TECHNIQUES DE LABORATOIRE
92 DK
ZV 0000 1116
1116

REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DU DEVELOPPEMENT
RURAL ET DE L'HYDRAULIQUE

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES
AGRICOLES (I.S.R.A.)

DEPARTEMENT DE RECHERCHES SUR LES
PRODUCTIONS ET LA SANTE ANIMALES

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES
B.P. 2057

DAKAR - HANN

RAPPORT DE STAGE SUR LA TECHNIQUE DE CULTURE IN VITRO DE COWDRIA RUMINANTIUM SUR CELLULES ENDOTHELIALES BOVINES

DU 5 AVRIL AU 6 MAI 1992

A LA MISSION ANTILLES GUYANE

(GUADELOUPE) - IEMVT

Par Mbaye MBENGUE

REF. N°32/PATHO.ANIM.
SEPTEMBRE 1992.

1. INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, les tentatives de culture in vitro **de Cowdria ruminantium** agent pathogène de la Cowdriose ou heartwater ont été caractérisés par des échecs.

Cependant, en 1990, la technique de culture **de** (C.R.) **Cowdria ruminantium** a été mise en application par D. MARTINEZ de la mission Antilles-Guyane de l'IEMVT.

Le but de notre stage est de maîtriser cette technique de culture afin de l'appliquer dans notre laboratoire avec la souche sénégalaise de C.R.

II. TECHNIQUE DE CULTURE DE C.R. SUR LES CELLULES ENDOTHELIALES

A. Cultures des cellules endothéliales

1) Les cellules adaptées à la culture de C.R.

Cellules BUE Bovine Umbilical Endothelium

BBEC Bovine Brain Endothelium Cells

2) Milieu de culture (cf. annexe)

Il est très important et serait la cause de nombreux échecs passés en matière de culture cellulaire de C.R.

Parmi les différents milieux testés le seul ayant permis le développemen de C.R. est le suivant :

- M.E.M. modifié Glasgow (BHK 21) 10 x
- + Bicarbonate Na (2,75 g/l)
- + Sérum foetal de veau (SVF) ou sérum de veau nouveau né (SVN) 10 p.100
- + Tryptose phosphate Broth deshydrated (TPB) à 2,95 g/l
- + Penistreptomycine 10 UI/100 µg/ml et fungizone (2,5 à 5 µg/ml)

.../...

- + Glutamine 2 m M
- + Gélatine (uniquement pour la culture des BBEC)
- + eau distillée stérile

Le milieu prêt est mis en incubation dans l'étuve à CO_2 (θ = 37" C 5 p.100 CO_2).

3) Technique de culture

Ce sont les techniques classiques.

B. Isolement de C.R. sur cellules endothéliales : B.U.E.

1) Inoculum

- **Broyat de tiques infectées** (Nymphes gorgées)

Désinfecter les tiques à l'alcool et à l'eau de javel, puis rincer 3 fois à l'eau distillée stérile et centrifuger le broyat.

- **Sang**

Le meilleur inoculum récolté stérilement sur héparine à partir du 2è / 3è jour d'hyperthermie chez les ruminants.

2) Isolement

Diluer une partie de sang dans une partie de milieu de culture et mettre
≅ 2 ml dans 1 boîte de 25 cm^2
8 à 10 ml dans 1 boîte de 75 cm^2
incuber 1 à 2 heures à l'étuve 37°C

Bien rincer le tapis cellulaire 3 à 4 fois avec du milieu de lavage (100 ml Glasgow + bicarbonate) jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de sang et ajouter le milieu de culture. Changer le milieu le lendemain, puis tous les trois jours.

Remarque : Quand on inocule avec du sang, les plages apparaissent entre 10 jours à 3 semaines.

C. Inoculation de cellules BUE saines par des cellules infectées à C.R.

1) Inoculum

- Utiliser le surnageant d'une culture présentant un pourcentage de cellules infectées compris entre 70 et 80 p.100 et dont les C.R. sont au stade de corps élémentaires C.E. (coloration rapide R.A.L.).

