

Un milieu de culture pour trypanosomides

PAR

J. JADIN et G. PIERREUX (*).

(Reçu pour publication le 14 novembre 1960.)

Charles Nicolle, lorsqu'il réussit à cultiver pour la première fois les leishmania du Bouton d'Orient, utilisa un milieu gélose sang dépourvu de peptone et de viande pour lui assurer une composition constante. Ses prédécesseurs américains Novy et Mac Neal avaient obtenu sur gélose sang additionnée de peptone et de viande des cultures de trypanosomes d'oiseaux et du rat dans l'eau de condensation de leur tube de gélose sang.

Le milieu NNN modifié par Ch. Nicolle est encore à l'heure actuelle, d'usage courant pour l'entretien de divers flagellés.

Dans ses publications, Marguerite Lwoff a précisé quels étaient les constituants indispensables à la croissance des flagellés. Ainsi, l'hématine, l'acide ascorbique, les vitamines du groupe B, sont des facteurs de croissance qu'on ne peut négliger.

Dans le but d'obtenir de grandes quantités de trypanosomes, T. von Brand, E. M. Johnson et C. W. Rees, ont préconisé la culture de *Schizotrypanum cruzi* en flacon d'Erlenmeyer contenant de la gélose au sang préparée avec 2,5 p. cent d'Agar Difco, 2 p. cent de Trypticase (B. B. L.), 0,5 p. cent de Chlorure de sodium et 10 p. cent de sang défibriné de lapin. Ce milieu a permis de réaliser de nombreux travaux concernant la physiologie et l'étude des enzymes des trypanosomidés.

Paul A. Little et Y. Subbarow utilisent avec succès un milieu liquide assez semblable au milieu de Lwoff, enrichi de sang cuit. Leurs essais montrent que la crème de lait est capable de stimuler le développement des trypanosomes et que des acides aminés tels 1-valine, d1-leucine et 1-tyrosine ont un effet comparable.

(*) Ce travail a été effectué grâce à la générosité de Continental Pharma et grâce à un subside du Fonds National de la Recherche Scientifique.

A. Poirier a obtenu des cultures très riches de *Schyzotrypanum cruzi* en utilisant le milieu de Lwoff, dont voici la formule :

Peptone	20 g
Chlorure de sodium	6 g
Glucose	5 g
Eau distillée	1.000 ml

Ce milieu doit être ajusté au pH de 7,2 et enrichi de sang frais décomplémenté de cobaye à raison de 1 goutte pour 2 ml de milieu de culture. Les tubesensemencés sont régulièrement secoués à l'agitateur de Kahn, toutes les vingt-quatre heures, pendant trente minutes. Ce brassage entraîne une oxygénation plus intense, favorise le départ du CO₂ et maintient ainsi le pH du milieu, accélère les combustions et dissocie les formes aflagellées en multiplication, favorisant l'apparition de formes mobiles flagellées.

A. Poirier obtient ainsi des cultures qui contiennent au 10^{me} jour huit millions de trypanosomes par ml et au 21^{me} jour jusqu'à vingt et un millions de trypanosomes par ml. Si ce milieu, de même que le milieu préconisé par von Brand et ses collaborateurs, donne d'excellents résultats, il présente néanmoins l'inconvénient technique de nécessiter l'emploi de globules rouges frais, ce qui risque toujours d'entraîner des contaminations et de compromettre la culture elle-même. De plus cette technique est relativement lente et nécessite un travail journalier.

En 1956 à Bukavu, nous étions parvenus à cultiver une souche de *Trypanosoma rhodesiense* récemment isolée, soit sur cellules HeLa, soit sur fibroblastes d'embryon de poulet en milieu de Parker additionné de sérum. Après deux passages, ces trypanosomes conservaient leur pouvoir pathogène pour la souris, ce que l'on n'obtient pas avec le milieu NNN, ni avec le milieu de Brutsaert et Henrard, du moins pour les trypanosomes du groupe Brucei.

A l'Institut de Médecine Tropicale à Anvers, nous avons effectué plusieurs tentatives de culture de *Trypanosoma gambiense* ou *rhodesiense* entretenues par passages successifs sur cobayes depuis plusieurs années, mais sans succès. Par contre, la culture de *Schyzotrypanum cruzi* sur cellules KB maintenues à 28°C en milieu de Hanks a donné des résultats très favorables. Nous avons constaté bientôt que la présence de cellules vivantes dans le milieu n'était pas indispensable au développement des trypanosomes et ceux-ci se développaient parfaitement bien sur le milieu de Hanks dépourvu de cellules à condition d'y ajouter du sérum de veau et des extraits de globules de bœuf. Ce milieu contient les substances indispensables : de l'hydrolysate de lactalbumine, du sérum de veau frais,

du glucose, des sels minéraux et de l'hématine. Un tampon phosphate assure un pH de 7,2.

