ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome 49

1974

N° 2

Annales de Parasitologie (Paris), 1974, t. 49, n° 2, pp. 133-158

MÉMOIRES ORIGINAUX

Conservation aux basses températures de *Toxoplasma gondii*

Nicolle et Manceaux, 1909

- Action du diméthyl-sulfoxyde -

par N. DUMAS

Institut Pasteur, Laboratoire des Rickettsioses
28, rue du Docteur-Roux, B.P. 520, F 75724 Paris Cedex 15

II. — ETUDE CYTOLOGIQUE DU PARASITE CONGELE AVEC OU SANS SUBSTANCES PROTECTRICES.

Résumé.

Quelles sont les lésions morphologiques dues à la congélation de *Toxoplasma gondii* et quel est l'aspect d'un toxoplasme protégé par le DMSO ?

L'observation au microscope à immersion des toxoplasmes donne des résultats succincts n'expliquant pas des résultats aussi radicalement différents que la survie ou la mort des parasites. A l'état frais en contraste de phase, l'exsudat péritonéal de souris toxoplasmique, observé lors de mauvaises conservations, montre une vacuolisation du cytoplasme, l'effacement des contours de la membrane et du noyau. Des aspects normaux ou proches de la normale sont obtenus avec 5 ou 10 p. 100 de DMSO ajoutés à de l'exsudat dilué au 1/10.

Annales de Parasitologie humaine et comparée (Paris), t. 49, n° 2

10

Après fixation, seule la coloration de May-Grünwald-Giemsa peut s'appliquer valablement sur ce matériel ; lors de conservation défavorable (en l'absence ou avec du DMSO introduit dans de l'exsudat non dilué) on voit des parasites gonflés, au cytoplasme pâle et même diffus, une substance nucléaire hétérogène. Les colorations de Feulgen et de May-Grünwald-Giemsa sur des toxoplasmes cultivés en cellules en culture mettent en évidence des lésions importantes du noyau avec des congélations défectueuses.

La microscopie électronique en pénétrant jusqu'à la structure fine pouvait mettre en lumière des lésions plus infimes et peut-être plus vitales du toxoplasme. En l'absence de DMSO, on constate des lésions profondes du cytoplasme, du noyau et de leurs structures, mais une bonne conservation de l'architecture rigide du parasite. Avec 5 p. 100 de DMSO, on observe des lésions, en particulier la vacuolisation du cytoplasme et c'est avec 10 p. 100 de DMSO qu'on obtient des aspects révélant de bonnes conservations.

Summary.

What is the morphological damage attributable to freezing *Toxoplasma gondii* and what is the state of *Toxoplasma* protected by DMSO ?

By immersion microscopy, we obtained broad results which did not show radical differences between surviving and dying parasites. When observed in the living state by phase contrast, the peritoneal exudate of toxoplasmic mice, observed during incorrect preservation, shows cytoplasmic vacuolisation and disappearance of the cell and nucleus walls. Normal or near normal results are obtained with 5 % or 10 % of DMSO added to the exudate diluted to 1/10. After fixation, only May-Grünwald-Giemsa staining can be properly used on this material and with incorrect preservation (without or with DMSO added to the undiluted exudate) distended parasites having faint cytoplasm even with shadowy outlines and a heterogeneous nuclear substance can be seen. Under the same conditions, Feulgen and May-Grünwald-Giemsa staining, on *Toxoplasma* growing in cell culture clearly shows intensive damage to the nucleus with defective freezing.

Using the electron microscope down to fine structure, we observed minute and perhaps more serious damage of *Toxoplasma*. Without DMSO we observed more intensive damage of cytoplasm and nucleus and of their structures, but a good preservation of the hard framework of the parasite. With 5 % DMSO, there was still damage, in particular vacuolisation of the cytoplasm and it is only with 10 % DMSO that results showing good preservation are obtained.

Techniques

A. — L'état frais.

EN CONTRASTE DE PHASE.

Cet examen microscopique vital a l'avantage de n'entraîner aucune modification du matériel, à condition bien entendu que les observations soient faites sur du matériel prélevé ou décongelé juste avant l'examen et que cet examen entre lame et lamelle sous le microscope soit d'assez courte durée (15 à 20 mn maximum).

Après fixation

EN MICROSCOPIE OPTIQUE.

Pour faire apparaître les toxoplasmes, nous avons eu recours à différentes colorations. Les meilleures colorations cytologiques sont plutôt applicables à des coupes d'organes, mais on a vu (1^{re} partie) que la congélation d'organes était difficilement contrôlable, aussi avons-nous essayé nos diverses colorations sur frottis d'exsudats péritonéaux et sur lamelles de fibroblastes d'embryon de poulet. Pour les frottis d'exsudats, seule la coloration de May-Grünwald Giemsa (classiquement utilisée d'ailleurs) peut-être appliquée, les autres techniques par leur nature et malgré diverses fixations, ne laisseraient pas ou trop peu de matériel sur la lame porte-objet.

