

Etude de divers facteurs influençant le comportement des Trypanosomes à basse température

par J. LAPIERRE et TRAN VINH HIEN

[Travail du C.H.U. Cochin — Maternité (Port-Royal)]

Service de Parasitologie, P^r Ag. J. LAPIERRE, 27, rue du Fbg-St-Jacques, F - 75 - Paris-14°
et du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris, Dir. P^r M. LARIVIÈRE,
15, rue de l'Ecole-de-Médecine, F - 75 - Paris-6°]

Résumé

Alors que la conservation prolongée des Trypanosomes est irréalisable à -25° , elle est très possible et même excellente aux basses températures (-79°C = neige carbonique et -196°C = azote liquide), à condition d'agir méthodiquement.

1° Emploi de protecteurs chimiques parmi lesquels le diméthylsulfoxyde (D.M.S.O.) s'avère légèrement supérieur à la glycérine et tous deux nettement plus efficaces que le glycoléthylène. Les taux de concentration à 10 % sont préférables à ceux de 5 % et tout particulièrement à -196°C .

2° Avoir recours à une technique de congélation progressive ménageant des paliers et surtout lors de l'emploi de l'azote liquide.

Le comportement des Trypanosomes, qu'il s'agisse d'espèces ou seulement de souches d'une même espèce, est différent vis-à-vis de la congélation aux basses températures et bien qu'il soit possible de les conserver tous en respectant les précautions énoncées ci-dessus, les pourcentages de survie sont variables.

Dans l'ordre, *T. equiperdum* et *T. brucei* sont les plus résistants, puis viennent les Trypanosomes pathogènes pour l'homme : *T. gambiense* (souche Casamance, Féo, Yaoundé) et enfin *T. cruzi* qui est de loin le plus délicat.

Il est possible que cette fragilité puisse s'expliquer par une structure histo-chimique particulière et en particulier par la teneur en A.D.N. et la constitution des nucléotides.

Summary

Congelation technics for conservation of Bacteria, Protozoa and even metazoa strains have been used since a long time ; but they are now more and more employed.

The results of our experiences show that if a continued preservation of Trypanosomes is not possible at -25°C , it appears to be very easy at low temperatures as -79°C (= carbonic snow) and -196°C (= liquid Azote) under certain conditions :

1° The use of chemical protectors among which diméthylsulfoxyd (D.M.S.O.) is slightly superior to glycerine ; both are much more efficient than glycoethylin. Concentration rate at 10 % is more advisable than 5 %, especially at -196°C .

2° The technic of concentration must be very progressive, going up by gradations, above all when using liquid Azote.

The behaviour of Trypanosomes in congelation at low temperatures is different when using species or only strains of the same species. Although preservation remains possible when respecting the above conditions, the percentages of survival are inconstant.

T. equiperdum and *T. brucei* are the most resistant ; then come Trypanosomes pathogenic for man as *T. gambiense* (Casamance, Féo and Yaoundé strains), and finally *T. cruzi* is far the most delicate of all.

Its fragility may be explained by a particular histochemical structure, perhaps by the A.D.N. content and the constitution of nucleotids.

Les techniques de congélation pour la conservation des souches de Bactéries, de Protozoaires, voire de Métazoaires ou de tissus ont été largement employées de longue date et sont de plus en plus largement utilisées.

En ce qui concerne les Flagellés et plus particulièrement les Trypanosomes, la première expérience remonte à 1904 où Laveran et Mesnil démontrèrent que *T. lewisi* conservait sa virulence après avoir été exposé pendant 15 minutes à -191°C . Depuis, de nombreux auteurs ont étudié les effets biologiques du froid à différentes températures sur divers Trypanosomes et les possibilités de conservation par ces méthodes. Nous citerons, en particulier, les travaux de Gaylord (1908), de Jong (1922), Weinmann et Mac Alister (1947), Levaditi (1952), Molinari et Montezin (1956), Reusse (1956), Polge et Soltys (1957), Walker et Ashwood-Smith (1961), Lumsden et coll. (1961), Cunningham et coll. (1962), Deschiens et Molinari (1963), Ressler et coll. (1965), Mieth (1966), Lapierre et Tran Vinh Hien (1968).

A la lecture de ces travaux, on constate certaines divergences dans les résultats obtenus. Ceci provient sans doute :

— du caractère empirique d'une bonne part des techniques et par-là même de leur diversité,

— du matériel employé, et en particulier, des différences de structure tissulaire et histochimique des différents Trypanosomes,

— du sens très relatif qui est donné aux termes « rapide » et « lent » à propos des vitesses de congélation. Il faut d'ailleurs reconnaître que les critères qui président au choix des techniques de congélation (lente, rapide, ultra-rapide), ne sont basés que sur des phénomènes d'observation, car dans l'état actuel de nos connaissances, on ne connaît pas les raisons pour lesquelles tel tissu résiste mieux à des techniques de congélation lente avec ménagement de paliers, alors que tel autre requiert des techniques de congélation rapide ou ultra-rapide.

