

Article original

Cinétique de *Trypanosoma brucei gambiense* en culture sur milieux KIVI et Cunningham.

Kohagne, T.L.², Nkinin, S.W.¹, Grébaut, P.¹, Njiokou, F.¹, Penchenier, L.¹.

¹ Laboratoire de Recherches sur la Trypanosomiase (LRT) OCEAC

² Université de Yaoundé I.

Résumé

Dans le but d'optimiser l'utilisation de la méthode d'isolement "in vitro" des trypanosomes sanguicoles par le «Kit for In Vitro Isolation» (KIVI), une étude a été réalisée sur 14 KIVI positifs obtenus à partir de malades du foyer de Campo au Cameroun. Une estimation de la densité parasitaire par comptage régulier a été effectuée du jour où les KIVI ont été déclarés positifs à celui où les trypanosomes ont complètement disparu du milieu.

Après application des analyses statistiques, nous avons pu observer que les trypanosomes se multiplient activement dans le KIVI et atteignent leur pic optimal de croissance après 26 jours ± 1 (risque 5%) en moyenne. Il existe une corrélation linéaire négative significative (p = 0,03) entre la quantité de parasites présents dans le KIVI le jour de son ensemencement et le jour où les parasites dans ce KIVI atteignent leur pic optimal de croissance. Ainsi, le nombre maximal de jours mis par les trypanosomes pour atteindre le pic optimal de croissance est significativement d'autant plus bas que la densité parasitaire de départ est élevée. Après ensemencement, un KIVI a besoin d'être surveillé au moins pendant 40 jours avant d'être déclaré négatif. La durée pendant laquelle un KIVI positif conserve les trypanosomes dépasse 50 jours mais elle est variable selon les souches.

La recherche nécessite de grandes quantités de trypanosomes que le KIVI ne peut fournir. Il faut donc passer par une culture de masse sur le milieu de Cunningham. Les repiquages sur ce milieu effectués avant J22 aboutissent à des densités élevées de trypanosomes (1200 x 10⁶ parasites/ml). Tous les repiquages effectués après J34 donnent des densités parasitaires faibles (200 x 10⁶ parasites/ml), insuffisantes pour la recherche.

Il ressort de cette étude que le KIVI est un outil très utile pour l'isolement des trypanosomes sur le terrain. La période de conservation des trypanosomes est suffisamment longue pour permettre d'envisager des missions à condition de ne pas dépasser 3 semaines.

Introduction

La réalisation des travaux de recherches sur les trypanosomes nécessite de disposer de souches au laboratoire. La méthode d'isolement par le «Kit for In Vitro Isolation» (KIVI) Aerts *et al.* (1992) s'est révélée efficace pour l'obtention des souches de *T. brucei gambiense* sur le terrain. Dans ce milieu, les trypanosomes sanguicoles prennent la forme pro-cyclique qui est la forme de développement des parasites chez le vecteur. Cependant, la concentration des trypanosomes en milieu KIVI est insuffisante pour les besoins de la recherche (réalisation des tests sérologi-

ques, études génétiques, etc.). Il faut impérativement passer par une culture de masse. Celle-ci peut se faire sur milieu de Cunningham (Cunningham, 1977) additionné de 20% de sérum de veau fœtal. A l'inverse, le milieu de Cunningham ne peut pas servir sur le terrain pour l'isolement des souches car il ne permet pas le développement des formes sanguicoles. De ce fait, l'obtention des souches de trypanosomes au laboratoire implique l'utilisation conjointe du KIVI comme milieu d'isolement et du milieu de Cunningham pour la culture de masse. Le KIVI est pour cette raison largement utilisé dans les zones d'endémie à forte ou à faible prévalence.



Bull. Inas doc OCEAC 2000 (35 p)

Fonds Documentaire IRD
Cote : B * 22258 Ex : 1

Cependant, des points importants, utiles à l'utilisation du KIVI, ne sont pas tout à fait définis comme le nombre de jours durant lequel un flacon de KIVIensemencé doit être maintenu sur le terrain ainsi que le délai optimal de repiquage.

