ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome XLIV

1969

N° 3

Annales de Parasitologie (Paris), t. 44, 1969, n° 3, pp. 217 à 224

MÉMOIRES ORIGINAUX

Etude des possibilités d'utilisation du sarcome TG 180 de la Souris Application à la Toxoplasmose

par P. COUZINEAU et H. BAUFINE-DUCROCQ

(Institut de Parasitologie, Faculté de Médecine de Paris, Dir. P^r M. LARIVIÈRE)

Introduction

Ce travail présente une étude des possibilités d'utilisation en parasitologie du sarcome TG 180 de la souris. Cette expérimentation a été appliquée à la toxoplasmose, néanmoins certaines observations ont été faites avec les trypanozomes et les schistosomes.

Le sarcome TG 180 est une tumeur ascitique, spécifique de la souris et transmissible d'un animal à l'autre par inoculation intrapéritonéale.

Ce sarcome détermine la production d'un abondant épanchement péritonéal, qui peut être ponctionné à intervalles réguliers. L'ascite se développe nettement dix jours après l'inoculation. La durée d'évolution du sarcome est de trois à quatre semaines et permet de récolter environ 50 ml d'ascite, qui est formée pour un tiers de cellules sarcomateuses et pour les deux tiers d'un exsudat qui présente les mêmes caractères immunologiques que le sérum de la souris infectée.

Les possibilités d'utilisation de ce sarcome sont évidentes en biologie. Déjà, certains laboratoires de virologie utilisent cette tumeur ascitique pour pouvoir disposer d'une quantité importante de liquide riche en anticorps viraux. Ce matériel peut aussi être utilisé par les laboratoires de parasitologie soit pour entreprendre l'étude de la multiplication des protozoaires au sein des cellules sarcomateuses, soit pour mesurer commodément, sans sacrifier l'animal, la production d'anticorps après avoir infesté la souris par des protozoaires ou par des helminthes.

PREMIERE PARTIE

Multiplication et conservation des toxoplasmes.

par P. COUZINEAU et H. BAUFINE-DUCROCQ

Résumé

Les différents protocoles qui permettent une abondante multiplication des toxoplasmes sont rappelés, en utilisant la cellule du sarcome T.G. 180.

La conservation intracellulaire *in vitro* pendant plusieurs semaines est étudiée en cellules T.G. 180 et en cellules Hela.

Summary

The various methods are recalled enabling a rich multiplication of toxoplasma, using cells of Sarcome T.G. 180.

During several weeks, intracellular preservation *in vitro* is studied with T.G. 180 cells and Hela cells.

MATÉRIEL

Sarcome TG 180 : Souche résistante à la thioguanide, mise au point par Alan Sartorelli, du Service de Pharmacologie de l'Ecole de Médecine de Yale.

Toxoplasma gondii : Deux souches furent successivement utilisées. La souche Rh n° B 12, fournie par l'Institut Pasteur de Paris, puis une souche Rh isolée en mai 1966 à l'Institut de Parasitologie à partir d'une biopsie splénique effectuée chez une malade hospitalisée à Créteil et présentant une anémie hémolytique à auto-anticorps chauds.

Multiplication et obtention de toxoplasmes intra et extracellulaires.

1° Les cellules du Sarcome TG 180 sont propices à la multiplication intracellulaire des toxoplasmes. La souris meurt d'une toxoplasmose aiguë en trois à cinq jours.

2° Dans certaines conditions, les cellules du Sarcome TG 180 permettent l'obtention :

- soit de suspensions avec de nombreux toxoplasmes intracellulaires,
- soit d'ascite presque dépourvue de cellules et très riche en toxoplasmes libres, plus d'un million par millimètre cube.

Les toxoplasmes **intracellulaires** peuvent être obtenus de deux façons :
ou bien en inoculant les toxoplasmes à une souris qui développe déjà un Sarcome TG 180,

ou bien en inoculant l'ascite cancéreuse antérieurement parasitée par les toxoplasmes à des souris uniquement sarcomateuses.

Les toxoplasmes **extracellulaires** ne sont obtenus qu'à certaines conditions qui ont été précisées au cours d'expérimentations successives.

Au cours d'un premier travail, une première inoculation des toxoplasmes était faite par voie intrapéritonéale à une souris qui avait déjà développé une ascite due au Sarcome TG 180 ; quatre jours plus tard, cette ascite est recueillie, 0,5 ml de cette ascite et un égal volume d'ascite sarcomateuse pure sont injectés simultanément à une souris neuve. Après un nouveau délai de quatre jours, un troisième passage est réalisé chez une souris neuve en utilisant le schéma précédent.