De ce fait, alors que notre intention initiale (1964) était simplement de mettre au point une méthode simple, pratique, efficace de conservation de souches destinées autant à l'enseignement qu'à des fins expérimentales, nous avons été amenés à étendre le champ de notre expérience et à aborder l'étude de différents problèmes concernant la composition des milieux de suspension (diluents et substances protectrices), la vitesse de refroidissement, le mode de décongélation, les durées possibles de conservation.

I. — COMPOSITION DES MILIEUX DE SUSPENSION

Certains auteurs (Deschiens), dont les prospections ont été orientées dans un but strictement biologique, congèlent directement le sang afin d'éviter l'introduction d'un facteur artificiel risquant d'adultérer les réponses des Trypanosomes au froid.

Mais sur le plan pratique, lorsqu'il s'agit de conserver du sang trypanosomé, il est nécessaire, dans la majorité des cas, de procéder à une dilution du sang dans une solution saline et surtout d'ajouter un modificateur chimique protecteur.

A. — DILUENTS

Les liquides de dilution qui ont été employés et conseillés sont très variés. Le sérum physiologique à 8 % peut être tout simplement utilisé, mais l'emploi de liquides mieux équilibrés est préférable. Walker (1960) emploie la solution de Ringer. Cunningham et coll. (1963) se servent d'un diluent « BS-2 » composé d'une solution de chlorures (NaCl 100 vol., KCl 4 vol., MgCl₂, 6H₂O 3 vol., CaCl₂, 6H₂O 1 vol.) et d'un liquide tampon au borate à pH 8 dans la proportion de 90 % et 10 %. Le problème du pH est en effet très important. Lumsden et coll. ont démontré que le pouvoir infectant des Trypanosomes était longtemps conservé pour des pH de 7,4 à 8,0 et, au contraire, rapidement perdu à pH 5,8 et 6,6. Berson (1962) avec *T. congolense* obtient de meilleurs résultats avec le liquide de Hanks qu'avec la solution de Ringer glucosée ; il en modifie toutefois la concentration glucosée qu'il élève à 2 % au lieu de 1 %.

Après avoir comparé le sérum physiologique et le liquide de Hanks, nous avons par la suite employé seulement ce dernier produit non modifié, qui nous a donné satisfaction. Des Trypanosomes (*T. cruzi* dont la fragilité sera par la suite mise en évidence),

dilués dans cette solution, vivent encore 48 heures après dans un verre de montre à la température du laboratoire.

Nous nous sommes toujours assurés que le pH de nos milieux de suspension (liquide de Hanks + sang infecté + liquide protecteur) dans lesquels variait le liquide protecteur suivant les expériences (voir ci-après) était très voisin de pH 8 (8 à 8,12).

L'emploi d'anticoagulants tels l'Héparine, le citrate de soude, et le liquide d'Alsever, préconisés par divers auteurs, ne nous paraît pas absolument utile, car le sang peut directement être mis en suspension dans le liquide de dilution dans les proportions variables de 1 pour 10, même plus si le sang est très parasité. Par ailleurs, à plusieurs reprises, lors de travaux antérieurs, nous avons constaté des phénomènes d'altération morphologique avec l'emploi de l'Héparine.

B. — SUBSTANCES PROTECTRICES

En l'absence de protecteur chimique quelles que soient d'ailleurs les modalités de la congélation et les diluents employés, les Trypanosomes résistent très mal à la congélation.

Après cinq minutes de conservation, le pourcentage de survie varie légèrement suivant la souche de Trypanosome employée et le mode de congélation plus ou moins rapide, mais dans les meilleures conditions (technique de congélation lente avec *T. brucei*), les taux de survie sont de l'ordre de un cinquantième. Avec *T. gambiense* (souche Casamance et Yaoundé), les taux de survie sont de un centième. Avec *T. curzi* (souche Tulahuen), tous les Trypanosomes sont détruits.

Toutefois, des broyats de rates et un cœur de Souris infectés avec *T. cruzi* (souche Tehuantepec) conservés à -79°C dans du liquide de Hanks sans glycérine se sont avérés infectants trois mois plus tard. Les formes leishmaniennes des tissus résistent mieux au froid que la forme *Trypanosoma*. Nous avons pu le vérifier, par ailleurs, pour *L. donovani* qui se conserve très bien sans glycérine ou autre protecteur chimique dans les organes (foie ou rate) d'animaux parasités.

De toute façon, deux ou trois congélations et décongélations répétées à la file entraînent la destruction des Trypanosomes. La méthode a d'ailleurs été employée pour la fabrication des antigènes ou dans les tentatives d'immunisation (Fromentin).

Au contraire, avec un protecteur tel que la glycérine, les Trypanosomes supportent seize congélations à -79°C effectuées de cinq en cinq minutes à l'issue desquelles, le pouvoir infectieux est intégralement conservé puisque entraînant la mort de la Souris en quatre jours comme chez les témoins.

On a surtout employé la glycérine dont l'action protectrice, lors de la congélation fut prouvée en 1913 par Keith à l'égard des bactéries, reprises en 1938 par Luyet pour les Anguillules et étendue aux Trypanosomes seulement en 1957 par Polge et Soltys.

