

NOTES et INFORMATIONS

Utilisation du milieu « cœur-cerveau-sang de mouton » pour la culture en masse des formes promastigotes de *Leishmanies*

par J.-A. RIOUX, G. LANOTTE, J.-P. DEDET et A. MARTINI-DUMAS

Laboratoire d'Ecologie médicale et Pathologie parasitaire (P^r J.-A. RIOUX), Faculté de médecine,
5, rue Auguste-Broussonet, F 34 - Montpellier

En 1969, nous avons insisté sur l'intérêt du milieu cœur-cerveau-sang pour la culture en masse des formes promastigotes de *Leishmania*. Nous voudrions aujourd'hui rendre compte d'une variante de cette technique dans laquelle le sang de lapin est remplacé par le sang de mouton. L'obtention aisée de plusieurs litres de milieu est alors possible sans nuire pour autant au rendement élevé des cultures.

I. — PROTOCOLE.

La gélose, préparée le même jour, d'une part à base de bacto-agar, d'autre part à base de cœur-cerveau, est distribuée en tubes pyrex 220 × 22 mm et en boîtes de Roux de un litre et additionnée de sang de lapin ou de mouton. Après incubation, les milieux sont ensemencés à partir d'une souche de culture sur NNN. Les cultures sont examinées tous les trois jours pendant un mois. Les numérations sont effectuées à l'aide de la cellule de Thoma.

II. — TECHNIQUE.

Un contrôle de stérilité est effectué sur gélose Sabouraud et bouillon Martin.

1. — *Prise de sang.*

Lapin : la prise de sang par voie droite a été décrite précédemment. Deux lapins sont indispensables pour obtenir les 80 ml de sang nécessaires à l'expérimentation. Ceux-ci sont introduits dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 7 ml de citrate de sodium à 10 % additionnés de 500.000 U de pénicilline.

Mouton : le sang de mouton est prélevé à la veine jugulaire. On utilise, pour ce faire, une aiguille 40/15 montée sur une seringue paraffinée de 100 ml. L'animal est maintenu en position dorsale sur une table, la tête penchée vers le bas. Après avoir lavé la toison à la hauteur du cou, on rase la laine pour découvrir la veine. Un aide comprime celle-ci à l'aide du pouce et de l'index. Placé en face du mouton, à côté de la tête, l'opérateur enfonce alors l'aiguille de bas en haut et prélève 80 ml de sang qu'il introduit comme précédemment dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 7 ml de citrate de sodium additionnés de pénicilline.

2. — *Préparation des milieux.*

— Milieu NNN classique :

Bacto Agar Difco	10 g
NaCl	6 g
Eau distillée	1 l

— Milieu CCS :

Brain Heart Infusion Agar Difco	52 g
Eau distillée	1 l

— Distribution en tubes pyrex 220 × 22 à raison de 16 ml par tube et en boîtes de Roux de 1 litre, à raison de 100 ml par boîte.

— Stérilisation 20 mn à l'autoclave à 120 °C.

— Addition du sang : la moitié des tubes NNN et CCS reçoit 2 ml de sang de lapin, l'autre moitié 2 ml de sang de mouton ; de même pour les boîtes qui reçoivent les unes 10 ml de sang de lapin, les autres 10 ml de sang de mouton.

3. — *Ensemencement.*

Il est réalisé avec la souche XI (K.A. autochtone). La suspension totale est obtenue par le mélange du culot de 12 tubes NNN âgés de 8 jours (au total 40 ml, contenant 5.10^6 *leptomonas* par ml). Les observations sont effectuées sur 4 tubes NNN, 4 tubes CCS, 4 boîtes NNN et 4 boîtes CCS, et ce, pour chaque type de sang, soit au total 16 tubes et 16 boîtes.

Chaque tube reçoit 3 ml d'eau salée à 9 ‰ + 0,3 ml de suspension. Chaque boîte reçoit 30 ml d'eau salée + 2 ml de suspension.

L'ensemencement correspond pour chaque milieu à environ 3.10^5 *leptomonas* par ml pour les boîtes et 4.10^5 *leptomonas* par ml pour les tubes.

III. — RÉSULTATS (tab. 1 et fig. 1).

A. — D'une manière générale, la forme du récipient (tube ou boîte de Roux) n'influe pas sur le développement des cultures.

B. — *NNN sang de Lapin* : croissance jusqu'au 15^e jour : concentration initiale multipliée par 20 ; plateau pendant 8 jours puis régression lente.

