

Acquisitions récentes dans les techniques de culture des Trypanosomes africains (*)

PAR

J. JADIN et D. LE RAY

Résumé — Mise au point d'un milieu liquide monophasique permettant des récoltes massives des antigènes des Trypanosomidae, en particulier ceux du groupe des *Salivaria*, et description d'une méthode d'entretien de routine de cultures stables et abondantes. Ce milieu monophasique, dit milieu GLSH, contient, en solution physiologique de Hanks, de l'hydrolysate de lactalbumine (5 ‰), du sérum (10 ‰) et de l'hémoglobine (4,5 ‰).

De tous les trypanosomidés, les trypanosomes africains et particulièrement ceux du groupe *Brucei* sont des plus complexes par le cycle chez l'insecte vecteur, la variabilité des caractères entre souches et vraisemblablement aussi par les exigences métaboliques. Ainsi que Reichenow (1932, 1934, 1937) l'a bien établi, ces trypanosomidés ne peuvent être obtenus en culture que s'ils peuvent être transmis cycliquement. Aussi, pour réussir les cultures, il faut recourir aux souches que l'on vient d'isoler dans la nature ou qui n'ont été transmises mécaniquement qu'un petit nombre de fois, ce qui limite considérablement les essais possibles dans les laboratoires d'Europe. Cependant, la conservation à basse température à — 70 °C dans la neige carbonique ou mieux dans l'azote liquide à — 196 °C a permis de progresser considérablement dans l'étude des milieux de culture des trypanosomidés au cours de ces dernières années. Dans le froid, les trypanosomes conservent leurs caractères, ils peuvent être retransmis cycliquement, ils gardent leur infectiosité et après passage sur l'animal, on peut les remettre en culture.

Il faut considérer trois buts distincts dans le choix d'un milieu de culture pour les trypanosomidés : 1° l'isolement ou le diagnostic; 2° l'entretien des cultures et 3° la production massive des trypano-

(*) Ce travail a été présenté à la réunion de la Société de Protozoologie du 9 mai 1968 ainsi qu'à la section des Trypanosomiasés africaines du 10 septembre 1968 au 8^e Congrès International de Médecine Tropicale et du Paludisme à Téhéran (Iran).

nosomes. C'est le milieu qui permet de réaliser ces trois exigences qui nous paraît le plus indiqué.

1° Milieux de culture diphasiques

Les milieux traditionnels, issus des premiers essais de Novy et Mac Neal (1903-1904) qui eurent recours à la gélose nutritive additionnée de sang restent à la base des milieux les plus favorables que l'on emploie présentement.

C'est le *Trypanosoma brucei* qui fut avec le *T. lewisi* le premier trypanosomidé obtenu en culture dès le début de ce siècle par Novy et Mac Neal, mais l'entretien des cultures isolées restait difficile et les isolements inconstants. Aussi les auteurs proposèrent successivement diverses modifications. Il est difficile de n'envisager dans cette révision que les recherches qui concernent les trypanosomes africains. En fait, toutes les études qui avaient comme but d'obtenir des cultures de trypanosomidés, qu'il s'agisse de trypanosomes ou de leishmanies, ont permis de révéler diverses constatations qui ont servi à édifier nos connaissances dans ce domaine.

Ainsi Ch. Nicolle (1908) qui avait observé un comportement différent des trypanosomes ensemencés d'après les échantillons de viande et de peptone incorporés au milieu, emploie uniquement l'agar-agar à laquelle il ajoute du sang. Mais il maintient les tubes ainsi préparés pendant cinq jours à l'étuve à 37 °C pour que l'eau de condensation s'imprègne des substances nutritives dérivées du sang.

Nous ne pouvons négliger l'apport de Constant Mathis qui, dès 1906, fait chauffer le milieu au sang cru de Novy-Mac Neal à 75-80 °C à plusieurs reprises pendant une heure et même à 100 °C. Le chauffage assure une stérilisation et une plus grande constance dans les milieux, les composés albuminoïdes chauffés se modifiant moins que les composés albuminoïdes crus. De plus, le chauffage détruit les anticorps et les substances toxiques. Ces principes seront repris par Weinman en 1946, lorsqu'il préconisera de détruire l'alexine en chauffant le plasma à 56 °C pendant une demi-heure, et en lavant les globules rouges qu'il incorpore à la gélose nutritive. L'addition d'eau physiologique, de liquide de Ringer ou de Locke, lorsqu'il y avait trop peu d'eau de condensation au fond des tubes a été pratiquée par Mathis. Noller (1920) et plusieurs chercheurs y ajouteront du glucose.