La glycérine est une substance stable, non toxique pour les organismes ou les enzymes, qui possède des propriétés exceptionnelles de diffusibilité et de miscibilité. C'est un excellent solvant, très hygroscopique et qui est bien connu pour ses propriétés antigél. Ces propriétés en font un déshydratant par simple diffusion, l'eau passant dans la glycérine jusqu'à atteindre un état d'équilibre. Mais surtout, ces propriétés

ont pour effet de retarder et de ralentir la cristallisation de l'eau et par voie de conséquence, de réduire la quantité de glace formée à une température donnée (Lovelock, 1953), c'est-à-dire que la concentration en sel de la phase liquide au cours de la congélation d'une solution saline sera, pour une même température, inférieure en présence de glycérine, or il a été prouvé que la concentration en sel est le principal facteur dénaturant au cours de la congélation.

La concentration de glycérine nécessaire à atteindre dans les liquides et les tissus pour assurer la résistance à la congélation diffère selon les espèces pouvant varier dans des proportions de 2 à 25 % suivant qu'il s'agit de protistes ou d'insectes, par exemple.

Dans le cas des Trypanosomes, nous avons comparé l'efficacité des taux à 5 et 10 % qui correspondent aux taux généralement employés.

Il est à noter que les effets manifestés par la glycérine ne lui sont pas particuliers. D'autres substances cryoprotectrices à pouvoir pénétrant supérieur à celui de la glycérine et par conséquent protégeant mieux lors des congélations rapides, ont été essayées avec succès lors d'expériences de congélation portant sur divers matériels biologiques. Ces applications ont jusqu'ici été peu étendues aux Trypanosomes (Ressler et coll. 1965). C'est pourquoi nous avons voulu comparer l'activité de deux d'entre elles (Diméthylsulfoxyde et glycoléthylène) à celle de la glycérine.

Ces essais ont été effectués successivement à -79°C (température de la neige carbonique = CO_2 solidifié) et à -196°C (azote liquide).

1° Expérience à -79°C

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL :

Volume du congélat égal à 10 gouttes calibrées (Occ, 5) contenues dans des tubes de verre à parois minces.

Trypanosomes en suspension dans le liquide de Hanks et les différents protecteurs chimiques (glycérine, D.M.S.O., glycoléthylène en concentration à 5 % et 10 %). Quatre souches de Trypanosomes ont été utilisées : trois de *T. gambiense* (Casamance, Yaoundé, Féo) et une de *T. cruzi* (Tehuantepec).

Comptage des Trypanosomes avant la congélation. Congélation effectuée progressivement en partant de la température ambiante pour atteindre -79°C en 5 minutes. Décongélation effectuée rapidement en plongeant les tubes dans l'eau à $+37^{\circ}\text{C}$ après 15 minutes de congélation. Comptage immédiat des Trypanosomes.

La lecture du tableau où sont mentionnés les résultats expérimentaux obtenus permet de dégager un certain nombre de conclusions.

a) Quel que soit le liquide protecteur employé, l'emploi d'une concentration à 10 % est toujours préférable.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

COMPARAISON DE L'EFFICACITÉ DE DIFFÉRENTS PROTECTEURS CHIMIQUES
LORS DE LA CONGÉLATION PROGRESSIVE A — 79° C

	% DE CONSERVATION DES TRYPANOSOMES			
	<i>T. gambiense</i>			<i>T. cruzi</i>
	Casamance	Féo	Yaoundé	Tehuantepec
D.M.S.O. 5 %	66	41	42	24
D.M.S.O. 10 %	86	80	78	50
Glycérine 5 %	76	54	58	20
Glycérine 10 %	87	76	74	34
Glycoléthylène 5 %	65	31	43	4
Glycoléthylène 10 %	76	65	59	19

b) Les meilleurs résultats d'ensemble sont obtenus avec le D.M.S.O. suivi de près par la glycérine, puis le glycol-éthylène.

c) *Trypanosoma cruzi* résiste moins bien à la congélation que *Trypanosoma gambiense* et au sein de cette espèce, l'étude du comportement de plusieurs souches (Casamance, Yaoundé, Féo) fait apparaître des degrés de résistance différents. Dans l'ordre, c'est la souche Casamance qui se montre la plus résistante, puis viennent la souche Féo et la souche Yaoundé dont la résistance est sensiblement équivalente.

2° Expérience à — 196° C

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL :

Volume du congélat égal à 10 gouttes calibrées (Occ, 5). Trypanosomes mis en suspension dans les mêmes conditions que l'expérience précédente. Utilisation de cinq souches de Trypanosomes : *T. gambiense* (souches Casamance, Yaoundé, Féo), *T. cruzi* (Tehuantepec), *T. brucei* (souche Institut Pasteur). Congélation progressive d'abord à — 70° C, puis, ensuite, à — 196° C, en plongeant les paillettes dans le récipient cryobiologique contenant l'azote liquide. Comptage et décongélation des Trypanosomes effectués dans les mêmes conditions que précédemment.