NNN sang de mouton : aucune multiplication ; chute rapide du taux initial.

CCS sang de lapin : grande richesse en parasites dès le 6^e jour en particulier en boîtes de Roux. Maximum au 15^e jour. Concentration initiale multipliée par 200. Disparition plus rapide que dans le milieu NNN sang de mouton.

CCS sang de mouton : comportement comparable au précédent. Concentration maximale légèrement plus faible.

IV. — CONCLUSION.

En raison de la longévité des cultures, le milieu NNN classique au sang de lapin peut être conservé pour l'entretien des souches en laboratoire. Pour la fabrication en masse des antigènes, il est recommandé d'utiliser le milieu CCS. Dans ce cas, le sang de mouton, dont l'obtention ne réclame qu'un minimum de manipulation pour un rendement sensiblement voisin, peut être avantageusement substitué au sang de lapin.

TABEAU I

	SANG DE LAPIN										SANG DE MOUTON					
	Tubes					Boîtes					Tubes			Boîtes		
	NNN		CCS			NNN		CCS			NNN	CCS		NNN	CCS	
	n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	n° 5	n° 6	n° 7	n° 8	n° 9	n° 10	n° 11	n° 12	n° 13	n° 14	n° 15	n° 16
Concentration initiale (1) ..	4.10 ⁵	4.10 ⁵	4.10 ⁵	4.10 ⁵	3.10 ⁵	3.10 ⁵	3.10 ⁵	4.10 ⁵	4.10 ⁵	4.10 ⁵	4.10 ⁵	3.10 ⁵	3.10 ⁵	3.10 ⁵	3.10 ⁵	3.10 ⁵
3 ^e jour ..	7.10 ⁵	5.10 ⁵	9.10 ⁵	7.10 ⁵	4.10 ⁵	6.10 ⁵	8.10 ⁵	8.10 ⁵	2.10 ⁵	7.10 ⁵	3.10 ⁵	8.10 ⁴	+	6.10 ⁵	4.10 ⁵	4.10 ⁵
6 ^e jour ..	1.10 ⁶	2.10 ⁶	2.10 ⁶	3.10 ⁶	6.10 ⁶	5.10 ⁶	2.10 ⁷	1.10 ⁷	2.10 ⁵	9.10 ⁵	2.10 ⁵	1.10 ⁵	+	7.10 ⁶	7.10 ⁶	7.10 ⁶
9 ^e jour ..	4.10 ⁶	5.10 ⁶	3.10 ⁶	6.10 ⁶	7.10 ⁶	1.10 ⁷	3.10 ⁸	4.10 ⁸	2.10 ⁵	5.10 ⁶	3.10 ⁶	6.10 ⁴	+	1.10 ⁸	2.10 ⁸	2.10 ⁸
12 ^e jour .	9.10 ⁶	9.10 ⁶	1.10 ⁸	1.10 ⁸	1.10 ⁷	1.10 ⁷	5.10 ⁸	7.10 ⁸	1.10 ⁵	4.10 ⁵	1.10 ⁷	3.10 ⁵	1.10 ⁵	6.10 ⁸	4.10 ⁸	4.10 ⁸
15 ^e jour .	1.10 ⁷	1.10 ⁷	2.10 ⁸	1.10 ⁸	1.10 ⁷	1.10 ⁷	5.10 ⁸	9.10 ⁸	8.10 ⁴	3.10 ⁵	9.10 ⁷	3.10 ⁵	2.10 ⁵	8.10 ⁸	6.10 ⁸	6.10 ⁸
18 ^e jour .	2.10 ⁷	9.10 ⁶	3.10 ⁸	4.10 ⁸	7.10 ⁶	7.10 ⁶	6.10 ⁸	1.10 ⁹	3.10 ⁵	4.10 ⁵	3.10 ⁸	4.10 ⁵	3.10 ⁵	6.10 ⁸	.	.
21 ^e jour .	1.10 ⁷	1.10 ⁷	4.10 ⁸	4.10 ⁸	1.10 ⁷	9.10 ⁶	5.10 ⁸	7.10 ⁸	2.10 ⁵	3.10 ⁵	3.10 ⁸	2.10 ⁵	2.10 ⁵	7.10 ⁸	.	.
24 ^e jour .	1.10 ⁷	1.10 ⁷	5.10 ⁸	6.10 ⁸	1.10 ⁷	8.10 ⁶	3.10 ⁸	3.10 ⁸	1.10 ⁵	2.10 ⁵	3.10 ⁸	1.10 ⁵	1.10 ⁵	4.10 ⁸	.	.
27 ^e jour .	8.10 ⁶	8.10 ⁶	4.10 ⁸	5.10 ⁸	1.10 ⁷	1.10 ⁷	1.10 ⁸	2.10 ⁸	2.10 ⁵	2.10 ⁵	2.10 ⁸	2.10 ⁵	2.10 ⁵	4.10 ⁸	.	.
30 ^e jour .	9.10 ⁶	1.10 ⁷	2.10 ⁷	imm.	8.10 ⁶	8.10 ⁶	imm.	imm.	2.10 ⁵	2.10 ⁵	2.10 ⁷	1.10 ⁵	1.10 ⁵	imm.	.	.
33 ^e jour .	6.10 ⁶	5.10 ⁶	2.10 ⁷	.	4.10 ⁶	5.10 ⁶	2.10 ⁷
36 ^e jour .	4.10 ⁶	4.10 ⁶	imm.	.	3.10 ⁶	2.10 ⁶	imm.
39 ^e jour .	imm. (2)	imm.	.	.	imm.	imm.