Ainsi on arrive peu à peu à la conception du milieu préconisé par Tobie et ses collaborateurs (1950-1958), très voisin de celui de Weinman (1946-1957).

Le sang prélevé sur citrate à 0,5 p. cent est chauffé à 56 °C pendant trente minutes, puis incorporé à la gélose nutritive. Le milieu N. A. B. de Difco constitue la phase solide (nutriment agar 2-3 g, NaCl 0,5 g; eau 100 ml) et la phase liquide contient une solution de Locke modifiée (NaCl 8 g; KCl 0,2 g; CaCl₂ 0,2 g; KH₂PO₄ 0,3 g; glucose 2,5 g et eau distillée 1 litre).

Ainsi que Lehman (1961) l'a observé, ce milieu qui convient bien pour l'isolement des cultures n'est pas des plus favorables à leur entretien et comme nous l'avons constaté, il nécessite des repiquages hebdomadaires et mieux bi-hebdomadaires.

Aussi avons-nous préconisé de remplacer le liquide de Locke par du milieu de Parker 199 ou de Hanks enrichi (Jadin et Wéry, 1963).

Ces liquides nutritifs apportent de nombreux acides aminés et des polypeptides qui complètent les substances contenues dans la gélose nutritive et le sang.

Dodin et Fromentin (1962) ont d'ailleurs bien insisté sur l'intérêt du milieu de Parker 199, qui au contact des globules rouges pendant 24 heures à 37 °C devient apte à favoriser la culture de *Trypanosoma gambiense* en l'absence de sérum.

Pour le diagnostic des maladies dues à *T. gambiense* et à *T. rhodesiense*, Weinman (1960) préconise l'utilisation de l'acide polyvinylsulfurique (P. V. S. A.) (Chargaff *et al.*, 1936) comme anticoagulant dans le but de détruire le complément. Le liquoïde « Roche » possède une propriété comparable.

En fait, que le sang soit incorporé dans un milieu solide ou qu'il soit ajouté au liquide physiologique tamponné de Hanks ou de Eagle, il n'y aura pas grande différence.

Un milieu particulièrement simple, mélange de sang et d'eau physiologique, fut défini par von Razgha (1929) et utilisé par Brutsaert et Henrard en 1936. A une solution de Ringer contenant 6 g pour mille de chlorure de sodium et 0,5 g pour mille de cholestérol, on ajoute une quantité égale de sang recueillie sur liquoïde. D'après Neujean et Evens (1952) ce milieu permet de poser un diagnostic de trypanosomiase dans 80 p. cent des cas. Cette technique permet d'isoler les trypanosomes comme de les entretenir, mais on n'obtient jamais de culture massive.

2^d Milieux de cultures monophasiques semi-synthétiques

Les travaux de M. Lwoff (1940) restent à la base des études concernant le métabolisme et les besoins nutritifs des trypanosomidés. Lwoff a en outre précisé que les trypanosomidés parasites des

insectes phytophages se cultivent dans des milieux très simples à base de peptone, de chlorure de sodium et d'aneurine alors que les trypanosomes parasites des insectes hématophages exigent en outre l'hématine et l'acide ascorbique.

C'est en partant de ces principes que les chercheurs ont été amenés à composer des milieux de plus en plus favorables à la culture des trypanosomidés. Ayant observé que les milieux employés pour la culture de tissus permettaient la multiplication des trypanosomes en présence d'extraits embryonnaires de poulets (Weinman, 1957) ou de cellules Hela ou KB utilisées pour la culture des virus, nous en sommes arrivés à préconiser ces mêmes milieux pour la multiplication des trypanosomes en l'absence de cellules. C'est ainsi que dès 1960 nous avons mis au point avec Pierreux un milieu monophasique liquide G. L. S. H. (glucose, lactalbumine, sérum, hémoglobine) dont voici la composition exacte :

Solution physiologique tamponnée de Hanks :

Hydrolysate de lactalbumine	5 g
Sérum de veau	100 ml
Hémoglobine à 3 p. cent	150 ml
Pénicilline	200.000 U
Streptomycine	200.000 mcgr

Nous avons également utilisé le même milieu en remplaçant la solution physiologique tamponnée de Hanks par 9,4 g de BME (Basal Medium of Eagle, 1955). Le pH final est de 7,2. Après filtration sur Seitz (Type κ) les milieux sont conservés à + 4 °C durant quatre semaines au plus.