- Pour une expérimentation, il est nécessaire de centrifuger à 1 000 Rpm pendant 10 mn afin d'éliminer tout débris cellulaire. ainsi, un tel surnageant ne contient que des C.E. et permet une bonne synchronisation des cultures.

2) Inoculation

Nous disposons d'un flacon de 25 cm^2 avec un tapis cellulaire complet :

- jeter le milieu de culture contenu dans le flacon
- inoculer avec 1 à 2 ml de cellules infectées
  laisser 2 heares à l'étuve
- compléter avec 6 ml de milieu glasgow et remettre à l'étuve.
  Observer tous les jours.

Dans nos conditions de culture, le cycle de **Cowdria ruminantium** dure 5 à 6 jours. Il se termine par l'éclatement des morula et la libération des corps élémentaires entraïnant la mort des cellules hôtes. Au cours des passages, la destruction du tapis cellulaire est quasi-complète en 1 ou 2 cycles soit 6 à 12 jours. A ce stade, 90 p.100 des cellules sont infectées quelque soit le stock.

D. Trypsinisation des cellules

Diluer la trypsine au 1/10. Verser le milieu contenu dans le flacon de 75 cm^2 avec un tapis complet de cellules saines.

Mélanger 2 fois les cellules avec: 2 ml de trypsine pour enlever le sérum. Jeter et mettre 2 ml de trypsine en laissant agir 30 secondes.

../...

Tapoter la boîte de façon à faire récoller les cellules et rajouter 10 ml de glasgow *avec* du sérum de veau pour arrêter l'action de la trypsine puis répartir dans 6 flacons de 25 cm^2 à raison de 2 ml/flacon.

Compléter avec 6 ml de milieu glasgow.

Incuber les flacons dans l'étuve à CO_2 5 p.100 en prenant la précaution de les ouvrir légèrement dans le but d'alimenter les cellules en CO_2 pendant 2 heures *et* les refermer.

Observer les boîtes tous les jours en changeant le milieu le lendemain puis tous les 2 à 3 jours jusqu'à obtention d'un tapis cellulaire complet.

Remarque

La trypsinisation sert à multiplier les cellules pour constituer un stock de cellules saines.

1 passage de cellules saines : 1 boîte de 25 cm^2 ⟶ 2 x 25 cm^2
1 boîte de 75 cm^2 ⟶ 2 x 75 cm^2

.../...

III. CONCLUSION

La technique de culture in vitro de C.R. pourra ainsi être appliquée dans notre laboratoire.

L'infection de nos cellules saines par du sang récolté stérilement sur héparine au 3è jour d'hyperthermie à partir de ruminants infectés-nous permettra de faire des passages avec notre souche de C.R. sur les cellules endothéliales.

Des tests de vaccination des ruminants contre la Cowdriose pourront être envisagés dans le cadre de notre programme de recherche sur la Cowdriose Convention DG XII Cowdriose/CEE.

IV. REMERCIEMENTS

Nous adressons nos remerciements les plus chers :

- au Pr. Gerrit UILENBERG, Directeur Scientifique de l'IEMVT et à Mme Glady le responsable de la formation de l'Institut sans qui la formation ne serait pas réalisable,

- au Dr D. MARTINEZ, responsable du laboratoire de Microbiologie de la Mission Antilles-Guyane pour la parfaite organisation du stage et par l'assistance continue qu'il a toujours manifesté pour nous assurer une bonne compréhension

III. CONCLUSION

La technique de culture in vitro de C.R. pourra ainsi être appliquée dans notre laboratoire.

L'infection de nos cellules saines par du sang récolté stérilement sur héparine au 3è jour d'hyperthermie à partir de ruminants infectés'nous permettra de faire des passages avec notre souche de C.R. sur les cellules endothéliales.

Des tests de vaccination des ruminants contre la Cowdriose pourront être envisagés dans le cadre de notre programme de recherche sur la Cowdriose Convention DG XII Cowdriose/CEE.

