé, 2/3 du volume, dans 5 tubes ; la croissance a repris dans ceux-ci pour atteindre 3 jours plus tard la concentration de  $2,2 \times 10^6$ /ml. Dans les 5 autres tubes dont le milieu n'a pas été remplacé, les trypanosomes sont devenus léthargiques avec apparition de formes d'involution ; tous les éléments mobiles ont disparu après 10 jours.

b) 2<sup>e</sup> série :

Avec une concentration initiale moyenne de  $4 \times 10^4$ /ml, on obtint en 24 h,  $4,3 \times 10^4$ /ml ; en 48 h,  $8 \times 10^4$ /ml ; en 72 h,  $2 \times 10^5$ /ml.

Le sommet de la courbe de croissance ne fut atteint qu'au bout de 6 jours avec une concentration moyenne de  $1,3 \times 10^6$ /ml. Ensuite, ce fut le déclin avec  $9 \times 10^5$ /ml puis  $4 \times 10^5$ /ml respectivement au bout de 7 jours et 9 jours.

La durée de la période de croissance exponentielle varie avec la concentration initiale des parasitesensemencés. Dans la première série de tubes de culture avec un taux initial de  $5 \times 10^5$ /ml, elle se termina en 48 heures. Elle s'est prolongée jusqu'à 6 jours dans la seconde, avec une teneur initiale de  $4 \times 10^4$ /ml.

La concentration initiale a également des influences sur le rendement : la récolte obtenue dans la première série fut plus riche que celle de la seconde.

Pour l'entretien de cette souche de *T. theileri*, nous avons adopté le rythme d'une subculture par semaine, en commençant avec le taux de  $5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ /ml. Elle garde depuis 5 mois son pouvoir de multiplication à 37 °C.

Cette culture produit régulièrement des formes sanguines longues ou moyennes, ayant un kinétoplaste situé loin en arrière du noyau.

Des formes en bipartition ou en zoogées sont nombreuses pendant la phase de croissance, tandis que des formes courtes et des sphéromastigotes sont prédominantes dans les cultures âgées.

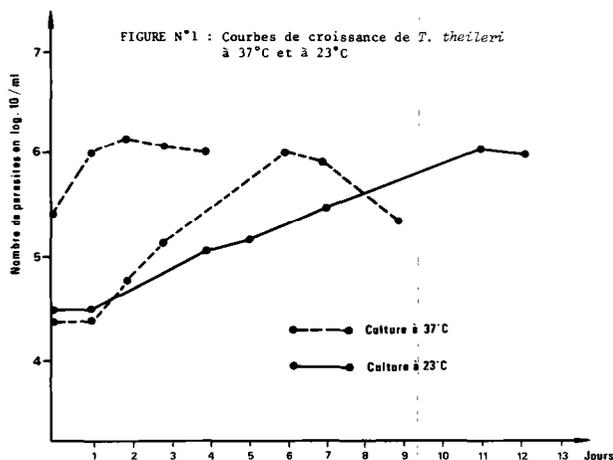
### 3. Culture à 23 °C

La culture de *T. theileri* à 23 °C a exigé moins de soins qu'à 37 °C. La durée du cycle de multiplication et le rendement sont aussi conditionnés par la qualité et la teneur de l'inoculum, mais la croissance s'est révélée plus lente à 23 °C : en opérant avec une concentration initiale de  $5 \times 10^4$  trypanosomes par millilitre, il a fallu 4 jours pour obtenir  $1,4 \times 10^5$ /ml, 5 jours pour avoir  $2,4 \times 10^5$ /ml et 7 jours pour  $5 \times 10^5$ /ml. Le taux de  $1,2 \times 10^6$ /ml ne fut atteint qu'au 11<sup>e</sup> jour et la régression a commencé au 12<sup>e</sup> jour avec  $1 \times 10^6$ /ml.

