ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

TOME XXVIII

1953

N° 1-2

MÉMOIRES ORIGINAUX

TOXOPLASMOSE EXPÉRIMENTALE ET CHORIO-MÉNINGITE LYMPHOCYTAIRE CHEZ LA SOURIS

Par C. VERMEIL et J. MAURIN

Eviter, par un procédé donné de conservation, les passages fréquents et répétés que peut nécessiter l'entretien d'une souche de protiste, est une des préoccupations d'un laboratoire de Parasitologie.

Pour ce qui est de *Toxoplasma gondii*, Manwell et coll. ont donné un protocole précis de la conservation de ce parasite par le froid, nécessitant l'emploi de tubes de pyrex très minces et d'une congélation brutale, ceci pour éviter la toxoplasmolyse ; d'après eux, toute autre manière de procéder est vouée à l'échec.

Nous avons repris un aspect de cette question avec une souche de toxoplasme entretenue sur souris au laboratoire, pour en arriver à l'observation qui fait l'objet de cette note.

Notre souche, d'origine hollandaise, provient d'un cas humain de toxoplasmose. Elle en est à son 295^e passage au début de ce travail. Bien que son pouvoir pathogène pour la souris n'ait pas changé, cette souche a perdu une partie de sa résistance au sérum normal et de sa virulence pour le cobaye.

ANN. DE PARASITOLOGIE, T. XXVIII, n° 1-2. — 1953.

A) *Exp. I.* — Nous avons, dans une première tentative, repris un essai de conservation par le froid de notre souche dans d'autres conditions que celles préconisées par les auteurs précités, c'est-à-dire en mettant de l'exsudat péritonéal de souris, riche en toxoplasmes, dans des ampoules de verre ordinaire; le tout entreposé dans l'atmosphère d'un réfrigérateur à -45° .

Après 10 jours de séjour, cette ascite réchauffée à la température du laboratoire est inoculée par voie péritonéale à un lot de 10 souris, à raison de $0,2\text{ cm}^3$ par animal.

Ces souris, qui normalement ne devraient pas contracter d'infection, présentent pourtant, dès le 7^e jour de l'inoculation, une mortalité surprenante.

En effet, le 7^e et 8^e jour, deux souris sont trouvées mortes, présentant une sérosité pleuro-péritonéale abondante, mais sans trace de parasites. A la ponction, les souris survivantes présentent toutes de l'ascite, mais toujours sans parasites. Elles ont le poil hérissé, de la dyspnée, et manifestent un ralentissement de leur activité.

Les frottis des divers organes des deux souris spontanément mortes ne présentent pas non plus, malgré de patientes recherches, trace de parasites.

Le 11^e jour, une nouvelle souris sera trouvée morte dans les mêmes conditions que les deux premières.

Devant ce résultat, nous sommes en droit de penser que la mort des souris est due :

1) soit à une forme non apparente du parasite ayant résisté à la congélation ;

2) soit encore à un deuxième germe surajouté, mis en évidence par lyse des toxoplasmes congelés.

B) Abandonnant le problème de la conservation de notre souche par le froid, nous allons essayer, par passages successifs, soit de faire réapparaître le parasite, soit de mettre en évidence le germe surajouté supposé.

Exp. II. — Dans un premier temps, nous utilisons les souris survivantes du premier essai (*Exp. I.*), dont nous sacrifions trois le 9^e jour de leur inoculation.

Les frottis d'ascite, de sang et des principaux organes (foie, rate, poumon, cerveau) sont négatifs quant aux parasites. De chacune de ces trois souris, les éléments précités sont inoculés séparément par voie péritonéale, soit directement (ascite, sang), soit après broyat (rate, foie, poumon, cerveau), à des lots de deux souris, ce qui fait en tout 36 animaux. Dans un délai de 7 à 12 jours, 17 souris de ce premier passage sont trouvées mortes. Aucune ne présente de parasites ni dans l'exsudat pleuro-

péritonéal, ni dans les frottis des divers organes. Les survivantes présenteront toutes, à la ponction, de l'ascite, mais seront toujours négatives en protistes.