IV. REMERCIEMENTS

Nous adressons nos remerciements les plus chers :

- au Pr. Gerrit UILENBERG, Directeur Scientifique de l'IEMVT et à Mme Glady le responsable de la formation de l'Institut sans qui la formation ne serait pas réalisable,

- au Dr D. MARTINEZ, responsable du laboratoire de Microbiologie de la Mission Antilles-Guyane pour la parfaite organisation du stage et par l'assistance continue qu'il a toujours manifesté pour nous assurer une bonne compréhension des essais de culture,

- aux Drs E. CAMUS et N. BARRE pour leur disponibilité,

- Messieurs Stephane COISNE et Christian SHEIKBOUDOU par l'excellente assistanc technique qui nous a facilité la mise en application des tests de culture

- au Directeur Général de l'ISRA et au Directeur des Recherches sur la Sant et les Productions animales de nous avoir autorisé à participer à cett étude.

.../...

A N N E X E

1. Congélation des cellules endothéliales

- Trypsiner les cellules dans une boîte de 75 cm^2.
- Mettre dans un tube conique et centrifuger à 300 g (1 200 tours/mn pendant 10 mn.
- Jeter le surnageant et reprendre le culot dans 1 ml de milieu de congélation composé de : (moitié Milieu Glasgow + moitié SVF + **10** p.100 de DMSO). Ce milieu doit être gardé au frais à l'avance. Le culot est mis dans des tubes de Nunc et enroylé avec du coton et bien fermé.
  Les tubes sont places dans une boîte en polystyrène et incubés à - 80°C (Numéroter les tubes BUE + passage + date).
  Au bout de 24 heures, ils sont trempés dans l'azote liquide.

2. Décongélation des cellules endothéliales

- Sortir les tubes de l'azote liquide et les placer au bain-marie à 37°C en procédant le plus rapidement possible et en agitant.
- Bien désinfecter les tubes à l'alcool sous la hotte.
- Diluer au moins 10 fois l'aliquot dans un milieu Glasgow et le mettre dans un flacon de 75 cm^2.
- Incuber dans l'étuve à CO_2. Après 24 heures, changer le milieu.

Remarque : Ne jamais décongeler toutes les cellules en même temps.

3. Congélation des Cowdria

- Gratter le tapis cellulaire et (bien mettre en suspension les **Cowdria** dans le cas d'un passage);
- Centrifuger le tout à 2 500 tours pendant 15 mn à 25°C.
- Réduire le surnageant (garder 2 ml)

.../...

- Bien mettre en suspension le culot + le reste du surnageant (2 ml) + 10 p.100 de CMSO dans 1 tube stérile de NUNC en marquant la souche la daté et passer dans l'azote liquide.

4. Tampons

- Bicarbonate de Na (Hydrogénocarbonate de Sodium $NaHCO_3$)
5,5 p.100

Peser 5,5 g de bicarbonate, mettre dans un récipient et rajouter 100 ml d'eau distillée. Agiter pour bien mélanger (dissoudre) et passer à la filtration sur filtre millipore 0,22 µ dans des flacons de 100 ml stériles (sous la hotte). Conserver à + 4°C.

- Sérum foetal de veau ou sérum de veau nouveau-né SVF ou SVN 10 p.100

Quand on décongèle 1 flacon de 500 ml, congeler 4 x 100 ml et travailler avec les 100 ml.

Tryptose Phosphate Broth deshydrated (100 x, 29,5 g/100 ml)

Peser 29,5 g et mettre dans un bécher puis rajouter 100 ml d'eau distillée Répartir 10 ml/flacon et dévisser légèrement les flacons et les passer à l'autoclave 15 mn. Refermer les flacons (sous la hotte), mettre du parafilm et marquer TPB 100 + date..

- Pénicilline - Streptomycine Lyophilized en poudre 100 x

Mettre 20 ml d'eau distillée stérile (sous la hotte) et répartir en flacons de 5 ml puis congeler à - 20°C.