La répartition est faite dans des flacons de verre neutre soigneusement stérilisés à l'autoclave, puis au four Pasteur peu avant l'emploi et bouchés au caoutchouc. Ce milieu nous a permis d'entretenir nos souches depuis 1960, d'isoler des trypanosomes et d'obtenir des cultures très abondantes. Bien qu'il n'y ait aucune méthode de numération précise pour les cultures de trypanosomes, nous avons obtenu la meilleure estimation avec le celloscope 202 à trois numérateurs de Ljungberg. Ainsi pour *T. cruzi* les cultures au maximum de leur développement renferment de 1 à 1 milliard et demi de flagellates par millilitre et de 3 à 400 millions de *T. gambiense*. Les mêmes résultats ont été obtenus avec *T. brucei*, *T. congolense* et *T. vivax*.

Mais nous estimons qu'on obtient une meilleure appréciation du rendement des cultures en pesant le culot de centrifugation obtenu après quinze minutes à 3.000 tours minute (2.870 g). En moyenne, nous avons obtenu de 1.700 à 2.500 mg par litre pour *T. cruzi*,

de 700 à 950 mg par litre pour *T. brucei* et 600 mg par litre pour *T. theileri*.

Nous étudions actuellement l'influence des différents constituants de notre milieu G.L.S.H. sur les cultures de *T. gambiense*. Les résultats préliminaires obtenus nous permettent déjà quelques constatations. L'augmentation de la concentration en glucose accélère la multiplication des flagellés et l'apparition subséquente d'une lyse sans accroître la quantité totale d'organismes obtenus.

L'augmentation de la concentration en sérum comme celle de l'hydrolysate de lactalbumine réduit la vitesse de développement des cultures et accroît finalement leur abondance.

La longévité des cultures est accrue par le sérum et est réduite par l'hydrolysate de lactalbumine.

Le sérum ne peut être remplacé par l'apport d'acide stéarique, de thiamine et d'acide folique au contraire de ce qu'ont observé Boné et Parent (1956) chez *T. cruzi*.

D'une manière générale, *T. gambiense* est nettement moins tolérant que *T. cruzi* aux variations de concentrations des composants du milieu.

Pour nous, ce sont ces milieux qui semblent les plus favorables et répondent le mieux aux trois exigences, énumérées au début de notre travail : l'isolement, l'entretien et la multiplication massive.

Nicoli en 1961 avait préconisé un milieu à base d'hydrolysate de lactalbumine en solution de Eagle glucosée et Dodin et Fromentin (1962) ont utilisé le milieu de Parker 199 en absence de sérum mais après y avoir mis à incuber des globules rouges pendant vingt-quatre heures à 37 °C pour l'enrichir par la carboanhydrase du sang humain, et en ajoutant une petite quantité de la phase liquide du milieu de Tobie.

Dans une étude ultérieure, Vaucel et Fromentin (1967) en utilisant deux milieux liquides, l'un dérivé de Parker 199 et contenant vingt et un acides aminés et l'autre de celui de Eagle qui n'en contient que treize ont montré que l'on pouvait cultiver *T. gambiense*, souche Eliane, en présence de onze à quatorze acides aminés. La proline et la glutamine paraissent être favorables alors que l'adjonction ou la suppression individuelle de la plupart des autres acides aminés semblent sans avantage réel.

Tout récemment von Brand et Tobie (1967) ont montré que le glucose pouvait être remplacé par la glycérine pour les Trypanosomes du groupe *Salivaria* de Hoare, alors que les *Stercoraria* ne pouvaient guère consommer cet hydrate de carbone et qu'ils utilisaient principalement le glucose.

3° Conservation de la virulence

Quant à la conservation de la virulence dans les milieux de culture les résultats publiés apparaissent contradictoires.

Si Brutsaert et Henrard (1936) avaient pu infecter deux chèvres au moyen d'une souche de *T. congolense* cultivée pendant 156 jours sur le milieu dérivé de von Razgha et si Trager (1959), en ajoutant des tissus de glossines à une culture de *T. vivax* de seize jours et à une autre de trente jours, a pu infecter un mouton, il apparaît que ces résultats n'ont guère été reproduits.

Cependant, Amrein, Geigy et Kauffmann (1965) ont montré que si on partait de souches récemment isolées et qu'on les cultivait sur milieu de Tobie au sang humain préparé depuis peu, on pouvait obtenir des cultures capables d'infecter les animaux à condition d'utiliser du sang de donneurs différents, et à condition d'attendre huit jours au moins pour voir apparaître la virulence qui atteint son maximum le dix-huitième jour.

L'inositol, comme le tréhalose que Weinman avait préconisé, ne paraît avoir aucune influence.