A partir de deux animaux survivants du premier passage, nous opérons dans les mêmes conditions un deuxième passage pour obtenir en gros les mêmes résultats :

1° le toxoplasme ne réapparaît pas ;

2° la moitié des souris meurent dans un délai variant de 7 à 12 jours, présentant avant leur mort des signes mineurs de morbidité : poil hérissé, dyspnée, ralentissement de l'activité.

Exp. III. — Dans l'espoir d'obtenir des phénomènes plus nets, nous avons repris ces expériences avec de l'ascite de souris riche en toxoplasmes, conservée dans les mêmes conditions que dans l'expérience I, mais cette fois en ajoutant la voie d'inoculation cérébrale à la voie péritonéale jusqu'à maintenant seule utilisée. Ainsi cinq souris reçoivent l'ascite à raison de 0,02 cm³ par voie cérébrale et 0,2 cm³ par voie péritonéale.

Dès le cinquième jour, les souris ont toutes le poil rebroussé et de la dyspnée.

Le sixième jour, s'ajoutent à ce tableau des tremblements. La ponction péritonéale ne révélera de toxoplasmes chez aucune. Devant cet état de morbidité, le même jour, nous sacrifions deux de ces souris et de chacune un broyat de rate, foie, poumon, cerveau préparés ensemble, est inoculé dans le cerveau et le péritoine de trois souris dans un premier passage. Les frottis de ces organes n'ont pas présenté de toxoplasmes.

Les 3 souris restant du lot inoculé avec l'ascite seront trouvées mortes le septième et huitième jour de leur inoculation, raidies, les pattes postérieures en extension.

Les souris du premier passage vont subir le même sort que les précédentes et le sixième jour nous assisterons, en la provoquant chez l'une d'elles par rotation, à une crise tonique caractéristique de la chorio-méningite lymphocytaire de la souris, comme elle est bien décrite dans le travail de B. Kreiss.

L'étude histologique des cerveaux des souris de ce passage viendra confirmer cette première donnée clinique.

Tout s'éclaire : à chaque passage effectué pour l'entretien de notre souche de toxoplasme, nous transmettons aux souris le toxoplasme et en même temps le virus de la chorio-méningite lymphocytaire, tous deux contenus dans l'ascite ou dans le broyat de cerveau. La toxoplasmose, tuant les souris au bout de 5 jours, voile les manifestations du 6^e et 7^e jour de la maladie d'Armstrong. Dans notre premier essai de conservation par le froid de notre souche de toxoplasme, comme c'était à prévoir selon les résultats des auteurs

américains, le toxoplasme a été tué, le virus conservé et de ce fait isolé ; les souris ont pu alors manifester les signes caractéristiques de la chorio-méningite lymphocytaire quand on a utilisé la voie d'inoculation cérébrale. Nous avons effectué d'autres passages dans les mêmes conditions que le premier et obtenu toujours les mêmes manifestations et la mort des souris le 7^e jour, l'histologie confirmant la clinique.

Exp. IV. — En repartant de l'ascite de souris riche en toxoplasmes de notre souche, ascite filtrée sur bougie Chamberland L2 pour éliminer les toxoplasmes sans les tuer par le froid, les souris inoculées par voie cérébrale avec ce filtrat ont présenté de même les signes de la chorio-lymphocytaire confirmée par l'histologie. Des passages effectués à partir de ces souris sont demeurés régulièrement positifs.

Ainsi, au cours du long entretien de notre souche de toxoplasme, entretien effectué dans divers laboratoires avant de nous être confié, le virus de la chorio-méningite lymphocytaire, qu'il n'est pas rare de rencontrer dans les élevages de souris, s'est immiscé au hasard d'un passage du protiste pour être, comme lui, régulièrement entretenu ; à moins qu'à l'origine, le cas humain hollandais de toxoplasmosé ait été compliqué de maladie d'Armstrong. Il est difficile de se prononcer sur cette éventualité (1).

C) Nous avons complété l'étude du virus isolé, pour confirmer encore son identité, par des épreuves de neutralisation croisée à partir de sérums neutralisants, préparés avec une souche connue de virus de la chorio-méningite lymphocytaire (C.M.L.).

Nous avons donc préparé des sérums neutralisant à partir :

1° Du virus supposé, séparé de notre souche de toxoplasme, dit virus Tunis.