- Fungizone 100 x Conservation - 20°C

- Glutamine 100 x 2 MM soit 292,3 g/l

Peser 2,923 g et mettre dans un flacon, rajouter 100 ml d'eau distillée et bien dissoudre puis filtrer sur Millipore 0,22. Répartir 10 ml/tube stérile recouvrir les bouchons de parafilm et les maintenir incliné.

Conservation à - 20°C.

.../...

- Bien mettre en suspension le culot + le reste du surnageant (2 ml) + 10 p.100 de DMSO dans 1 tube stérile de NUNC en marquant la souche la daté et passer dans l'azote liquide.

4. Tampons

- Bicarbonate de Na (Hydrogénocarbonate de Sodium $NaHCO_3$)
5,5 p.100

Peser 5,5 g de bicarbonate, mettre dans un récipient et rajouter 100 ml d'eau distillée. Agiter pour bien mélanger (dissoudre) et passer à la filtration sur filtre millipore 0,22 µ dans des flacons de 100 ml stériles (sous la hotte). Conserver à + 4°C.

- Sérum foetal de veau ou sérum de veau nouveau-né SVF ou SVN 10 p.100

Quand on décongèle 1 flacon de 500 ml, congeler 4 x 100 ml et travailler avec les 100 ml.

Tryptose Phosphate Broth deshydrated (10 x,29,5 g/100 ml)

Peser 29,5 g et mettre dans un bécher puis rajouter 100 ml d'eau distillée Répartir 10 ml/flacon et dévisser légèrement les flacons et les passer à l'autoclave 15 mn. Refermer les flacons (sous la hotte), mettre du parafilm et marquer TPB 100 + date..

- Pénicilline - Streptomycine Lyophilized en poudre 100 x

Mettre 20 ml d'eau distillée stérile (sous la hotte) et répartir en flacons de 5 ml puis congeler à - 20°C.

- Fungizone 100 x Conservation - 20°C

- Glutamine 100 x 2 MM soit 292,3 g/1

Peser 2,923 g et mettre dans un flacon, rajouter 100 ml d'eau distillée et bien dissoudre puis filtrer sur Millipore 0,22. Répartir 10 ml/tube stérile recouvrir les bouchons de parafilm et les maintenir incliné.

Conservation à - 20°C.

.../...

- **Gélatine** 0,2 p.100

Peser 200 mg et mettre dans un flacon puis rajouter 100 ml d'eau distillée et passer à l'autoclave.

Conserver à + 4°C.

- **Trypsine / EDTA** 10 x (pour 1 litre)

Nacl	80	g/l (ajuster à pH 7,8)/avec NAOH 1N goute à g.
Kcl	2	g/l
Na_2HPO	11.5	g/l
KH_2PO	2	g/l
EDTA Na_2	2	g/l
Trypsine	5	g/l (à conserver à - 20°C)

Laisser bien mélanger pendant 2 heures et mettre 2 ml de rouge de phénol à 1 % (sous la hotte) puis filtrer sur Millipore 0,22 µ dans 1 grand flacon stérile et répartir dans des flacons stériles de 10 ml. Boucher bien et mettre du parafilm. Etiqueter Trypsine 10 x + date et congeler en inclinant les flacons.

5. Milieu

EAGLES GLASGOW MOD. (BHK 21)

	Mg/L
AMINO ACIDS	
1) L-ARGININE HCl	4 2 ,
2) L-CYSTINE	24,00
3) L-GLUTAMINE	292,00
4) L-HISTIDINE .HCl H 0	21,00
5) L-ISOLEUCINE	
6) L-LEUCINE	552,40
7) L-LYCINE HCl	73,10
8) L-NETHIONINE	15,00
9) L-PHENYLALANINE	33,00
10) L-THREONINE	47,60
11) L-TRYPTOPHAN	8,00
12) L-TYROSIME	36,20
13) L-VALINE	93,60
VITAMINS	
1) CHOLINE Cl	2,00
2) Ca-D-PANTOTHENATE	2,00
3) FOLIC ACID	2,00
4) NICOTINAMIDE	2,00
5) PYRIDOXAL HC1	2,00
6) RIBOFLAVINE	0,20
7) THIAMINIUM di Cl	2,00
OTHER COMPONENTS	
1) GLUCOSE H 0	4950,00
2) INOSITOL	3.60
3) PHENOL RED	10,00
4) TRYPTOSE PHOSPHATE BROTH (DIFCO)	2950,00