D'une façon générale, les résultats sont superposables à ceux de l'expérience à — 79° C, mais ici, les différences de pourcentage de survie sont nettement plus significatives entre les concentrations à 5 % et 10 %. Enfin, *T. brucei*, introduit dans cette expérience, est plus résistant que les autres espèces de Trypanosomes (*T. gambiense* et *T. cruzi*) précédemment utilisés.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

COMPARAISON DE L'EFFICACITÉ RESPECTIVE DE DIFFÉRENTS PROTECTEURS CHIMIQUES
LORS DE LA CONGÉLATION PROGRESSIVE A — 196° C

PROTECTEURS CHIMIQUES	% DE CONSERVATION DES TRYPANOSOMES				
	<i>T. gambiense</i>			<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>
	Casamance	Féo	Yaoundé		Téhuantepec
D.M.S.O. 5 %	34	41	24	40	14
D.M.S.O. 10 %	80	75	74	80	48
Glycérine 5 %	46,5	48	36	50	4,5
Glycérine 10 %	78	71	69	79	30
Glycoléthylène 5 %	15	28	11	22	2
Glycoléthylène 10 % ...	55	68,5	29	68	16

II. — VITESSE DE CONGELATION

Pour comprendre l'importance de la vitesse de congélation, il faut connaître le mode d'action du froid dans ses effets léthaux. On a invoqué :

— la formation de cristaux de glace au voisinage des cellules pouvant les écraser ou perforer leurs membranes. Cette cristallisation se produirait dans la zone critique de 0° — 15° C ;

— les phénomènes de déshydratation cellulaire entraînant des effets physico-chimiques. Sur le plan physique, la présence dans les cellules de solutions hypertoniques désorganise la structure interne et entraîne la lyse. Sur le plan chimique, les solutions salines concentrées dénaturent les édifices colloïdaux, les gels, les protéines, les enzymes ;

— la notion de choc thermique. Le mécanisme de ce choc thermique aux basses températures reste assez obscur. Il n'est probablement pas le même pour les diverses cellules. Il est probable toutefois qu'il s'agit d'un brusque changement de la pression osmotique.

Pour pallier ces effets léthaux, différents procédés de refroidissement ont été proposés. A notre disposition, nous avons des méthodes de refroidissement donnant des vitesses variant de 100 degrés par seconde (*ultra-rapide*), un degré par seconde (*rapide*), à un degré par minute ou par dix minutes (*lent*, *ultra-lent*).

Certains auteurs sont partisans des méthodes ultra-rapides jusqu'à des températures très basses permettant d'atteindre l'état de vitrification. Dans ce cas, les molécules n'ont pas le temps de prendre les positions nécessaires à la cristallisation en raison de leur mobilité insuffisante à ces températures. Les molécules ainsi immobilisées dans la posi-

tion où elles se trouvaient initialement restent dans une position quelconque caractéristique de l'état amorphe : c'est la solidification vitreuse. Ainsi la vitrification, qui évite la réorganisation des arrangements moléculaires caractéristiques de la cristallisation, a beaucoup moins de chance de bouleverser la structure protoplasmique.

D'autre part, ce procédé permet d'arrêter instantanément tous les processus physico-chimiques de sorte qu'après réchauffement ultra-rapide, ils peuvent retrouver sans troubles leur équilibre.

Il est bien entendu qu'il faut décongeler aussi rapidement pour éviter en sens inverse la cristallisation à partir de l'état vitreux et obtenir directement le passage à l'état liquide.

D'autres auteurs pensent que la congélation ultra-rapide présente des inconvénients, la sensibilité inégale des divers systèmes enzymatiques à l'action du froid entraînent un déséquilibre des activités cellulaires si la congélation est brutale. Au contraire, une congélation lente permet une certaine adaptation progressive grâce aux phénomènes de diffusion.

En fait, les divergences dans les techniques employées et les résultats obtenus peuvent s'expliquer par la différence du matériel employé (globules rouges, gamètes, organes, protozoaires, helminthes, arthropodes), dont les tailles et les structures histo-chimiques sont très différentes.

Pour ne parler que des Trypanosomes, si la taille est équivalente, les structures histo-chimiques sont différentes, ce qui peut expliquer leur différence de comportement. Citons l'exemple de *T. gambiense* et *T. cruzi* dont les différences sont très marquées tant dans le domaine de la constitution des nucléotides que dans le taux d'extraction d'acide désoxyribonucléique pur. Pour *T. gambiense*, la teneur en A.D.N. est de 25 à 30 % et le rapport des bases puriques (guanine/adénine) et des bases pyrimidiques (cytosine/thymine) $\frac{A + T}{G + C}$ est de 1,23. Pour *T. cruzi*, les valeurs correspondantes sont de 45 à 65 % et de 1,05. Or, on sait que la dessiccation et certains phénomènes thermiques dégradent l'A.D.N. et que la sensibilité thermique de l'A.D.N. dépend de la proportion du couple des bases guanine-cytosine.

Pour étudier d'une façon aussi complète que possible le rôle réel joué par la vitesse de congélation, nous avons fait varier celle-ci en agissant sur divers facteurs :

- par simple modification du volume du congélat ;
- par abaissement progressif de la température combiné avec le volume du congélat.

1° Expérience à — 79° C

a) Modification de la vitesse de congélation par variation du volume du congélat.

Selon que l'on opère sur une goutte de suspension de Trypanosomes (calibrée au 1/20 cc) ou sur dix gouttes, l'obtention de la congélation est évidemment obtenue plus ou moins rapidement. Dans le premier cas, les Trypanosomes répartis sous forme d'une mince couche liquidienne sur les parois du tube par agitation sont congelés immédiate-

ment et brutalement au contact direct du froid. Dans le second cas, le volume du congélat étant plus important, les Trypanosomes sont soumis différemment à l'action du froid selon leur position au sein de la masse liquidienne.