Le sérum préparé à partir de ce virus sera le sérum anti-virus Tunis (S.A.V.T.).

2° Du virus de la souche Wescott de la C.M.L., entretenue à l'Institut Pasteur de Paris (2), à partir duquel nous préparerons un sérum anti-virus Wascott (S.A.V.W.).

Pour chacun des virus, nous avons procédé ainsi :

Des cerveaux de souris ayant fait la maladie ont été inoculés par voie intra-péritonéale à des cobayes. Les températures de ceux-ci ont été

(1) Les souris des élevages de l'Institut Pasteur de Tunis se sont toujours révélées indemnes de ce virus, malgré des recherches répétées.

(2) Nous remercions vivement M. le Professeur LÉPINE, qui a bien voulu nous confier cette souche.

suivies et les cobayes sacrifiés environ vers le 10^e jour, au plus haut point de leur réaction fébrile. Le virus Wascott tue généralement tous les cobayes ; les cobayes inoculés avec le virus Tunis ne meurent que par exception. Notons que les cobayes inoculés par voie sous-cutanée présentent, au point d'inoculation, de l'œdème hémorragique, ceci pour les deux souches de virus.

Les rates des cobayes sacrifiés sont broyées et émulsionnées au 1/10^e dans un sérum de cobaye dilué à 2 p. 100 dans l'eau physiologique. Des lapins ont été inoculés dans le péritoine cinq fois à cinq jours d'intervalle, avec 10 cm³ de cette émulsion conservée à — 45° à chaque inoculation. Treize jours après la dernière inoculation, les lapins ont été sacrifiés pour en recueillir le sérum.

A chaque inoculation, nous avons parallèlement inoculé des souris comme témoin de la richesse en virus et de la bonne conservation de l'émulsion.

La préparation de nos sérums n'a pas été sans difficulté, ceux-ci ne présenteront jamais un taux d'anticorps considérable.

Le pouvoir protecteur de ces sérums a été recherché par l'inoculation intra-cérébrale à la souris d'un mélange à parties égales de sérum anti-pur et de dilutions progressives de virus après séjour d'une demi-heure à la température du laboratoire.

Toutes les souris utilisées dans ces essais ont été, trois semaines au préalable, soumises à une inoculation intra-cérébrale d'empois d'amidon stérile pour dépister un état d'infection latente.

Pour chaque virus, utilisant comme matériel le cerveau de souris, nous avons fait des dilutions, conformément à la sensibilité respective de ces animaux :

pour le virus Tunis : 1/100^e, 1/1.000^e, 1/10.000^e ;

pour le virus Wescott : 1/100^e, 1/1.000^e, 1/10.000^e, 1/100.000^e.

Des différents essais effectués, il résulte :

a) que notre sérum A.V.T. protège la souris contre une dilution de 1/10.000 de virus Tunis, mais ce sérum se montrera totalement inefficace devant les dilutions les plus pauvres du virus Wescott, dilutions encore efficaces chez les souris témoins ;

b) que notre sérum A.V.W. protège la souris contre une dilution de 1/10.000 de virus Wescott, mais aussi contre une dilution de 1/10.000 de virus Tunis.

Il est bien entendu que, dans tous les cas, nous avons utilisé des souris témoins de nos sérums et de chaque dilution des virus. Ainsi, la neutralisation n'a réussi que dans le sens sérum A.V.W.-virus Tunis. Bien que ces résultats soient partiels, ils n'en constituent pas moins un argument de plus en faveur de l'identification de ce virus séparé de notre souche de toxoplasme.

D) L'identité du virus établie, nous avons cherché à séparer le toxoplasme du virus. S'il est assez facile, dans l'association toxoplasme-virus, de se débarrasser du toxoplasme plus fragile aux agents physiques tels que le froid, l'élimination du virus, tout en conservant vivant le toxoplasme, pose un problème délicat.

Nous nous sommes adressés à deux procédés, dont l'un seulement nous a donné satisfaction :

1) *Par la chaleur*. — Les températures limites de la destruction par la chaleur de nos deux germes sont assez voisines : 20 minutes à 55° pour le virus de la C.M.L., 10 minutes à 60° pour le toxoplasme. Aussi avons-nous cherché si une température moins élevée, mais dont l'action serait prolongée, ne suffirait pas à départager les deux germes, c'est-à-dire par exemple à détruire le virus avant le toxoplasme.