Après la période de croissance exponentielle, la présence de flagellés persiste durant 3-4 semaines dans le même milieu, tant qu'il y reste des cellules vivantes ; leur nombre diminue progressivement avec apparition de formes d'involution en gourdes (choanomastigotes) et des sphéromastigotes.

L'entretien de cette souche de *T. theileri* qui continue à proliférer à 23 °C depuis 5 mois, a été réalisé par des subcultures toutes les 3 semaines.

La culture à 23 °C produisait pendant la phase de croissance des épimastigotes et des formes intermédiaires ayant un kinétoplaste situé en arrière mais tout près du noyau.



#### 4. Formation des colonies d'amastigotes

Des colonies d'amastigotes se sont formées à 23 °C dans des cultures âgées. Accolées à la lamelle en verre ou à la paroi du tube en plastique, elles apparaissent planes en monocouche ou en rosace plus épaissie au centre. Leur taille varie de 10 à 140  $\mu$  de diamètre. La coloration au Giemsa a permis la distinction des éléments arrondis, ovulaires ou fusiformes ayant chacun un noyau et un kinétoplaste qui ressemble à un point ou à un trait.

L'amélioration des conditions de culture par l'introduction dans le tube d'une nouvelle lamelle de cellules et par le changement du milieu permet à un certain nombre de colonies de s'agrandir. Des amastigotes commencent à s'allonger puis des éléments mobiles y apparaissent de plus en plus nombreux ; les colonies se vident progressivement en commençant par le centre. Certaines se décollent complètement et flottent dans le milieu sous forme d'amas de différentes tailles, composés d'amastigotes et de flagellés encore fixés par une extrémité.

Lorsque les conditions de culture restent défavorables pendant trop longtemps par suite de la dégénérescence totale de toutes les cellules, les amastigotes des colonies se lysent et meurent définitivement.

#### 5. Culture de *T. theileri* sur différents types de cellules

Des cultures de cellules rénales et testiculaires de fœtus de bovin et de mouton ont été utilisées pour la multiplication de *T. theileri* à 37 °C et à 23 °C. Les résultats obtenus ont été comparables à ceux des cultures sur des cellules thyroïdiennes bovines. Cependant, la survie de ces cellules dans le milieu RPMI. 1640, additionné de 10 p. 100 de sérum fœtal bovin a été relativement plus courte.

Des passages alternés d'un type de cellules à l'autre n'a apparemment aucun effet néfaste sur les trypanosomes. Toutefois le réemploi multiple de cellules usagées a fait baisser progressivement le rendement des cultures.

#### 6. Effet trypanocide de l'amphotéricine B

L'amphotéricine B (\*) ajoutée à des doses allant de 0,5  $\mu$ g à 5  $\mu$ g/ml, aux cultures de *T. theileri* à 37 °C et à 23 °C, a provoqué la mort de tous les trypanosomes. D'autres tubes de cellules contenant 1  $\mu$ g/ml de cet antifongique ont étéensemencés avec  $10^5$  parasites : aucun survivant n'a été décelé durant une semaine d'incubation au bout de laquelle le remplace-

(\*) Fungizone (Squibb).