La pénicilline et la streptomycine mettent à l'abri de certaines contaminations, mais on ne parvient à de bons résultats que si on entretient la verrerie dans un état d'extrême propreté comme on a coutume de le faire pour les cultures de tissus. Les flacons sont bouchés au caoutchouc et on n'emploie que de petites quantités de milieu par flacon, environ 30 p. cent de la capacité totale, afin de permettre une oxygénation suffisante. Les flacons sont disposés de façon à présenter une large surface de contact avec l'air, le milieu liquide étant étalé en couche mince.

Après passage répété dans ce milieu, nous obtenons des cultures fort riches où l'on peut dénombrer dès le quatrième jour de 40 à 50 millions de trypanosomes par centimètre cube et même jusqu'à 100 millions de trypanosomes.

Étant donné que ce milieu ne contient aucune cellule en suspension, il suffit de le centrifuger pour recueillir les trypanosomes. Ceux-ci peuvent alors fort bien convenir après lavage comme antigène pour la réaction de déviation du complément.

Après vingt-deux passages dans le milieu de Hanks, les *Schyzotrypanum cruzi* restent pathogènes pour les animaux de laboratoire. *Leishmania tropica* pousse également bien sur ce milieu, ainsi que *Leishmania enrietti*. Les *Trypanosoma lewisi* (souche Elisabethville) n'ont pu être adaptés d'une manière définitive.

Conclusion.

Le milieu de Hanks additionné de sérum de veau et d'extrait de globule de bœuf peut servir à la culture en masse de trypanosomidés tels que les *Leishmania* et les *Schyzotrypanum cruzi*.

Résumé. — *Les auteurs rapportent comment ils ont été amenés à utiliser le milieu de Hanks enrichi de sérum de veau frais et d'extraits globulaires de bœuf pour obtenir la culture massive des trypanosomidés tels que Schyzotrypanum cruzi et Leishmania tropica et enrietti. Grâce à ces milieux dépourvus de cellules, on peut obtenir aisément des antigènes valables pour la fixation du complément.*

Samenvatting. — *Schrijvers berichten hoe ze er toe gekomen zijn Hanks' oplossing te gebruiken dat verrijkt werd met vers kalfserum en runder bloedcellen extrakt, om een massieve trypanosomiden kultuur te bekomen zoals Schyzotrypanum cruzi en Leishmania tropica en enrietti. Dankzij deze celvrije oplossingen*

bekomt men gemakkelijk geldig antigeen voor de complementfixatie.

Summary. — *The authors mention how they came to use Hanks' medium enriched with fresh calves serum and extracts of bovine red cells to obtain massive cultures of trypanosomes such as Schizotrypanum cruzi, and Leishmania tropica and enrietti. Thanks to these media without cells it is easy to obtain antigens suitable for the complement fixation test.*

Zusammenfassung. — *Die Verfasser berichten, wie sie dazu gekommen sind, Hanks'sche Lösungen mit frischem Kälberserum und Rinderglobulin anzureichern, um eine massive Kultur von Trypanosomidae wie z.B. Schizotrypanum cruzi und Leishmania tropica und L. enrietti zu gewinnen. Aus den zellfreien Lösungen kann man ohne Schwierigkeit Komplementbindungsantigen erhalten.*

Resumen. — *Los autores señalan que han sido llevados a utilizar el medio de Hanks enriquecido de suero de vaca fresco y extractos globulares de buey para obtener cultivos masivos de tripanosómidos tales como el Schizotrypanum cruzi y Leishmania trópica y enrietti. Gracias a éstos medios desprovistos de células, se pudieron obtener fácilmente antígenos valorables para la fijación del complemento.*

Travail du département de Protozoologie de l'Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold à Anvers.

BIBLIOGRAPHIE.

- Brand (von) T., Johnson E. M. and Rees C. W. — Observations on the respiration of *Trypanosoma cruzi*. J. Gen. Physiol., 1946, 30, 163.
- Little Paul A. and Subbarow Y. — A practical liquid medium for cultivation of *Trypanosoma cruzi* in large volumes. Journ. of Bacteriology, 1945, 50, 57.
- Lwoff A. — Biochemistry and Physiology of Protozoa. Academic Press Inc. Editeur. New-York 1951.
- Lwoff Marguerite. — L'Hématine et l'acide ascorbique, facteurs de croissance pour les flagellés *Schizotrypanum cruzi*. C. R. Acad. des Sciences, 1938, 206, 540.
- Recherche sur le pouvoir de synthèse des Flagellés Trypanosomidés. Monographie de l'Institut Pasteur. Masson et Cie. Editeur. Paris 1940.
- Nicolle Ch. — Culture du parasite du Bouton d'Orient. C. R. Acad. Sciences, 1908, 146, 842.
- Novy F. G. and Mac Neal W. J. — On the cultivation of *Trypanosoma lewisi*. J. Am. Med. Assoc., 1903, 45.
- Poirier A. — Contribution à l'étude des cultures de *Trypanosoma cruzi*. Lyon 1948. Imprimerie des Beaux Arts.