Voici les résultats obtenus (exprimés en % de conservation) par congélation directe à -79°C et décongélation 15 minutes plus tard dans l'eau à $+37^{\circ}$ en employant différentes solutions protectrices et différentes souches de Trypanosomes.

SOUCHES DE TRYPANOSOMES	VOLUME EN GOUTTES	GLYCÉRINE		D.M.S.O.		GLYCOL-ÉTHYLÈNE	
		5 %	10 %	5 %	10 %	5 %	10 %
<i>T. gambiense</i> (Casamance)	1	3 %	14 %	14 %	28 %	4 %	6 %
	10	76 %	87 %	66 %	86 %	65 %	76 %
<i>T. gambiense</i> (Yaoundé)	1	0,4 %	6 %	2 %	19 %	0,6 %	0 %
	10	59 %	74 %	42 %	78 %	44 %	60 %
<i>T. gambiense</i> (Féo) ..	1	4 %	10 %	5 %	12 %	0,8 %	1 %
	10	54 %	76 %	42 %	80 %	31 %	65 %
<i>T. cruzi</i> (Tehuantepec)	1	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
	10	20 %	34 %	24 %	50 %	4 %	19 %

On se rend compte que ce ne sont pas les Trypanosomes congelés le plus rapidement (au contact de la paroi) qui survivent, mais bien au contraire ceux qui, enfouis au sein de la suspension, sont relativement protégés des effets directs et brutaux du froid.

b) *Abaissement progressif de la température, combiné avec le volume du congélat.*

En employant des suspensions de Trypanosomes (*T. gambiense*, souche Casamance) dans le liquide de Hanks, plus 10 % de glycérine, correspondant à des volumes de 1, 3, 6, 9, 12 gouttes calibrées au 1/20 cc et en les soumettant soit à la congélation directe à -79°C , soit à la congélation progressive (abaissement de 20° à -79°C en 15 minutes), nous avons pu constater que les pourcentages de survie étaient très différents.

Il est facile de constater à la lecture du tableau que les plus mauvais résultats sont obtenus avec les techniques de congélation rapide. Au contraire, les méthodes de congélation plus lentes, obtenues par augmentation du volume du congélat ou abaissement progressif de la température, donnent des résultats bien meilleurs.

Au cours d'une expérience à part, où nous nous étions placés dans des conditions extrêmes (congélat de 10 gouttes, -79°C atteints en 90 minutes avec 70 minutes entre 0° et -30°C), nous avons néanmoins obtenu un pourcentage de survie de 50 % au lieu de 80 % dans le tableau précédent. Il semble donc qu'une congélation par trop lente, et d'ailleurs sans intérêt pratique, ne soit pas non plus à conseiller.

VOLUME DU CONGÉLAT	POURCENTAGE DE SURVIE	
	Congélation directe — 79° C	Congélation progressive
goutte = 1/20 cc		
1 goutte	12 %	24 %
3 gouttes	35 %	56 %
6 gouttes	40 %	63 %
9 gouttes	44 %	80 %
12 gouttes	50 %	85 %

2° Expérience à — 196° C

a) Modification de la vitesse de congélation par variation du volume du congélat.

Des dilutions de sang trypanosomé sont faites dans le liquide de Hanks + glycérine à 10 % (seul protecteur chimique employé) et, après comptage à la cellule de Malassez, réparties dans des tubes de verre à paroi mince contenant respectivement 1 goutte et 10 gouttes calibrées au 1/20 cc. Les Trypanosomes suivants ont été utilisés : *T. gambiense* (souches Casamance, Yaoundé, Féo), *T. cruzi* (souche Tehuantepec), *T. brucei* (souche Institut Pasteur), *T. equiperdum* (souche Institut Pasteur). Les tubes sont plongés directement dans l'azote liquide et maintenus pendant 15 minutes. Après décongélation au bain-marie à + 37° C, les Trypanosomes sont à nouveau comptés et l'inoculation faite à la souris.

La congélation ultra-rapide, brutale, portant sur une goutte de suspension (1/20 cc), est fatale à tous les Trypanosomes excepté à *T. brucei*, chez qui quelques rares Trypanosomes non observés à l'état direct ont pu survivre sans perdre leur pouvoir pathogène puisque la souris inoculée a fait une infection mortelle. Il faut souligner à ce propos l'importance de l'inoculation à l'animal qui permet ainsi de prouver l'infectiosité du sang là où l'examen microscopique a péché par défaut.

La congélation portant sur un volume plus important (10 gouttes = 1/20 cc) permet d'observer un pourcentage plus élevé de survie et de mettre en évidence les différences de comportement entre les divers Trypanosomes :

- *T. cruzi* : destruction apparente de tous les Trypanosomes. Inoculation à la souris négative.
- *T. gambiense* (Féo) : destruction apparente de tous les Trypanosomes. Inoculation à la souris négative (1).