C'est dans le but d'optimiser l'utilisation du KIVI qu'une étude a été réalisée sur 14 souches de *T. b. gambiense* isolées sur des malades provenant d'une zone endémique du Sud Cameroun, la région de Campo.

Matériels et méthodes

Zone d'étude et dépistage de masse

Cette étude a été réalisée dans un foyer historique de la THA situé dans une région côtière du Sud Cameroun : l'Arrondissement de Campo, département de l'Océan.

Toute la population (5255 personnes) a été examinée sérologiquement grâce au CATT 1.3 (Magnus *et al.*, 1978) sur sang total. Les sujets positifs à ce test ont été prélevés immédiatement au pli du coude pour la réalisation des examens parasitologiques.

Parallèlement, tous les sujets porteurs de ganglions ont subi une ponction ganglionnaire dont le suc a été observé au microscope. Les examens parasitologiques utilisés ont été le Quantitative Buffy Coat (QBC, Bailey, 1992) et la mini colonne échangeuse d'anion (mAEC, Lanham et Godfrey, 1970).

Dix millilitres (ml) de sang prélevés au pli du coude ont été injectés dans les flacons KIVI à raison de 5 ml par flacon puis les flacons ont été conservés à température ambiante.

Une estimation de la densité parasitaire au QBC a été effectuée pour toutes les personnes trouvées trypanosomées.

Observation et comptage

Les flacons KIVIensemencés ont été conduits au Laboratoire de Recherche sur la Trypanosomiase de l'OCEAC. Un comptage régulier à l'aide de la cellule de Thoma a été réalisé du jour où les KIVI ont été positifs à celui où les trypanosomes ont complètement disparu du milieu.

Culture

L'efficacité des repiquages a été évaluée sur cinq KIVI choisis au hasard. Un ml du milieu KIVI à la concentration de $\sqrt{10^6}$ parasites/ml a été repiqué dans un volume de 3 ml du milieu de Cunningham. Pour deux KIVI, six repiquages ont été réalisés et pour les trois autres, seuls trois repiquages ont été effectués. Après chaque repiquage, un comptage régulier était effectué.

Analyses statistiques

Une estimation de la moyenne des différentes densités parasitaires obtenues a été faite. Le nombre total des souches étant inférieure à 30, nous avons normalisé nos valeurs en les transformant par leur logarithme (Combes, 1978 ; Schwartz, 1996). Le test de corrélation et la droite de régression ont été fait avec le logiciel Statview.

Résultats

Les milieux KIVI

A la suite du comptage, une courbe de croissance des trypanosomes a été tracée (figure 1). Les numéros des souches correspondent aux numéros d'identification attribués aux personnes lors de la campagne de dépistage.

Les différentes densités parasitaires obtenues sont regroupées dans le tableau I.

Tableau I

Nombre de jours moyens écoulés en fonction des densités parasitaires.

	D.P. max *	J max *	J100x10 ⁶ *	J 0 *	Demi-vie *
Moyenne	943,92 x 10 ⁶	25,9	40,2	53,9	31,5
Variance	64648,14	4,66	6,25	127,238	9,0
IC à 95 %	1,19	1,07	1,05	1,17	1,64

* D.P. max = densité parasitaire maximale atteinte.

* J max = nombre de jours écoulés pour atteindre la densité maximale.

* J 100 x 10⁶ = nombre de jours écoulés pour avoir une concentration égale à 100 x 10⁶ parasites/ml.