Nous avons donc soumis à la température constante de 37° des lots d'ascite de souris riche en toxoplasmes (200 formes par champ au grossissement de 450) de notre souche, et contenant toujours l'association toxoplasme-virus C.M.L.

Chaque jour, nous prélevons un lot d'ascite :

a) pour en soumettre une partie à — 45°, qui sera ensuite inoculée dans le cerveau de souris pour nous permettre de retrouver ou non le virus de la C.M.L. seul ;

b) l'autre fraction inoculée directement par voie péritonéale à la souris révélera, par la présence ou l'absence de parasites chez ces animaux, le degré de résistance du toxoplasme.

Après plusieurs essais, nous arrivons à la conclusion que :

— la toxoplasmose ne réapparaît plus après que l'ascite inoculée ait séjourné quatre jours à 37° ;

— la C.M.L. réapparaît même après que l'ascite ait séjourné six jours à 37°.

Notons en passant le fait qu'une souris inoculée directement avec de l'ascite conservée cinq jours à 37°, a présenté une ascite abondante contenant quelques toxoplasmes. La souris présentant en outre de la diarrhée, une salmonelle a pu être isolée de l'ascite. Cette deuxième infection surajoutée a donc prolongé le temps de réapparition possible du toxoplasme.

Ce procédé n'a donc pas été utilisable pour isoler le toxoplasme.

2) *Par neutralisation*. — Nous avons cherché à neutraliser le virus avec un de nos sérums neutralisants déjà préparés, dans le matériel utilisé habituellement pour le passage ordinaire de notre souche de toxoplasme, c'est-à-dire : dans l'ascite ou dans le broyat de cerveau de souris, selon la voie d'inoculation intra-péritonéale ou intra-cérébrale. Ce matériel neutralisé quant au virus surajouté, ne devra contenir théoriquement que le protiste seul alors transmissible.

Nous avons utilisé les mêmes méthodes que précédemment et comme matériel, le S.A.V.W. et des dilutions pour lesquelles ce sérum est efficace.

En résultat :

a) Avec les dilutions de broyat de cerveau, même au 1/100.000, si nous retrouvons le toxoplasme, nous retrouvons aussi, après passage, les manifestations et le virus de la C.M.L. Il n'y a donc pas eu neutralisation. Il semble que la présence simultanée de ces deux germes contribue à protéger le virus de la C.M.L.

b) Ce n'est qu'avec la neutralisation de l'ascite diluée au 1/100.000 que nous avons pu obtenir un matériel débarrassé du virus et toujours porteur de toxoplasmes.

*
**

La purification de notre souche de toxoplasme par passage sur souris porteuses d'une immunité provoquée à la C.M.L. ne peut être envisagée, puisque l'immunité à cette maladie chez la souris paraît indépendante de la persistance du virus dans l'organisme. Chez les souris éprouvées, le virus pouvant réapparaître dans les humeurs pour une période assez longue.

L'idéal eût été d'effectuer des passages sur des animaux seuls réceptifs au toxoplasme ; mais, les rongeurs habituellement utilisés pour l'entretien du protiste sont sensibles aussi au virus de la C.M.L. Même le lapin inoculé avec le virus, s'il ne fait pas de maladie apparente, n'en est pas moins porteur du virus dans son sang du 6^e au 10^e jour de l'inoculation.

*
**

Si nous avons insisté sur la façon dont nous avons été mis en présence de cette association de germes, c'est qu'il nous a paru intéressant de rapprocher notre étude de celle de Sabin. En effet, cet auteur dit avoir isolé un agent neurolytique, filtrable et transmissible à partir d'une souche de toxoplasme qu'il tentait en vain de conserver à — 80°. Cet agent provoquait, inoculé dans le cerveau de la souris, une maladie à échéance variable et à tableau clinique et lésions histologiques différents de ceux de la C.M.L. Sabin apparentait son germe à l'agent de la pleuro-pneumonie des bovidés.