Ultérieurement, ce protocole a été simplifié par suppression des deuxième et troisième passages et de l'apport supplémentaire d'ascite sarcomateuse pure, c'est-à-dire que des souris neuves sont inoculées uniquement avec 1 ml d'ascite sarcomateuse déjà parasitée par les toxoplasmes.

Actuellement, un meilleur procédé est utilisé : l'ascite sarcomateuse et les toxoplasmes provenant respectivement des lots d'entretien des deux souches sont inoculés simultanément à des souris neuves.

Ces modifications se sont imposées au fur et à mesure qu'ont été mieux connues les conditions de multiplication des toxoplasmes à l'intérieur des cellules sarcomateuses.

Les passages successifs des mélanges d'ascite sarcomateuse déjà parasitée et d'ascite sarcomateuse pure nécessitent de nombreuses manipulations toujours aléatoires.

En outre, il est incontestable que l'exsudat qui baigne les cellules cancéreuses et parasitées confère une résistance à la pénétration par les toxoplasmes des cellules sarcomateuses indemnes ; ce fait est mis en évidence en lavant ces cellules parasitées avant de les réinoculer.

La méthode utilisée actuellement permet la suppression de ces inconvénients à condition toutefois que le rapport du nombre de toxoplasmes sur le nombre des cellules sarcomateuses soit tel que toutes les cellules cancéreuses puissent être parasitées simultanément afin que lorsque celles-ci éclateront, les toxoplasmes libres ne trouvent pas de refuge cellulaire intact ; sinon, plutôt que de recommencer l'expérimentation, il est possible d'inoculer la suspension de cellules parasitées à des souris neuves (schéma).

L'étude du développement des toxoplasmes à l'intérieur des cellules sarcomateuses a permis l'obtention à volonté :

— soit d'une suspension de toxoplasmes intracellulaires qui peuvent être maintenus vivants *in vitro*,

— soit d'une suspension très pure d'un très grand nombre de toxoplasmes extracellulaires qui peuvent être utilisés pour la préparation d'antigènes vivants, ou fixés figurés, ou d'extraits.

Conservation des toxoplasmes intracellulaires *in vitro* en cellules Hela et en cellules T.G. 180.

La conservation au laboratoire des souches virulentes de toxoplasmes est toujours laborieuse. Des travaux récents font état d'une longue conservation à -70° et à -190° des souches Rh. Il a paru intéressant d'étudier les possibilités de conservation *in vitro* des toxoplasmes à l'intérieur des cellules sarcomateuses.

A l'Institut de Parasitologie, la multiplication et la conservation des toxoplasmes ont été parallèlement expérimentées *in vitro* sur cultures de cellules Hela et sur cellules TG 180. Ces deux types de culture ont été réalisés avec l'hydrolisat de caséine additionné de sérum de veau et d'antibiotiques.

Sur cellules Hela, il a été possible d'obtenir une bonne multiplication ; au bout de 72 à 96 heures, la moitié des cellules présente un effet cytopathogène et de nombreux toxoplasmes sont libres. Mais, de toute façon, la culture de cellules en lignée continue est délicate et le nombre de parasites extracellulaires par unité de volume inférieur à celui obtenu sur souris sarcomateuse. Certains travaux mentionnent la conservation de la virulence d'une souche de toxoplasmes pendant plusieurs mois en faisant des passages successifs sur bouteilles en les repiquant tous les trois jours. Si ce procédé ne nécessite pas d'animalerie, il est aussi astreignant que l'entretien de la souche *in vivo*.

Depuis longtemps, on sait que l'ascite d'une souris inoculée avec des toxoplasmes et récoltée dans de bonnes conditions d'aseptie garde sa virulence à 4° pendant une dizaine de jours.

Dans les mêmes conditions, sans aucune manipulation, il est possible de conserver à 4° les cultures de cellules Hela. Lorsque la couche cellulaire est continue, on introduit

dans la bouteille de culture 1 ml d'ascite à toxoplasmes ; la bouteille est laissée à l'étuve 48 heures à 37°. A ce moment, les toxoplasmes, pour la plupart, sont encore intracellulaires. Les bouteilles sont alors conservées à une température de 4° C. On a constaté une conservation de virulence des toxoplasmes pendant trois mois et, dans certains cas, pendant six mois. Les souris au premier passage meurent dans un délai moyen de sept jours, puis, lors des inoculations successives, dans un délai de trois à cinq jours.