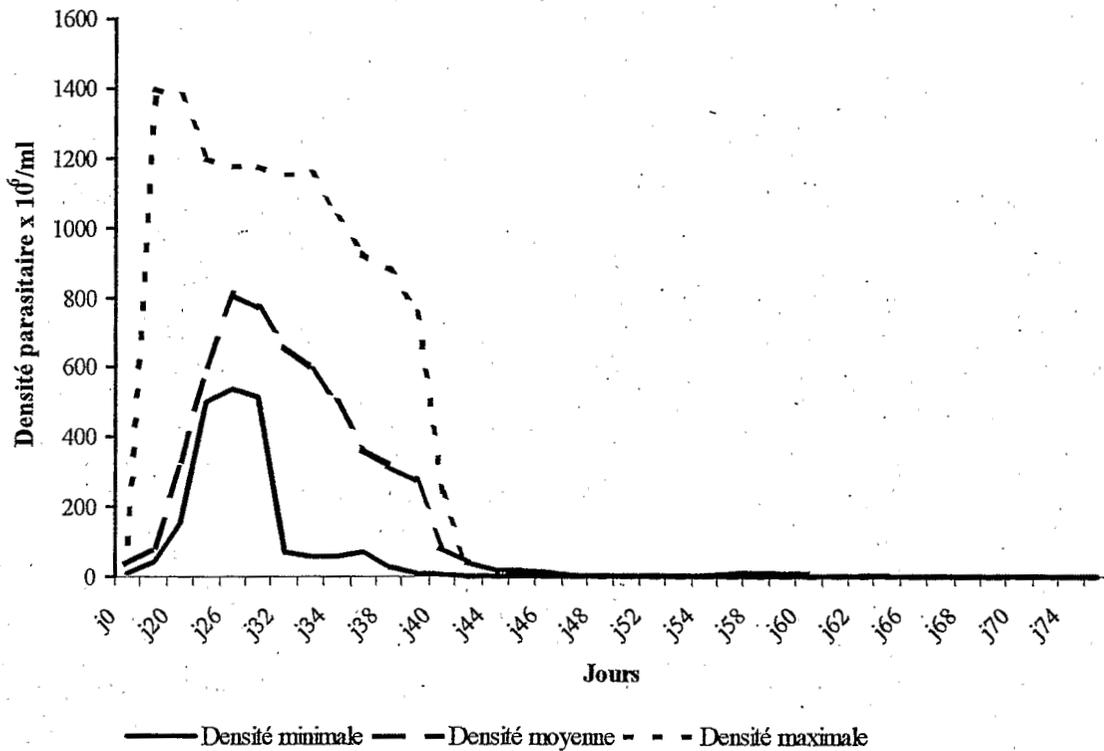
* J 0 = nombre de jours écoulés pour avoir une concentration égale à 0 parasite/ml.

* Demi-vie = Nombre de jours écoulés pour avoir une densité égale à la moitié de la densité maximale.

IC = intervalle de confiance

Figure 1.

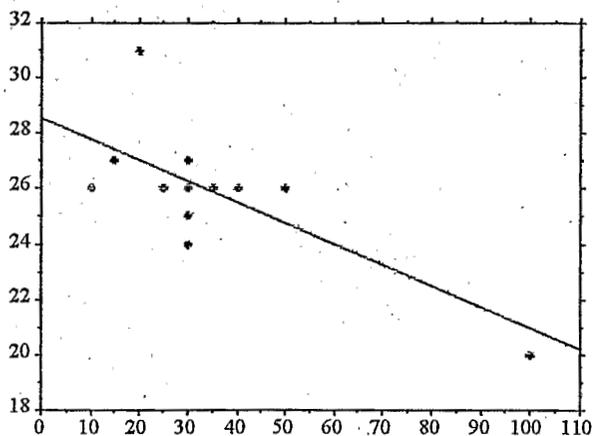
Evolution, en fonction du temps, de la densité de différentes souches de *T. brucei gambiense* en milieu KIVI.



La courbe de régression de la variable y (J max) en x (densité parasitaire de départ) est reportée à la figure 2.

Figure 2.

Droite de régression du nombre de jours écoulés pour atteindre la densité maximale en fonction de la densité de départ.



x = densité de départ

y = nombre de jours écoulés pour atteindre la densité maximale

Equation de droite : $y = -0.076x + 28.526$, $r^2 = 0.545$.

Les milieux de culture Cunningham

Les densités parasitaires maximales obtenues après repiquage en milieu de Cunningham sont reportés au tableau II.

Tableau II.