Discussion

Notre expérience de la culture des Trypanosomes nous apprend cependant que le départ d'une culture ne se fait pas à partir de quelques protozoaires. Si l'ensemencement comporte un très petit nombre de parasites, il reste le plus souvent sans résultat.

A cet égard, il est peut-être nécessaire de faire appel aux enseignements que nous fournisse le microscope électronique.

Ainsi que J. M. Jadin et J. Creemers (1966) l'ont montré, les granules que l'on retrouve dans les cultures en voile des leptomonas des Leishmanies se retrouvent dans le réservoir flagellaire du protozoaire. Bray (1968) a confirmé cette observation et a retrouvé des granules, qui ne sont que des débris de cytoplasme dans le réservoir flagellaire de *Leishmania enrietti*, prélevés dans la rate du cobaye. Les trypanosomidés se nourrissent d'acides aminés groupés, tels qu'ils ont déjà été édifiés chez leurs congénères, ou qu'ils se retrouvent dans les milieux de culture, ou dans les cellules qu'ils parasitent. Ces groupes d'acides aminés s'accumulent dans le réservoir flagellaire et par pinocytose gagnent l'intimité du protozoaire. On obtiendra, lors d'ensemencement abondant, une multiplication massive grâce à ce processus.

En recourant au milieu G. L. S. H. nous avons pu entretenir trente et une souches appartenant à vingt-sept espèces de Trypanosomidés du groupe *Salivaria* et *Stercoraria*.

Ce qui montre tout l'intérêt de ces milieux semi-synthétiques, c'est la présence dans les cultures de *T. brucei* de forme de multiplication, appelée « *cyst like bodies* » par Deane et Milder (1966) pour le *T. conorhini*, mais que Muniz (1927) avait trouvé dans des cultures de *T. cruzi*. Ces formes existent donc aussi bien chez les *Salivaria* que chez les *Stercoraria*.

Remarquons encore que, dans la nature, les trypanosomes des groupes *Vivax*, *Congolense*, et le *T. brucei brucei* peuvent être transmis mécaniquement et que, de ce fait, il est permis de penser que certaines souches ne peuvent être mises en culture, tout comme les *T. evansi* qui ne peuvent évoluer cycliquement chez la glossine et qu'on n'a jamais réussi à mettre en culture.

Conclusion

Pour isoler et entretenir les trypanosomes africains, il est à recommander de multiplier le nombre de tubesensemencés et les essais. Il faut recourir simultanément au milieu de Brutsaert et Henrard, de Weinman, de Tobie additionné de Hanks ou de Parker et au milieu de Jadin et Pierreux. La culture massive s'obtiendra le mieux en milieu liquide G. L. S. H.

Samenvatting — Recente ontwikkeling der kweektechnieken voor Afrikaanse trypanosomen.

Een éénfasige vloeibare voedingsbodem werd samengesteld die massieve productie van antigenen van Trypanosomidae in de hand werkt, bijzonder deze van de *Salivaria* groep. Een routine onderhoudsmethode van stabiele en overvloedige kulturen wordt in detail beschreven. Deze éénfasige voedingsbodem, GLSH genoemd, bestaat uit Hanks-oplossing, lactalbumine hydrolysaat (5 %), serum (10 %) en haemoglobine (4,5 %).

Summary — Recent developments in cultivation methods of African trypanosomes.

Description of a monophasic liquid medium allowing massive production of Trypanosome antigens, specially from the *Salivaria* group, and description of a method for routine maintenance of stable and abundant cultures. This monophasic medium, called GLSH, contains in Hanks' physiologic solution, lactalbumin hydrolysate (5 %), serum (10 %) and haemoglobin (4,5 %).

Département de Protozoologie, Institut de Médecine
Tropicale Prince Léopold, Nationalestraat 155,
Anvers.

Reçu pour publication le 7 janvier 1969.