(1) A l'époque (1965) *T. Gambiense* (Féo), polymorphe, déterminait chez les souris d'entretien de souche une infection chronique de faible intensité. Actuellement, le polymorphisme a disparu et le trypanosome, très bien adapté à la souris, détermine chez elle des infections septicémiques mortelles. Son comportement vis-à-vis du froid s'est modifié dans le sens d'une augmentation de la résistance.

- *T. gambiense* (Yaoundé) : survie de 2 % des Trypanosomes qui par ailleurs conservent leur virulence, souris décédées le 6^e jour.
- *T. gambiense* (Casamance) : survie de 3,5 % des Trypanosomes. Conservation de la virulence. Souris décédées le 6^e jour.
- *T. brucei* : survie de 11 % des Trypanosomes. Conservation de la virulence. Souris décédées le 5^e jour.
- *T. equiperdum* : survie de 34 % des Trypanosomes. Conservation de la virulence. Souris décédées le 7^e jour.

Bien que l'augmentation du volume du congélat, en limitant l'effet du choc thermique pour les Trypanosomes situés au sein de la masse liquidienne, permette d'obtenir de meilleurs résultats, les effets nocifs de la méthode de congélation directe à — 196° C sont évidents.

b) *Abaissement progressif de la température :*

Les mêmes techniques de dilution ont été employées, mais les volumes de congélats ont été constants (10 gouttes calibrées = 1/2 cc).

Dans un premier temps, les tubes contenant les suspensions des différents Trypanosomes sont soumis à l'action d'un bain réfrigérateur d'alcool contenant des petits morceaux de neige carbonique de telle façon que la température de — 70° C soit atteinte progressivement en cinq minutes. Dans un deuxième temps, les tubes sont plongés dans l'azote liquide.

Dans ces conditions, les numérations effectuées avant la congélation puis une minute après le premier palier de congélation à — 70° C et enfin une minute après le deuxième palier de congélation à — 196° C permettent de constater que le pourcentage de destruction correspondant à la deuxième phase de l'opération est insignifiant, à condition toutefois que la concentration du liquide protecteur soit égale à 10 % et non à 5 % (voir tableau concernant l'efficacité des protecteurs chimiques à — 196° C, chapitre I-B).

L'ensemble des expériences portant sur la vitesse de congélation à — 79° C et — 196° C nous permet de conclure que les méthodes de congélation ultra-rapide sont à proscrire et qu'il est préférable de procéder à des congélations progressives. Nos résultats expérimentaux sont d'ailleurs en accord avec ceux de la plupart des auteurs et en particulier de Polge et Soltys (1957), Lumsden et coll. (1961), Resselier et coll. (1965), Mieth (1966).

On peut donc s'étonner que la méthode de congélation rapide (à — 79° C) ait été conseillée par certains auteurs. L'erreur provient vraisemblablement du fait que le terme de « congélation rapide » a été employé dans un sens relatif souvent mal défini et que les techniques adoptées dans le but de les réaliser aboutissaient en réalité à des congélations moins rapides qu'il n'était pensé.

III. — MODE DE DECONGELATION

Plusieurs procédés peuvent être employés :

- exposition du tube contenant le congélat à la température ambiante du laboratoire ;
- décongélation du tube en le plongeant dans de l'eau à différentes températures (20° à 50°).

L'opinion générale en ce qui concerne la vitesse de décongélation est en faveur du mode rapide (voir chapitre II à propos des effets léthaux du froid).

A la température de 50°, il suffit de 15 à 20 secondes pour décongeler un volume de 10 gouttes congelées à — 79° C. Cette technique est néanmoins délicate à employer, car les Trypanosomes s'immobilisent dès la 30^e seconde et ne survivent pas plus de 50 secondes à cette température. A 45°, les Trypanosomes sont bien vivants après deux minutes de contact. De 20 à 40°, les Trypanosomes ne subissent aucun dommage.

Afin d'étudier les effets respectifs des modes de décongélation, il a été nécessaire d'employer les combinaisons suivantes où « C » correspond à la congélation, « D » à la décongélation, « R » à une méthode rapide et « L » à une méthode lente.

CL : congélation à — 79° C obtenue lentement en 15 minutes.

CR : congélation à — 79° C obtenue rapidement en plongeant directement le tube dans un mélange alcool-carboglace.

DL 1 : décongélation obtenue en abandonnant le tube à la température ambiante du laboratoire.

DL 2 : décongélation obtenue en plongeant le tube dans l'eau à 20°.

DR : décongélation obtenue en plongeant le tube dans de l'eau à 50°.

Voici les résultats obtenus pour les combinaisons suivantes réalisées après stockage à — 79° C pendant quinze minutes d'une suspension de 10 gouttes = 1/2 cc de *T. gambiense* (Casamance).

CL + DR	87 % de survie
CL + DL 1	80 % de survie
CR + DR	34 % de survie
CR + DL 2	25 % de survie
CR + DL 1	0 % de survie

L'analyse des résultats, compte tenu des pourcentages de survie très différents en rapport avec le mode de congélation, permet de constater que la méthode de décongélation rapide est préférable. Les précautions à prendre lors de la décongélation semblent toutefois moins importantes qu'à la phase de congélation.

IV. — DUREES POSSIBLES DE CONSERVATION

Nous envisagerons ces possibilités à différentes températures (— 25° C, — 79° C, — 196° C).