	Mg
INORGANIC SALTS	
1) $CaCl_2$ $2H_2O$	26
2) $Fe(NO_3)_3$ $9H_2O$	
3) KCl	40
4) $MgSO_4$: 7H 0	20
5) NaCl	640
6) $NaHCO_3$	275
7) NaH_2PO_4 H 0	, 12

Antibiotics:

- Fungizone containing Amphotericon B (Squibb Lab.)
- Novopen 600 mg (1 mill UI) containing Sodium Benzylpenicillon
- Novostep 1g/3ml : 1 ml containing 0,33g, Streptomycin sulfate as base

Stains:

Rapidif as known as Diff Quick.

Réf. cat.	Milieux	$NaHCO_3$ à 5,5% ml/l	Quantité de $NaHCO_3$/litre mM	ml Réf. cat. 16-883	g
10-001	Milieu de base de Eagle (modifié) avec sels de Earle	30,5	20 ou 10	22 ou 11	1.68 ou 0.85
10-031	Milieu de base de Eagle (modifié) avec sels de Hanks		4	5	0.35
10-941	Milieu de base de Eagle pour cellules diploides		20	22	1.68
10-101	Milieu essentiel minimum de Eagle (modifie) sels de Earle	36,4	24 ou 10	27 ou 11	2.00 ou 0.85
10-131	Milieu essentiel minimum de Eagle (modifié) sels de Hanks		4	5	0.35
10-171	Milieu essentiel minimum de Eagle pour cultures en suspension		24	27	2.00
10-201	Milieu 199	40	26.5	29	2.20
10-231	Milieu 199		4	5	0.35
10-250	Lactalbumine de Earle		26.5	29	2.20
10-260	Lactalbumine de Hanks		4	5	0.35
X 10-301	Milieu de Eagle modification de Glasgow	50	33	37	2.75
10-311	Milieu de Eagle modification Alpha		24	27	2.00
10-323	Milieu essentiel minimum de Eagle modification de Joklik		—		—
10-331	Milieu de Eagle modification de Dulbecco		44.5	49	3.70
10-411	Milieu Ham F10		14.5	16	1.20
10-431	Milieu Ham F12		14	16	1.18
10-521	Milieu de Waymouth MG752/1		27	30	2.24
10-551	Milieu McCoy 5A modification de Iwakata et Grace		26.5	29	2.20
10-601	Milieu RPMI 1640	36,4	24	27	2.00
10-661	Milieu CMRL 1066		26.5	29	2.20
10-821	Milieu Fischer		13.5	15	1.12
10-911	Milieu NCTC 135		26.5	29	2.20
		1,5			0,85
	Solution Saline de Hanks	6.4			0.35

Note
[illegible] essentiel minimum de Eagle modification de Joklik est livré avec 2 g/l de bicarbonate de sodium [illegible] dans le milieu