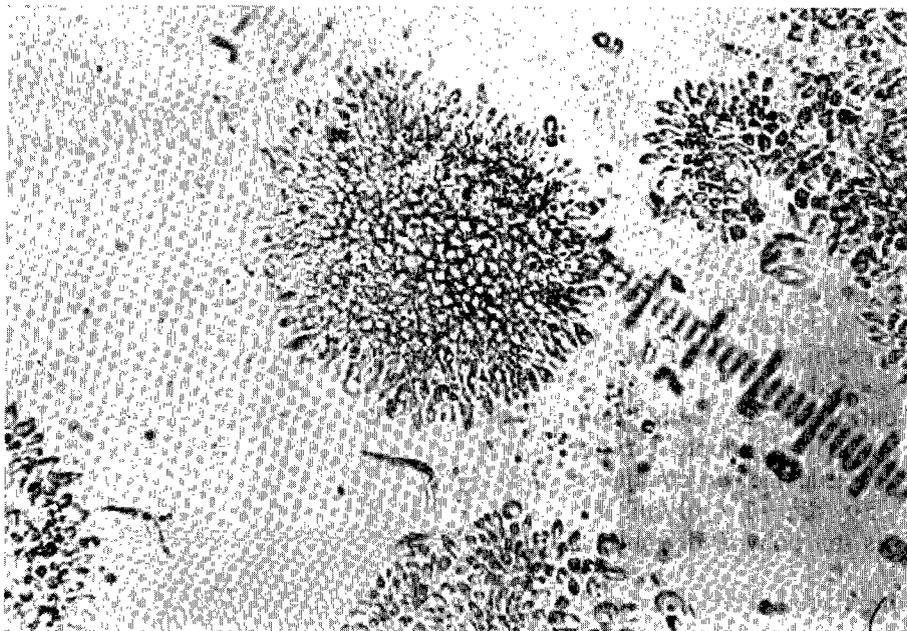


Photo n° 1 : Colonies d'amastigotes (objectif Carl Zeiss 40/0,75, oculaire 8  $\times$ ).

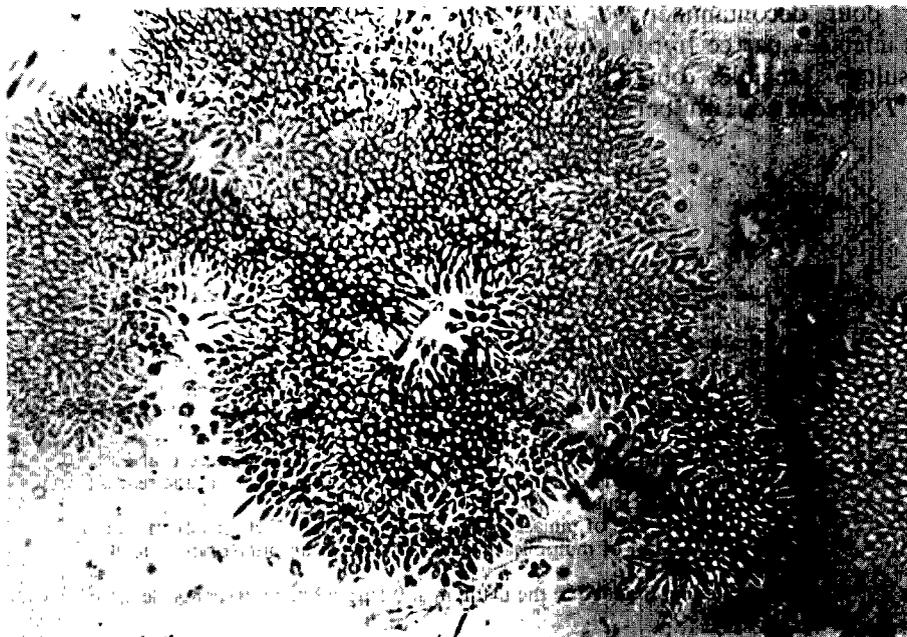


Photo n° 2 : Grande colonie d'amastigotes en voie de dispersion.

ment de l'ancien milieu par du nouveau, dépourvu de ce produit, a fourni le même résultat négatif. Des retards de croissance ont été constatés dans un certain nombre de tubes ayant reçu de l'amphotéricine B, seulement durant la période de formation de la nappe cellulaire.

### DISCUSSION

La nappe de cellules constitue une surface vitale de croissance pour les trypanosomes qui se multiplient exclusivement dans une mince couche de milieu en contact avec cette surface. Les couches supérieures jouant à la fois le rôle de tampon en diluant les produits toxiques du métabolisme et de réserve en fournissant des éléments nutritifs ne supportent pas directement leur croissance.