(1) Concentration en *Leptomonas*/ml.
 (2) *Leptomonas* immobiles.

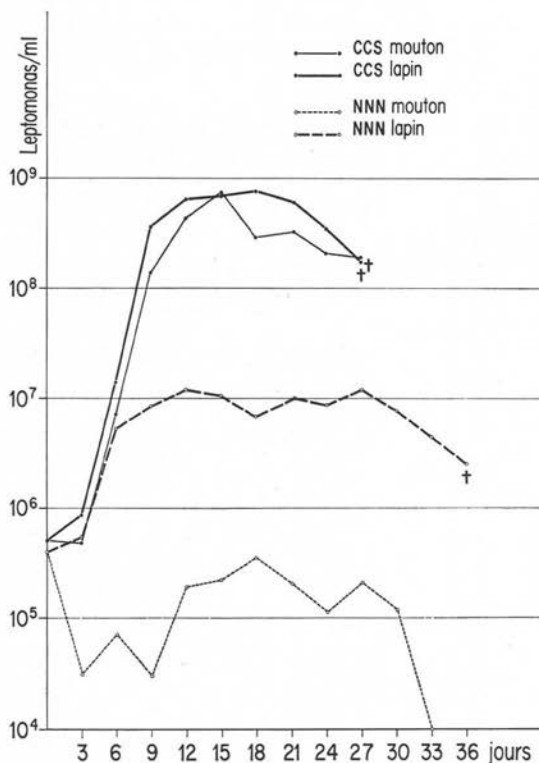


FIG. 1. — Rendements comparés des milieux CCS et NNN, sang de mouton et sang de lapin (moyenne sur deux ensemencements pour chaque série)

Bibliographie

- BERREBI (J.), 1936. — La culture des Leishmanies. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 25 : 89-141.
- BRAY (R. S.) et MUNFORD (F.), 1967. — On the maintenance of strains of *Leishmania* from the Guianas. *J. Trop. Med. Hyg.*, 70 : 23-24.
- CHANG (S. L.), 1947. — Studies on haemoflagellates. I. A semi solid medium and a fluid medium with a solid base for growing various species of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.*, 80 : 164-171.
- DEDET (J.-P.) et LANOTTE (G.), 1969. — Culture en masse de *Leishmania* pour la préparation d'antigènes. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 46 : 69-81.
- FROMENTIN (H.), 1969. — Culture de Trypanosomes dans le milieu de Parker en présence de micro-organismes. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 62 : 1084-1090.
- JADIN (J.) et PIERREUX (G.), 1960. — Un milieu de culture pour Trypanosomidés. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 40 : 903-906.
- LWOF (M.), 1929. — Culture de *Leptomonas ctenocephali* Fantham var. *chattoni*, Laveran et Franchini en milieux privés de sang frais : milieux liquides au sang chauffé. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 22 : 247-252.
- NICOLLE (C.), 1908. — Culture du parasite du Bouton d'Orient. *C.R. Ac. Sci.*, 146 : 842-843.
- RUGAI (E.), 1941. — Cultura de Leishmanias. *Rev. Instituto Adolfo Lutz*, 1 : 153-159.
- TOBIE (E. J.) & REES (C. W.), 1948. — The cultivation of *Trypanosoma cruzi* in dialysate medium. *J. Parasitol.*, 34 : 162-163.