En revanche, il n'a pas été possible de réaliser *in vitro* avec le milieu à l'hydrolysate de caséine, et la culture des cellules TG 180, et de les parasiter. Néanmoins, des cellules TG 180 parasitées *in vivo* et hébergeant des toxoplasmes intracellulaires, mises en flacons stériles et additionnées de ce même milieu ont été conservées à 4°. Les toxoplasmes conservent leur virulence pendant six semaines sans qu'il soit nécessaire de renouveler le milieu nutritif.

DEUXIEME PARTIE

Préparation d'un antigène purifié ;

Comparaison du sérum et de l'ascite sarcomateuse T.G. 180.

par H. BAUFINE-DUCROCQ et P. COUZINEAU

Résumé

Une fois les toxoplasmes extracellulaires obtenus, une méthode de centrifugation filtration est décrite, en se référant à la méthode principes de Fulton.

Des schémas électrophorétiques, puis la recherche d'un pouvoir complémentaire sont joints à ces expériences.

Summary

Once intracellular toxoplasma are secured, a method of centrifugation filtration is described, based on the principles method of Fulton.

Electrophoresis data, research of complementary power are joined to the tests.

Purification de la suspension de toxoplasmes par filtration.

L'obtention d'un grand nombre de toxoplasmes extracellulaires est intéressante pour permettre la fabrication d'antigènes vivants et figurés. En effet, l'agglutination de Fulton et d'éventuelles méthodes d'immunodiagnostic nécessitent une grande quantité d'antigènes.

La préparation d'une suspension antigénique est facilitée si l'on obtient des parasites extracellulaires. Il a d'ailleurs été impossible de libérer les toxoplasmes des cellules TG 180 que ce soit par la chaleur, le froid ou l'agitation mécanique ; encore faut-il séparer les toxoplasmes libres des débris cellulaires et de quelques cellules intactes.

Après lavage du péritoine de la souris infectée avec du soluté physiologique, des centrifugations successives permettent de recueillir les toxoplasmes libres dans le surnageant, mais pour garantir une pureté très grande de l'antigène, il est nécessaire d'effectuer une filtration sous vide de la suspension. Les essais furent très nombreux.

Dans un premier temps, comme l'a proposé Fulton, les filtres en verre fritté d'une porosité 15-35 μ ont été essayés. La filtration est très longue et un grand nombre de toxoplasmes restent bloqués dans le filtre.

Puis ont été testés les filtres « Millipore » à membrane interchangeable en Duralon d'une porosité de 14 μ . Ces filtres sont actuellement inutilisables pour cet usage ; les membranes se colmatent très vite.

Les filtres en « alundun » donnent en revanche de très bons résultats. Ce sont des filtres en silice réfractaire d'une porosité de 20 μ , peu coûteux et faciles à nettoyer par calcination ou par bain d'acide fort. Leur surface est grande et permet une filtration prolongée. Les parasites après filtration sont vivants et intacts.

Les toxoplasmes gardent leur morphologie et leur pouvoir antigénique pendant plusieurs mois s'ils sont formolés à 2 % puis à 0,2 % et conservés à 4°. Cet antigène figuré convient à l'immuno-fluorescence et au test d'agglutination de Fulton.

Les toxoplasmes peuvent aussi être lysés par de l'eau distillée et être utilisés en suspension isotonique comme antigène pour les réactions de fixation du complément, d'hémagglutination passive et d'immuno-diffusion.

L'intérêt de cette suspension pure de toxoplasmes est d'être standardisable soit en comptant les parasites, soit par mesure de la densité optique, soit par appréciation du volume du culot.

Comparaison de la teneur en globulines du sérum et de l'ascite.

Les laboratoires de virologie utilisent à la place du sérum cette ascite de souris sarcomateuse infectée par des virus pour effectuer les réactions de neutralisation ; le surnageant de l'ascite donne en effet un plus grand volume utilisable que le sérum pour un seul animal, c'est pour cette raison qu'il était normal de penser que la teneur en immuno-globuline de l'ascite TG 180 est semblable à celle du sérum de souris infectée.

— Le profil électrophorétique de la souris normale est le suivant :

Protidémie : varie entre 50 et 60 g.

Albumine : 40 % environ,

$\alpha = 14$ à 16 %.

β : plus élevées que chez l'homme : 25 à 30 %.

γ : taux moyen : 16 %.

