

## NOTES ET INFORMATIONS

---

### MÉTHODE SIMPLE DE CLONAGE DE *LEISHMANIA* SPP.

F. GAMBARELLI, H. DUMON

#### A simple method for cloning *Leishmania* spp.

**SUMMARY.** A rapid and simple technique for isolation of clones of leishmania spp. was developed. This method consists to adapt promastigote forms of *Leishmania infantum* to an easily realized medium: the Panmede solid medium.

We obtained cloned-population of this parasite for epidemiologic and taxonomic studies.

*Key-words:* Leishmania. Taxonomy. Cloned populations. Solid-medium.

---

Il s'agit d'adapter des formes promastigotes de leishmanies sur un milieu de réalisation simple : le milieu au Panmede solide, en vue d'obtenir des populations clonées de ce parasite, dans un but épidémiologique et taxonomique d'une part, diagnostique d'autre part.

#### Matériel et méthode

— *La phase liquide* : le milieu au Panmede.

Nous utilisons un milieu de culture semi-défini, dérivé du milieu proposé par Schnur (1, 7) à base de Panmede (hydrolysate de foie de bœuf) et de sérum de veau fœtal. La formule de la phase liquide, concentrée deux fois, est la suivante :

Panmede <sup>1</sup> .....	2 g
Glucose .....	2 g
NaCl .....	9 g
KCl à 1,15 % .....	20 ml
Sérum de veau fœtal .....	80 ml
Rouge de phénol .....	4 mg
Pénicilline .....	10 U. I/ml
Eau bidistillée .....	500 ml

---

Laboratoire de Parasitologie, Université d'Aix-Marseille, Faculté de Médecine, 27, boulevard Jean-Moulin, F 13385 Marseille Cedex 05.

1. Panmede Paines and Byrne Ltd. Green Ford, Middlesex, England.

Accepté le 3 novembre 1987.

Le pH est ajusté à 8,2 avec une solution NaOH N.

La filtration stérilisante du milieu se fait par passage sur filtres Millipore de porosité décroissante : 3  $\mu\text{m}$ , 1,2  $\mu\text{m}$ , 0,45  $\mu\text{m}$ , 0,22  $\mu\text{m}$  sous pression d'azote.

— *La phase solide*

Nous utilisons une solution d'agarose (Bacto-Agar de Difco) à la concentration de 1 %, 2 %, 3 % et 4 % en eau distillée, stérilisée à l'autoclave.

— *Préparation du milieu*

Différentes concentrations finales en agar sont proposées dans la littérature (5). Nous avons travaillé avec des concentrations finales de 0,5 %, 1 %, 1,5 % et 2 %.

On coule un volume égal de milieu liquide et d'agar dans des boîtes de Pétri adaptées au système Générline<sup>2</sup> permettant la culture en milieu enrichi en CO<sub>2</sub>.

Ce système original associe un générateur individuel de CO<sub>2</sub> placé dans le couvercle de la boîte de Pétri et un joint en plastique assurant l'étanchéité de la boîte. La concentration en CO<sub>2</sub> de 5 % reste stable jusqu'à ouverture de la boîte. Les milieux coulés sont mis à l'épreuve 24 heures à 37° C et stockés à 4° C jusqu'à utilisation dans un délai maximum de 15 jours. Au moment de l'emploi, on rajoute dans le couvercle le générateur individuel de CO<sub>2</sub>, le joint d'étanchéité étant placé avant le coulage du milieu.

— Les souches de leishmania utilisées dans cette étude ont une origine diverse :

- L. infantum*. MCAN/FR/73/LPMA56,
- L. infantum*. MCAN/FR/74/LPMA57,
- L. infantum*. MHOM/FR/83/LPMA66,
- L. infantum*. MCAN/FR/83/LPMA67,
- L. donovani*. MHOM/ET/00/LRC-L210,
- L. tropica*. MHOM/IL/00/LBC-L137,
- L. tropica*. MHOM/FR/72/LPMA60,
- L. b. guyanensis*. MHOM/GF/79/LPMA54,
- L. m. amazonensis*. MHOM/GF/00/LPMA61.

Une adaptation préalable de ces souches en milieu au Panmede liquide est nécessaire. L'inoculation du milieu solide se fait à la phase exponentielle de croissance. La dilution à utiliser est de 3 000 éléments/ml, mesurée par numération des promastigotes en hémostyptomètre.

Un inoculum de 0,1 ml est étalé sur la surface de la gélose avec un inoculateur en verre préalablement flambé.

Les boîtes sont incubées à 26° C dans une étuve ordinaire.

---

2. Generline BioMérieux, Marcy-l'Étoile, 69260 Charbonnières, France.

## Résultats

Après plusieurs essais, nous avons retenu la concentration de 1 % permettant d'obtenir des colonies distinctes et de taille suffisante.

Les colonies apparaissent à partir du 14<sup>e</sup> jour de culture. Elles sont petites, de taille inégale, régulières, translucides ou lactescentes, bien isolées les unes des autres, et réparties de façon homogène sur la surface de la gélose. L'examen microscopique de ces colonies montre des formes promastigotes parfaitement mobiles, ce qui tend à prouver que les leishmanies en culture sur milieu solide conservent et leur mobilité et leur morphologie (6). Ces clones peuvent être repiqués sur milieu liquide ou diphasique afin d'entretenir la souche.

## Discussion

L'intérêt de cette technique réside dans la simplicité de sa réalisation, dans l'utilisation du système Générline permettant de se passer d'une étuve à atmosphère contrôlée en CO<sub>2</sub>. Les autres méthodes proposées par différents auteurs nous semblent plus contraignantes tant sur le plan de la composition du milieu (2, 4) que sur le plan de la méthode de clonage (3).

Son application au clonage de souches de *L. infantum* nous semble essentielle à plusieurs titres :

- typage enzymatique dans un but taxonomique et épidémiologique ;
- obtention d'un matériel antigénique standardisé en vue d'améliorer la sensibilité et la spécificité des réactions immunologiques.

## BIBLIOGRAPHIE

1. DUMON H., MANOURY B., QUILICI M., RANQUE J. : Étude de la croissance de *L. infantum* en culture continue. *C. R. Soc. Biol.*, 1981, 175, 82-86.
2. GOLDBERG S., CHIARI E. : Growth and isolation of single colonies of *Trypanosoma cruzi* in solid medium. *J. Parasitol.*, 1980, 66, 677-679.
3. GRADONI L., GRAMICCIA M., MAROLI M., POZIO E., BETTINI S. : A contribution to the technique of cloning *Leishmania*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1983, 58, 301-303.
4. HILL J. O. : Quantitation of *Leishmania tropica major* by its ability to form distinct colonies on Agar-based Media. *J. Parasitol.*, 1983, 69, 1068-1071.
5. LOVANNISCI D. M., ULLMAN B. : High efficiency plating method for *Leishmania* promastigotes in semi defined or completely defined medium. *J. Parasitol.*, 1983, 69, 633-636.
6. KEPPEL A. D., JANOVY J. : Morphology of *Leishmania donovani* colonies grown on blood agar plates. *J. Parasitol.*, 1980, 66, 849-851.
7. SCHNUR L. F., ZUCKERMAN A., GREENBLATT C. L. : Leishmanial serotype as distinguished the gel diffusion of factors excreted *in vitro* and *in vivo*. *Israel J. Med. Sci.*, 1974, 8, 932-942.