1° Conservation à — 25° C

Cette méthode évite l'assujettissement à la fourniture régulière et fréquente de matériel réfrigérant (neige carbonique ou azote liquide), et les congélateurs de type courant permettant d'obtenir cette température sont d'un prix abordable. Malheureusement, les meilleures possibilités de conservation n'excèdent pas 14 jours pour les Trypanosomes les plus résistants : *T. equiperdum* et *T. brucei*. Pour *T. gambiense*, les durées sont variables selon les souches : Casamance, 12 jours ; Yaoundé, 10 jours ; Féo, 7 jours. *T. cruzi* est détruit en deux jours.

La destruction des Trypanosomes n'est pas due aux effets immédiats du froid, car le pourcentage de conservation est très élevé le premier jour (85 à 95 % pour l'ensemble des Trypanosomes à l'exception de *T. cruzi* : 60 %). Cette destruction est progressive, comme le démontrent les décongélations et les numérations faites au fil des jours. Il faut plutôt incriminer le degré de température insuffisamment bas pour bloquer les phénomènes d'oxydation et les réactions enzymatiques. Il est en effet nécessaire de descendre jusqu'à — 50° ou même — 70° pour que toute action enzymatique puisse être considérée comme négligeable.

Il s'agit donc d'une technique inapplicable à la conservation prolongée des Trypanosomes. Elle offre toutefois, à défaut d'autres méthodes, la possibilité de conserver certaines espèces de Trypanosomes pendant des délais limités.

2° Conservation à — 79° C

Après neuf mois de conservation, les pourcentages de survie sont peu modifiés par rapport à ceux observés à la congélation après 15 minutes (voir tableau I, chap. II), confirmant les expériences de Mazur (1962). « Si une population de cellules peut être amenée à survivre à un refroidissement inférieur à — 50° C et au réchauffement immédiat à des températures normales, elle peut être conservée avec succès aussi longtemps que l'on veut. »

Cette température est actuellement la plus employée pour conserver les Trypanosomes et notamment à l'E.A.T.R.O. (East africain Trypanosomiasis Research organisation à Tototo au Kenya) où différentes souches mises en collection sont à la disposition des chercheurs.

Cependant, Méryman (1960) pense que des phénomènes pourraient encore se produire à — 79° C, d'où nécessité d'abaisser la température à — 100° C et même — 190° C pour obtenir une survie après plusieurs années.

Nos expériences actuellement en cours ne nous permettent pas de nous prononcer.

3° Conservation à — 196° C

Après cinq mois de stockage dans le récipient cryobiologique contenant l'azote liquide, la décongélation des suspensions des divers Trypanosomes contenues dans les tubes en matière plastique permet de constater les pourcentages de survie suivants :

T. brucei 80 %, *T. gambiense* (Casamance) 75 %, *T. gambiense* (Yaoundé) 68 %, *T. cruzi* (Tehuantepec) 26 %.

Les possibilités de survie ont été mises en évidence jusqu'au 9^e mois. Au-delà de cette date, qui ne représente certainement pas le degré extrême de possibilité de conservation, nos expériences sont en cours.

Précisons qu'il ne s'agit pas seulement de survie, mais que le pouvoir pathogène vérifié par l'inoculation à la souris est intégralement conservé.

Par ailleurs, les qualités antigéniques et en particulier le pouvoir immunisant sont également conservés puisqu'il a été possible avec la souche de *T. gambiense* (Casamance) d'effectuer des vaccinations par injection de sang parasité dont les Trypanosomes ont été tués par le formol suivant la technique que nous avons employée antérieurement (J. Lapierre et J.-J. Rousset).

Bibliographie

1. ALBRIGHT, MAKINODAN et MAZUR, 1963. — Preservation of antibody — producing cells at low temperature : a method of storage that allows complete recovery of activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 14, 483-493.
2. ALLAIN, DOROTHY S., 1964. — Evaluation of the viability and pathogenicity of hemoflagellates after freezing and storage. *J. Parasitol.*, 50, 604-7.
3. BERSON (J.-P.), 1962. — Utilisation du liquide de Hanks pour la conservation de *T. congolense* par le froid. *Bull. Soc. Path. Exot.*, n° 5, t. 55, p. 804.
4. BOUISSET (L.), BREUILLAUD (J.), CARRÉ (G.), LARROUY (G.) et MICHEL (G.). 1968. — Etude de l'A.D.N. des trypanosomes : *T. gambiense* et *T. cruzi*.
5. CUNNINGHAM (M. P.), LUMSDEN (W. H. R.) et WERBER (W. A. F.), 1963. — Preservation of viable trypanosomes in Lymph tubes at low temperature. *Experimental Parasitology*, 14, 280-284.
6. DESCHIENS (R.) et MOLINARI, 1963. — Le comportement des trypanosomes aux basses températures. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 5, p. 811-820.
7. DIAMOND (L. S.), MERYMAN (H. T.) et KAFIG (E.), 1963. — *Preservation of parasitic protozoa in liquid nitrogen. Reprinted four culture collection : perspectives and problems.* Univ. of Toronto Press.
8. GAYLORD (H. R.), 1908. — The resistance of embryonic epithelium, transplantable mouse cancer and certain organisms to freezing with liquid Air. *J. infect. Dis.*, 5, 443-448.
9. GORDON (R. M.), 1961. — The storage of Trypanosomes in deep freeze. In « Report of the first seminar on fundamental research in trypanosomiasis, 1960 », *Ann. trop. Med. Parasit.*, 55, 137.
10. DE JONG (D. A.), 1922. — *Arch. neerl. Physiol.*, 7, 588.
11. LAPIERRE (J.) et ROUSSET (J.-J.), 1961. — Etude de l'immunité dans les infections à *Trypanosoma gambiense* chez la souris blanche. Variations antigéniques au cours des crises trypanolytiques. *Bull. Soc. Path. Exot.*, tome 54, n° 2, p. 332-336.