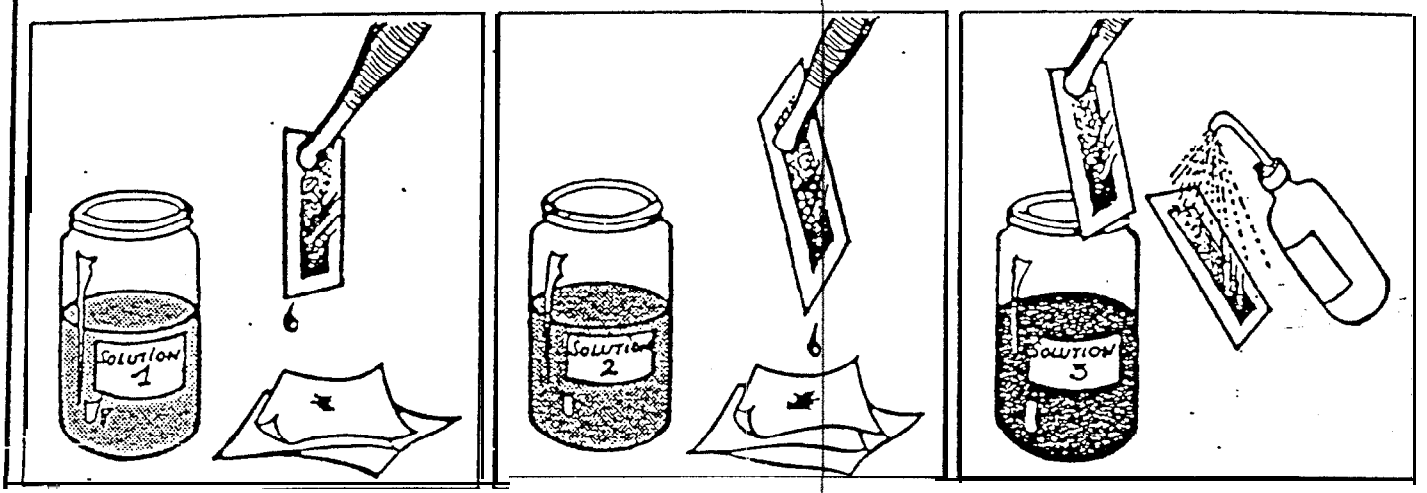
Coffret RAL 555

POUR LA COLORATION RAPIDE DES FROTTIS

Le coffret RAL 555 permet, par une méthode rapide, la coloration différentielle des cellules.

Il est compose de 3 solutions :

- **solution I** — **125 ml** méthanol, à renouveler régulièrement **dans les pays** à degré hygrométrique élevé
- **solution II** — **125 ml solution aqueuse** éosine **RAL, STABLE 1 an** à **température ambiante**
- **solution III** — **125 ml solution** aqueuse, **bleu de** méthylène **RAL, STABLE 6 mois** à température **ambiante en stock, 2 mois** à **partir** de l'utilisation.



FORMULE SANGUINE

Plonger le frottis 5 fois 1 seconde dans la solution I égoutter l'excédent **sur papier filtre.**	**Plonger le frottis 5 fois 1 seconde dans la solution II** bien **égoutter l'excédent,** ne pas laver.	Plonger le frottis **5 fois 1 seconde dans la solution III laver rapidement** à **l'eau** déminéralisée.

L'interprétation **est identique** à **celle des** colorations classiques.

PALUDISME • PIROPLASMOSE

Plonger le frottis 7 minute dans la solution I rincer à l'eau	**Plonger le frottis 2 fois 7 seconde dans la** solution **II rincer rapidement** à **l'eau**	**Plonger le frottis 2** fois **1 seconds dans la solution III** laver à **l'eau courante.**

FILARIOSE

Plonger le frottis 10 fois 7 seconde dans la solution I kgoutter l'excédent sur papier filtre.	**Plonge; le frottis 10 fois 1 seconde dans la solution II bien** égoutter l'excédent, **ne pas laver.**	**Plonger le frottis 10** à **20 fois 1 seconde** dans **la 'solution, III** laver à **l'eau courante.**

TRICHOMONASE

Plonger le frottis 15 secondes dans la solution I,	**Plonger le frottis 1 minute dans la** solution **II essorer** *sur* **papier** filtre.	**Plonger le frottis 1 minute** dans la **solution III** laver à l'eau déminéralisée.

REACTIFS RAL

Société Chimique POINTET-GIRARD, Département Réactifs
35, Avenue Jean • Jaurès **93390 MILLENEUVE • LA • GARENNE**
Tél. 798.17.17 — Téle 6ex 1 0 719 PGCHIMI