Le rendement d'une culture dépend de nombreux facteurs dont l'un des plus importants est constitué par l'étendue de cette surface vitale qui pourrait être augmentée par la culture des cellules sur des microbilles ou sur des rouleaux de films en polystyrène.

Il est essentiel, pour l'entretien d'une souche de trypanosomes à 37 °C, d'effectuer des subcultures avec des parasites en phase de croissance exponentielle. L'usage d'une semence formée en majorité d'éléments

dépassant cette période, s'il ne fait que retarder la croissance de *T. theileri*, peut se révéler, d'après nos expériences, l'une des causes d'échec vis-à-vis d'autres types de trypanosomes pathogènes plus difficiles à cultiver.

La culture *in vitro* nous a permis d'observer presque toutes les formes de *T. theileri* durant leur cycle d'évolution chez les insectes vecteurs et chez les animaux sensibles : à 23 °C des épimastigotes, des formes intermédiaires ayant un kinétoplaste situé en arrière tout près du noyau, des sphéromastigotes, des amastigotes et à 37 °C des trypomastigotes. Le cycle complet d'évolution de ces parasites pourrait donc être reproduit *in vitro*.

La formation des colonies d'amastigotes à 23 °C correspond à un mode de multiplication des trypanosomes sous certaines influences de l'environnement ; on les a trouvées dans l'organisme des insectes vecteurs. Ces colonies n'ont pas été constituées par l'agglutination des formes d'involution mais par la multiplication active des amastigotes qui faisait augmenter progressivement la taille des colonies.

Nous avons prouvé l'effet trypanocide de l'amphotéricine B. SPLITTER et SOULSBY (16) ont remarqué la sensibilité de *T. theileri* vis-à-vis de la Mycostatine (Nystatine) à la dose de 25-50 unités/ml. Il faut donc supprimer ces antifongiques lors des cultures de trypanosomes mais, par contre, on peut les

préconiser pour décontaminer des cultures cellulaires infectées par ce trypanosome.

Les résultats tangibles obtenus avec la culture de *T. theileri* nous ont permis d'étendre

nos recherches expérimentales à la culture et à l'étude des autres types de trypanosomes pathogènes.

## SUMMARY

### *In vitro* culture of *Trypanosoma theileri* on cattle thyroid cells

A strain of *Trypanosoma theileri* was successfully cultivated *in vitro* for 5 months at 37 °C and 23 °C on fetal bovine thyroid cells. The medium used was RPMI. 1640 with the addition of 10 p. 100 (v/v) of fetal bovine serum. The use of kidney and testicular cells from cattle and sheep gave comparable results but the life span of these cells were relatively shorter in this medium.

The culture at 37 °C produced trypomastigotes while the culture at 23 °C produced epimastigotes and intermediate forms with a kinetoplast at the rear but very close to the nucleus.

The development of amastigote colonies in the 23 °C medium could correspond to a form of multiplication of protozoa in an unfavorable environment.

Amphotericin B added to the medium at 0.5 µg/ml had a trypanocide effect on *T. theileri*.

## RESUMEN

### Cultivo *in vitro* de *Trypanosoma theileri* sobre células tiroideas bovinas

Se ha cultivado con éxito, durante cinco meses, una cepa de *Trypanosoma theileri*, a 37 °C y a 23 °C, sobre células tiroideas de feto bovino con medio RPMI 1640 y 10 p. 100 (v/v) de suero fetal bovino. El empleo de células renales y testiculares de origen bovino y ovino ha dado resultados comparables pero la supervivencia de dichas células era relativamente más corta en este medio.

El cultivo a 37 °C ha producido tripomastigotes; la a 23 °C epimastigotes y formas intermediarias teniendo un kinetoplasto situado para atrás pero muy cerca del núcleo.

El desarrollo de colonias de amastigotes a 23 °C corresponde verosimilmente a un modo de multiplicación de los protozoarios en un medio desfavorable.