12. — et TRAN VINH HIEN, 1968. — Possibilités offertes par la congélation aux basses températures pour la conservation des trypanosomes. *C.R. Soc. Biol.* (Paris), 9 mars 1968.
13. LAVERAN et MESNIL, 1904. — *Trypanosomes et Trypanosomiasés*. Paris, Masson, p. 73-74.
14. LEVADITI (G.-C.), 1952. — Possibilité de conserver *Trypanosoma congolense* et *Plasmodium berghei* à — 70° C. *C. R. Soc. Biol.* (Paris), 146, 179.
15. LUMSDEN (W. H. R.), CUNNINGHAM (M. P.) et WEBBER (W. A. F.), 1961. — Infectivity of trypanosome suspensions preserved at low temperatures. *East African Trypanosomiasis Research organization Report*, janvier, décembre.
16. —, —, 1961. — Effect of Hydrogen Ion Concentration on Infectivity of Trypanosome suspensions. *East African Trypanosomiasis Research organization Report*, janvier, décembre.
17. LUYET (B. J.) et KEANE (J. F.), 1952. — Comparative efficiency of ethylene glycol glucose and sodium chloride in protecting tissues against freezing injury. — *Biodynamica*, 7, 119, 1931.
18. MAZUR, 1962. — Mechanisms of injury in frozen and frozen dued cells. *Spec. conf. coll. Ottawa*, p. 55-68.
19. MERYMAN (H. T.), 1957. — Physican limitations of the rapid freezing methods. *Proc. Roy. Soc. B.*, 147, 452-459.
20. —, 1960. — General principles of freezing and freezing injury in cellular materials. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 85, p. 503-509.
21. MIETH. — 1966. — Tiefgefrierkonservierung verschiedener blut und geweleprotozoen in flussigem stick stoff. *Zeitschrift für Trop. Med. u. Paras.*, 17, p. 103-108.
22. MOLINARI (V.) et MONTEZIN (G.), 1956. — Variations de la virulence de *Trypanosoma congolense* chez la souris après action d'un froid de — 180° C. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 49, 651-654.
23. —, 1956. — Sur le comportement de Trypanosomes et de Plasmodies soumis aux basses températures de la neige carbonique et de l'azote liquide. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 49, 445-450.
24. MORAN (T.), HALE (P. N.), 1932. — Rapid freezing Temperature of storage. *J. Soc. Chem. Ind. London*, 51, 20-23.
25. PELLEGRINI (D.), BALDELLI (B.) et FRESCURAT (T.), 1963. — Conservazione di un Trypanosoma brucei con le basse temperature. *Att. Soc. ital. Sci. Vet.*, 17, p. 512-515.
26. POLGE (C.) et SOLTYS (M. A.), 1957. — Preservation of Trypanosomas in the frozen state. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 51, 519.
27. —, 1960. — In : *Recent research in freezing and drying*, ed. A. S. Parkes and A. V. Smith. Oxford : Blackwell.
28. RANJEVA (G.), 1965. — Trypanosomes pathogènes de l'homme A.D.N. et spécificité. (Thèse Toulouse).
29. RESSELER, LERAY et GOEDVRIEND, 1965. — Conservation de protozoaires particulièrement en cultures, à la température de l'Azote liquide. *Ann. Soc. belge Med. Trop.*, 45, 6, p. 665-678.

30. RICHAUD (J.), FROMENTIN (H.) et DODIN (A.), 1966. — Dosages enzymatiques effectués sur différentes souches de *Trypanosoma gambiense*. *Ann. Parasit.*, t. XLI, n° 6, p. 545-564.
 31. THOMAS (J.-A.), 1963. — *Survie et conservation biologique*, Ed. Masson.
 32. WALKER (P. J.) et ASHWOOD SMITH (M. J.), 1961. — Dimethylsulfoxyde, an alternative to glycerol for the low temperature preservation of trypanosomes. *Ann. Trop. Med. Parasitology*, 55.
 33. WEBBER (W. A. F.), CUNNINGHAM (M. P.) et LUMSDEN (W. H. R.), 1961. — Effect of rate cooling on infectivity of preserved trypanosome suspensions. *East African Trypanosomiasis Research organization Report*, janvier, décembre.
 34. WEINMANN et MAC ALISTER, 1947. — Prolonged storage of human pathogenic protozoa with conservation of virulence: observations on the storage of helminths and leptospiras. *Amer. J. Hyg.*, 45, 102.
-