— Les souris infectées par le TG 180 montrent en général les profils électrophorétiques suivants :

Sérum :	Ascite :
Protides : 63 g	52 g
Alb. : 20 %	27 %
α_1 : 7 %	4 %
α_2 : 27 %	21 %
β : 30 %	32 %
γ : 16 % = 10,1 g	16 % = 8,4 g

On constate une légère baisse des protides totaux de l'ascite par rapport au sérum ; les pourcentages des différentes fractions ont une valeur très semblable ; les α -globulines sont plus élevées que chez la souris normale.

— Les souris infectées par les toxoplasmes seuls montrent les profils électrophorétiques suivants :

Sérum :	Ascite :
Protides : 60 g	45 g
Alb. : 31 %	36 %
α_1 : 8 %	—
α_2 : 23 %	22 %
β : 22 %	30 %
γ : 16 % = 8 g	12 % = 5,4 g

La baisse des protides totaux de l'ascite par rapport au sérum est plus importante que dans le cas précédent. Sans doute est-ce dû au développement de l'ascite pendant un délai très court (3 à 4 jours). Les α -globulines sont également plus élevées que chez la souris normale.

— Les souris infectées par le TG 180 et parasitées par les toxoplasmes montrent les profils électrophorétiques suivants :

Sérum :	Ascite :
Protides : 51 g	45 g
Alb. : 30 %	38 %
α_1 : —	—
α_2 : 25 %	20 %
β : 29 %	26 %
γ : 16 % = 8,1 g	16 % = 7,2 g

La baisse des protides totaux de l'ascite sarcomateuse et parasitée est identique à celle observée chez les souris infectées avec le seul TG 180 ; l'évolution aiguë de la

toxoplasmose ne modifie pas la teneur en protides de l'ascite TG 180 ; les pourcentages des différentes fractions ont une valeur très semblable ; les α -globulines sont, de la même façon, plus élevées que chez la souris normale.

Des immunoélectrophorèses ont été faites avec les sérums et les ascites de ces différentes souris en présence d'antiglobuline de souris préparée sur lapin et fournies par les laboratoires Bristol.

Les immuno-électrophorèses permettent de constater une stricte identité des arcs de précipitation du sérum et de l'ascite correspondante à l'exception des différentes ascites à toxoplasmes qui montrent, par rapport au sérum homologue, un arc de précipitation plus allongé au niveau des α .

Il existe aussi une grande analogie entre les images immuno-électrophorétiques de ces souris inoculées différemment.

Pouvoir complémentaire.

L'étude du pouvoir complémentaire de l'ascite TG 180 a été effectué en présence de sérum hémolytique et de GR de mouton.

— Le sérum hémolytique a été utilisé avec des dilutions variant du 1/100 au 1/1.000, et l'ascite a été utilisée pure et diluée jusqu'au 1/800.

— Les différentes dilutions du sérum et de l'ascite ont aussi été étudiées les unes par rapport aux autres : aucune n'a révélé de pouvoir complémentaire à l'ascite TG 180.

Par ailleurs, il a été effectué un titrage du complément en présence de l'ascite ; comparativement a été titré du complément de cobaye dilué, d'une part au 1/80 avec de l'eau physiologique et d'autre part au 1/80 avec de l'ascite TG 180 en présence du sérum hémolytique au 1/1.000.

On constate que l'ascite TG 180 est légèrement anticomplémentaire puisque le C' dilué avec de l'eau physiologique est actif à un volume de 0,15 ml, alors que, dilué en ascite TG 180, le C' n'est actif qu'à un volume de 0,25 ml.

Bibliographie

ARDOIN (P.), COUZINEAU (P.) et BAUFINE-DUCROCQ (H.), 1967. — Sur l'utilisation du Sarcome T.G. 180 pour l'obtention d'une suspension riche en *Toxoplasma gondii* extra-cellulaires. *C.R. Soc. Biol.*, t. 161, n° 1, pp. 117-119.

Les références bibliographiques sont données dans cette revue.

BAZIN (H.), 1967. — Les immunoglobulines de la souris. *N.R.F. Hémat.*, 7, n° 4, p. 507-526.

KWANTES (W.), FLECK (D. G.) et PAYNE (R. A.), 1967. — *J. Clin. Path.*, 20, p. 286.

SCHYOUA (V.), 1960. — Long term culture of *Toxoplasma gondii* in Hela cell. *J. Hyg. Epidem.* (Praha), 4, p. 131-32.

RESSELER (R.), LE ROY (D.) et GOEDVRIEND (J.), 1963. — Conservation des protozoaires particulièrement en culture à la température de l'azote liquide. *Ann. Soc. Belge Trop.*, 45, 6, pp. 665-678.