Tout ceci revient à dire que l'emploi de la souris pour l'entretien d'une souche de protiste pose un problème particulier de surveil-

lance et d'interprétation, cet animal étant très sensible à une très grande variété de germes.

En application pratique de ces faits, l'entretien d'une souche de toxoplasme avec un élevage suspect de souris requiert la précaution suivante : trois semaines avant d'être utilisés, les animaux recevront dans le cerveau 0,02 cc. d'empois d'amidon stérile pour dépister une infection latente.

Il est curieux, d'autre part, que les auteurs qui ont donné le protocole de préparation des antigènes dérivés du toxoplasme (pour des épreuves allergiques par exemple), et qui ne manquent pas de mettre en garde contre les infections bactériennes surajoutées à la toxoplasmosé chez les souris, ne mentionnent pas la possibilité d'une rencontre éventuelle de virus type C.M.L. dans l'ascite des souris inoculées de toxoplasme. Il nous paraît utile d'insister sur ce point, étant donné l'importance que ces phénomènes peuvent prendre dans l'interprétation de la spécificité de ces antigènes.

L'association toxoplasme-virus a déjà été étudiée, puisque Nicolau et Kopciowska affirment que les lapins infectés préalablement avec le *Toxoplasma caviae* paraissent plus sensibles que les animaux neufs à l'action pathogène du virus rabique fixe. Nous avons été amenés à des conclusions analogues dans le cas de l'association toxoplasme-virus de la C.M.L. Mais, contrairement à ce que nous avons observé dans notre cas, l'infection rabique, nous disent ces deux auteurs, élimine vite l'infection toxoplasmique dans la série des passages, faite en partant d'un cerveau de lapin soumis aux deux infections.

RÉSUMÉ

En essayant de conserver par le froid une souche de toxoplasme, nous avons été amenés à isoler un virus du matériel utilisé pour le passage de la souche du protiste. Ce virus inoculé dans le cerveau de souris a fait apparaître une maladie dont les signes cliniques ont fait penser à la chorio-méningite lymphocytaire. L'histologie des lésions cérébrales et des épreuves de neutralisation croisée à partir d'une souche connue de virus de la C.M.L. ont permis de confirmer cette hypothèse. La toxoplasmosé à échéance plus courte voilait les manifestations de la C.M.L. Nous avons purifié notre souche de toxoplasme avec un sérum neutralisant le virus. Cette association insoupçonnée peut avoir son importance dans la préparation des antigènes dérivés du toxoplasme.

BIBLIOGRAPHIE

- BAUER (F.). — *Toxoplasma gondii*, Untersuchungen über Widerstandsfähigkeit gegen Physikalische und Chemische Einflüsse. *Z. f. Tropenmed. und Parasito.*, III, 1952, p. 497.
- FRENKEL (J. K.). — Dermal hypersensitivity to *Toxoplasma* antigens (toxoplasmins). *Proc. Soc. for Exp. Biol. Med.*, LXVIII, 1948, p. 634.
- KREISS (B.). — *La Maladie d'Armstrong, chorio-méningite lymphocytaire*, Paris, Baillière et fils, 1937.
- MANWELL (R. D.), EDGETT (R.). — The relative importance of certain factors in the low temperature preservation of malarian parasites. *Amer. Jour. Trop. Med.*, XXIII, 1943, p. 551.
- MANWELL (R. D.), COULSTON (F.), BINCKLEY (E.). — Mammalian and avian *Toxoplasma*. *J. Inf. Dis.*, LXXVI, 1945, p. 1.
- NICOLAU (S.), KOPCOWSKA (T.). — Rage à virus fixe et *Toxoplasma caviæ*. *C.R. Soc. Biol.*, CXIII, 1933, p. 885.
- SABIN (A. B.). — I. Isolation of a filtrable, transmissible agent with « neurolytic » properties from *Toxoplasma*-infected tissues. *Science*, LXXXVIII, 1938, p. 189 ; — II. Identification of the filtrable, transmissible neurolytic agent isolated from *Toxoplasma*-infected tissue as a new pleuropneumonia-like microbe. *Science*, LXXXVII, 1938, p. 575.

(Institut Pasteur de Tunis)