Densités parasitaires maximales obtenues en milieu de Cunningham en fonction de la période et du nombre de repiquages.

Période	Nombre de repiquages	Densité parasitaire maximale
Avant J22	7 repiquages sur 7	1200×10^6 parasites/ml
A J22	4 repiquages sur 5	1000×10^6 parasites/ml
Après J34	6 repiquages sur 6	200×10^6 parasites/ml

Discussion

La courbe de croissance obtenue montre que les trypanosomes dans le KIVI se multiplient activement et atteignent leur pic optimal de croissance à des jours et à des densités variables. Un KIVI déclaré positif peut le demeurer jusqu'à plus de 60 jours après son ensemencement. La densité maximale de trypanosomes dans le KIVI est significativement corrélée à la densité de trypanosomes lors de l'ensemencement. Le nombre de jours permettant la multiplication maximale des trypanosomes dans le KIVI se situe en moyenne à 26 ± 1 jours (risque 5%).

Il existe une corrélation significative entre la densité des parasites contenus au départ dans le KIVI et leur vitesse de croissance ($p = 0,03$). En conséquence, le nombre maximal de jours mis par les trypanosomes pour atteindre le pic optimal de crois-

sance est significativement d'autant plus bas que la densité parasitaire est élevée. En effet, dans un milieu de culture homogène, le plateau de croissance atteint dépend de la quantité initiale de parasites (Reuner *et al.*, 1997).

A partir de la droite d'équation $y = -0,076x + 28,526$ obtenue en connaissant la densité de l'ensemencement, il est possible d'estimer le jour où l'on peut avoir les trypanosomes en quantité maximale dans un KIVI. Les différentes courbes de croissance obtenues présentent une allure identique mais sont dispersées autour de la courbe moyenne. Ceci démontre que toutes les souches de *T. b. gambiense* ne s'adaptent pas de façon identique dans le KIVI. Au total, 64% (soit 9/14) des KIVI étudiés sont restés positifs au-delà de 50 jours et 36% (5/14) au-delà de 60 jours. Ces observations sont conformes à celles de MacNamara *et al.* (1995) qui ont constaté que toutes les souches de *T. b. gambiense* ne se multiplient pas avec une égale facilité dans le KIVI.

La concentration de trypanosomes dans les flacons KIVI a été maintenue à plus de 100×10^6 parasites/ml pendant 39 jours après ensemencement. Le nombre de jours pour obtenir une densité égale à la moitié de la densité maximale dans le KIVI se situe en moyenne à 32 ± 1 jours (risque 5%). Après ensemencement, un KIVI a besoin d'être surveillé pendant une durée minimale de 40 jours avant d'être déclaré négatif. Ce résultat est conforme aux observations de Aerts *et al.* (1992) qui ont montré que la valeur opérationnelle du KIVI dans les travaux de terrain est en rapport avec la longue période durant laquelle le KIVI alimente la croissance et la viabilité des trypanosomes (25-54 jours, 40 en moyenne).

Il n'y a pas de corrélation significative entre la densité parasitaire initiale et le jour où les trypanosomes disparaissent complètement du KIVI ($p > 0,05$).

Les densités parasitaires maximales obtenues dans le milieu de Cunningham sont variables et sont déterminées par le jour de repiquage.

Le culot de trypanosomes le plus important est obtenu lorsque le repiquage est fait alors que les trypanosomes sont en phase logarithmique de croissance dans le KIVI. La vitesse de croissance des parasites diminue quand la densité parasitaire atteint 1000×10^6 parasites/ml. La phase stationnaire est rapi-

dement atteinte à cause de la forte densité des parasites dans le milieu (Reuner *et al.*, 1997).

Il est donc nécessaire de renouveler le milieu de Cunningham dans chaque flacon de repiquage si l'on désire obtenir une densité plus élevée de trypanosomes.

Conclusion

Ces travaux montrent que la densité maximale des trypanosomes dans le KIVI et le nombre de jours permettant de l'atteindre sont tous les deux significativement corrélés à la densité parasitaire initiale.