BIBLIOGRAPHIE

- Amrein, Y. U., Geigy, R. et Kauffmann, M., On the Reacquisition of Virulence in Trypanosomes of the *Brucei*-group. *Acta tropica*, 1965, 22, 193-203.
- Bone, G. J. et Parent, G., Stearic acid an essential growth factor for *Trypanosoma cruzi*. *J. gen. Microbiol.*, 1963, 31, 261-266.
- Brand (von), T., Tobie, E. J. et Higgins, H., Hexose and Glycerol Absorption by some Trypanosomatidae. *J. Protozool.*, 1967, 14, 8-14.
- Bray, R. S., Communication personnelle, 1968.
- Brutsaert, B. et Henrard, C., La culture des trypanosomes pathogènes. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1936, 16, 457-478.
- Chargaff, E., Bancroft, F. W. et Stanley-Brown, M., Studies on the chemistry of blood coagulation. 1. On the inhibition of blood clotting by substances of high molecular weight. *J. biol. Chem.*, 1936, 115, 155-161.
- Deane, M. P. et Milder, R., A process of Reproduction of *Trypanosoma conorhini* Different from Binary or Multiple Fission. *J. Protozool.*, 1966, 13, 553-559.
- Dodin, A. et Fromentin, H., Premier essai de culture de Trypanosomes en milieu synthétique. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1961, 55, 797-804.
- Eagle, H., The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (Strain HeLa) in tissue culture. *J. exper. Med.*, 1955, 102, 37-48.
- Jadin, J. et Pierreux, G., Un milieu de culture pour Trypanosomidés. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1960, 40, 903-906.
- Jadin, J. et Wéry, M., La culture des Trypanosomidae. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1963, 43, 831-842.
- Jadin, J. M. et Creemers, J., L'ultrastructure des formes en rosaces de *Leishmania tropica* Wright. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1966, 46, 349-354.
- Lehman, D. L., Attempts at the selective cultivation of *Trypanosoma rhodesiense*, *T. brucei* and *T. congolense*. *Ann. Trop. Med. Paras.*, 1961, 55, 440-446.
- Lwoff, M., Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagellés trypanosomidés. *Monographies Inst. Pasteur*, 1940, 213 pp.
- Mathis, C., Sur une modification au milieu de Novy-Mac Neal pour la culture des Trypanosomes. *C. R. Soc. Biol.*, 1906, 61, 550-552.
- Muniz, J., Quelques formes intéressantes trouvées dans des cultures de *Trypanosoma cruzi*. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, 97, 831-823.
- Mac Neal, W. J. et Novy, F. G., In contributions to medical research dedicated to Victor Clarence Vaugham. *Ann. Arbor, Michigan : G. Wd.*, 1903, 549-577.
- Neujean, G. et Evens, F., Valeur pratique de l'hémoculture comme moyen de diagnostic dans la trypanosomiase humaine à *T. gambiense*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1952, 45, 503-516.
- Nicolle, Ch., Culture du parasite du bouton d'Orient. *C. R. hebd. Acad. Sc.*, 1908, 146, 842-843.
- Nicoli, J., Etude préliminaire sur les conditions de culture de *Trypanosoma gambiense*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1961, 54, 77-83.
- Noller, W., Neuer Forschungen auf dem Gebiete der Trypanosomen züchtung. *Arch. Schiff. u. Tropenhyg.*, 1920, 24, 168.
- Novy, F. G. et Mac Neal, W. J., On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J. Infect. Dis.*, 1904, 1, 1-30.
- Razgha (von), A., Über die Züchtung der Menschenpathogenen Trypanosomen. *Z. J. Parasitenkunde*, 1929, 2, 55-56.
- Reichenow, E., Die Züchtung der Pathogenen Trypanosomen. *Arch. Schiff. und Tropenhyg.*, 1934, 38, 292.

- Reichenow, E., Dauerkultur pathogener Trypanosomen. C.R. 12 Cong. Inst. Zool. Lisbonne, 1935, **3**, 1955-1968.
- Tobie, E. J., The cultivation of *Trypanosoma congolense* in vitro. J. Parasit., 1958, **44**, 241-242.
- Tobie, E. J., von Brand, T. et Mehlman, B., Cultural and physiological observations on *Trypanosoma rhodesiense* and *Trypanosoma gambiense*. J. Parasitol., 1950, **36**, 48-54.
- Trager, W., Tse-tsefly tissue culture and the development of Trypanosomes to the infective stage. Ann. Trop. Med. Paras., 1959, **53**, 473-491.
- Vaucel, M. et Fromentin, H., Recherches sur les acides aminés favorables à la culture de *Trypanosoma gambiense* en milieu semi-synthétique liquide. Bull. Acad. Roy. Sc. Outre-Mer, 1967, **2**, 279-284.
- Weinman, D., Cultivation of the African sleeping sickness trypanosomes on improved simple cell-free medium. Proc. Soc. exp. Biol. Méd., 1946, **63**, 456-548.
- Weinman, D., Cultivation of Trypanosomes. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1957, **15**, 153.
- Weinman, D., Cultivation of the African sleeping sickness trypanosomes from the blood and cerebrospinal fluid of patients and suspects. Trans. Roy. Soc. Trop. Med., 1960, **54**, 180-190.
-