La amfotericina B añadida al medio a la dosis de 0,5 µg/ml, ha mostrado un efecto tripanocida para con *T. theileri*.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BRUCE (D.). *Lancet*, 8 March 1902, 664.
2. CUNNINGHAM (I.). Quantitative studies on trypanosomes in tsetse tissue culture. *Expl. Parasit.*, 1973, **33** : 34-45.
3. DEMARCHI (J.) et NICOLÍ (J.). La multiplication des agents de trypanosomiases humaines africaines en culture de tissus. *Annls Inst. Pasteur*, 1960, **99** : 120-130.
4. FROMENTIN (H.). Entretien de *Trypanosoma gambiense* sur cultures de tissus. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1961, **54** : 1046-1053.
5. HAWKING (F.). The propagation and survival of *Trypanosoma brucei* *in vitro* at 37 °C. *Trans. r. Soc. trop. Med. Hyg.*, 1971, **65** : 672-675.
6. HERBERT (I. V.). *Trypanosoma theileri* Laveran 1902. A cosmopolitan parasite of cattle. *Vet. Bull.*, 1964, **34** : 563-570.
7. HIRUMI (H.), DOYLE (J. J.) et HIRUMI (K.). African trypanosomes : cultivation of animal infective *Trypanosoma brucei* *in vitro*. *Sciences*, 1977, **196** : 992-994 ; Cultivation of bloodstream *Trypanosoma brucei*. *Bull. W.H.O.*, 1977, **55** : 405-409.
8. LAVERAN (A.). *Acad. Sci.*, 3 mars et 3 novembre 1902.
9. LAVERAN (A.) et MESNIL (F.). *T. theileri* Laveran 1902. In : Trypanosomes et trypanosomiases. 2<sup>e</sup> éd. Paris, Masson et Cie, 1912, p. 330.
10. LUNDHOLM (B. D.), STÖRZ (J.) et Mc KERCHE (D. G.). *Trypanosoma theileri* as a contaminant of tissue origin in cultures of fetal bovine kidney cells *in vitro*. *Virology*, 1959, **8** : 394-396.
11. MAC NEAL (W. J.) et NOVY (F. G.). On the cultivation of *Trypanosoma lewisi*. In : Contributions to medical research dedicated to Victor C. VAUGHAN. Ann. Arbor, Michigan (U.S.A.), George WAHR, 1903 : 549-577.
12. MALMQUIST (W. A.). Trypanosomes in leucocyte culture. *Vet. Rec.*, 1965, **77** : 350.

13. NOVY (F. G.) et MAC NEAL (W. J.). On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J. infect. dis.*, 1904, **1** : 1-30.
14. RISTIC (M.) et TRAGER (W.). Cultivation at 37 °C of a trypanosome (*Trypanosoma theileri*) from cows with depressed milk production. *J. Protozool.*, 1958, **5** : 146-148.
15. SIMPSON (C. F.) et GREEN (J. H.). Cultivation of *Trypanosoma theileri* in liquid medium at 37°C. *Cornell vet.*, 1963, **49** : 192-193.
16. SPLITTER (E. J.) et SOULSBY (E. J. L.). Isolation and continuous cultivation of *Trypanosoma theileri* in media containing tissue culture fluids. *Expl. Parasit.*, 1967, **21** : 137-148.
17. TOBIE (E. J.). Cultivation of mammalian trypanosomes. *J. Protozool.*, 1964, **11** : 418-423.
18. TOBIE (E. J.), BRAND (T. Von) et MEHLMAN (B.). Cultural and physiological observations on *Trypanosoma rhodesiense* and *Trypanosoma gambiense*. *J. Parasit.*, 1950, **36** : 48-54.
19. TRAGER (W.). Tsetse fly tissue culture and development of trypanosomes to the infective stage. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1959, **53** : 473-491.