Un KIVI peut être déclaré négatif lorsqu'il a été minutieusement contrôlé pendant au moins 40 jours. La durée pendant laquelle un KIVI positif conserve les trypanosomes est suffisamment longue (50 jours minimum) pour permettre d'envisager des missions de longue durée dans les foyers de la maladie (lesquels sont pour la plupart situés dans les zones enclavées, loin des laboratoires et des centres de recherche).

Pour une multiplication rapide des trypanosomes en milieu de Cunningham, il serait préférable de faire des repiquages lorsque les trypanosomes sont en phase exponentielle de croissance dans le KIVI, juste après que le KIVI est déclaré positif. Après J34, le repiquage est toujours possible mais la faible vitesse de multiplication des trypanosomes rallonge la durée d'obtention du culot parasitaire. Il serait préférable d'utiliser le KIVI dans des missions où son utilisation permet un repiquage dans les trois semaines qui suivent son inoculation.

Références bibliographiques

- Aerts, D, Truc, P, Penchenier, L, Claes, Y, Le Ray, D. A Kit for in vitro isolation of trypanosomes in the field : first trial with sleeping sickness patients in the Congo Republic. *Transactions of the royal society of tropical Medicine and Hygiene*, 1992, 86 : 394-5.
- Bailey, J.W, Smith, D.H. The use of the acridine orange QBC technique in the diagnosis of African trypanosomiasis. *Transactions of the royal society of tropical Medicine and Hygiene*, 1992, 86 : 630.
- Combes, C. ABC de parasitologie et statistiques. U.A. CNRS. 698. Cunningham, I., 1977. New culture medium for maintenance of tse-tse tissues and growth of trypanosomatids. *Journal of Protozoology*, 1987, 21 : 325-9.

- Lanham, S.M, Godfrey, D.G. Isolation of salivaria trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Experimental Parasitology*, 1970, 28 : 521-34.
- Mac Namara, J.J, Bailey, J.W, Smith, D.H, Wakhooli, S, Godfrey, D.G. Isolation of *Trypanosoma brucei gambiense* from northern Uganda. Evaluation of the Kit for in vitro isolation (KIVI) in an epidemic focus. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1995, 89 : 388-9.
- Magnus, E, Vervoort, T, Van Meirvenne, N. A card agglutination test with stained *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. *Annales de la société belge de Médecine Tropicale*, 1978, 58 : 169-76.
- Reuner, B, Vassella, E, Yutzy, B, Bosart, M. Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1997, 90 : 269-80.
- Schwartz, D. Méthodes Statistiques à l'usage des Médecins et des Biologistes. Flammarion Médecine Sciences, 1996, 4^{ème} édition.
-



Organisation de Coordination pour la lutte
contre les Endémies en Afrique Centrale

Le Bulletin

de liaison et de documentation
de l'OCEAC

Sommaire

- La vie de l'OCEAC

- Articles originaux :

La quinine injectable diluée par voie intrarectale : une solution pour le traitement précoce du paludisme grave de l'enfant ? Bilan des études cliniques sur les accès graves - Barennes *et al.*

Cinétique de *Trypanosoma brucei gambiense* en culture sur milieux KIVI et Cunningham - Kohagne *et al.*

Consommation de drogues en milieu scolaire au Cameroun : cas de deux lycées à Yaoundé - Etame *et al.*

Complication de l'ulcère gastro-duodéal chez l'enfant camerounais - Njoya *et al.*

Situation du contrôle de la qualité du sel de cuisine au Cameroun en 1998 - Sibetcheu *et al.*

Qualité hygiénique des sandwichs vendus sur la voie publique au Cameroun - Ndayo Wouafo *et al.*

Séroprévalence de l'anticorps anti HCV chez la femme enceinte et transmission materno-foetale du virus de l'hépatite C à Yaoundé - Njoya *et al.*

- Mise au point

- Informations générales

- Revue bibliographique

- Les clés d'Internet

PM 253
19 MAI 2000
Santé

ISSN 0255-5352

Vol. 33 (1) 1^{er} trim. 2000