Nous avons eu recours aux techniques classiques pour les colorations de May-Grünwald-Giemsa (fixation à l'alcool méthylique), d'hémalum-éosine (fixation au Kahle), de vert de méthyle pyronine (fixation au Carnoy).

Pour la coloration de Feulgen, la technique de coloration classique (avec fixation au Kahle), ne nous ayant pas donné de bons résultats, nous avons essayé diverses modifications. Deux types de fixation des cellules sur lamelles ont été appliqués : le Kahle agissant, soit sur des lamelles humides (selon la technique classique), soit sur des lamelles ayant subi une légère dessiccation à l'air. Après l'hydrolyse chlorhydrique, le réactif de Schiff a été laissé 1 h 1/2, 3 heures ou 4 heures ; ensuite on a coloré à l'éosine seulement certaines lames.

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-après :

Schiff.	Fixation humide		Fixation sèche	
	Avec éosine	Sans éosine	Avec éosine	Sans éosine
1 h 1/2	C* : N* pourpre Cy* rose	C : N pourpre	C : N pourpre Cy rose	C : N gris
	T* : rose	T : peu visible	T : rose, centre légèrement pourpre	T : peu visible
3 h ..	C : N pourpre, bien visible	C : N pourpre	C : N visible Cy rose	C : N visible
	T : peu visible	T : pas visible	T : rose, N pas visible	T : N très légèrement visible
4 h ..	C : N pourpre Cy rose	C : N pourpre	C : N violet Cy rose	C : N pourpre
	T : très peu visible	T : pas visible	T : rose, pas de N visible	T : pas visible

(*) C = cellules ; N = noyau ; T = toxoplasmes ; Cy = cytoplasme.

Pour voir les toxoplasmes avec leurs noyaux, il faut donc fixer au Kahle une lamelle ayant subi une légère dessiccation préalable, et ne prolonger le contact avec le réactif de Schiff qu'une heure et demie, c'est ainsi que l'ADN des toxoplasmes, préalablement soumis à une hydrolyse ménagée, se colore légèrement au contact du réactif de Schiff. Pour faciliter la lecture, les corps nucléaires des toxoplasmes étant petits, il est préférable de passer rapidement la lame à l'éosine en fin de coloration : ainsi le cytoplasme apparaît en rose et cela permet de reconnaître plus facilement nos parasites. On atténue légèrement la coloration des noyaux par la coloration à l'éosine, par exemple les noyaux des toxoplasmes très légèrement visibles après un contact de 3 heures au Schiff, paraissent masqués par l'éosine.

Les meilleurs résultats ont été obtenus en séchant les lamelles, en les laissant 1 h 1/2 dans le réactif de Schiff et en les recolorant à l'éosine.

EN ULTRAMICROSCOPIE.

Le tapis cellulaire, après avoir été détaché de la lamelle avec une lame de rasoir, subit la double fixation glutaraldéhyde-acide osmique et fut inclus dans l'epon. Les coupes, faites soit à l'ultra-microtome manuel, soit à l'ultra-microtome de Reichert (1), furent contrastées à l'acétate d'uranyle alcoolique ou aqueux suivi ou non de citrate de plomb.

Le matériel fut examiné avec un microscope électronique Hitachi HV 11 A (2).

Résultats

Etat frais en contraste de phase.

En microscopie optique, ce mode d'examen nous a paru faire apparaître le mieux les différentes modifications dues à la congélation des toxoplasmes.

Dès que nous avons constaté la rapidité et la simplicité avec lesquelles nous pouvions par examen en contraste de phase évaluer les résultats de nos congélations, nous avons utilisé ce type d'observation après chaque décongélation. Pour le travail photographique reproduit ici, nous avons congelé lentement jusqu'à -79°C , de l'exsudat péritonéal de souris inoculées avec la souche B₁₂ de toxoplasmes ; cet exsudat était réparti en six séries d'ampoules :

Série 1 : exsudat pur

Série 2 : exsudat dilué au 1/10

Série 3 : exsudat pur + DMSO 5 p. 100

Série 4 : exsudat dilué au 1/10 + DMSO 5 p. 100

(1) L'ultra-microtome de Reichert a été mis à notre disposition par le Prof. Esquai, Sec de Microscopie Electronique, laboratoire d'Evolution des Etres Organisés, Paris.

(2) C'est grâce à l'extrême amabilité du D^r J.-M. Jadin, Clinique St-Raphaël, Louvain (Belgique), que nous devons d'avoir pu utiliser plusieurs jours, dans d'excellentes conditions, cet appareil.

Série 5 : exsudat pur + DMSO 10 p. 100

Série 6 : exsudat dilué au 1/10 + DMSO 10 p. 100.

Ces ampoules ont été maintenues 7 jours à -79°C , puis décongelées rapidement au bain-marie à 37°C , avant les prises de vues microphotographiques. Un témoin constitué par de l'exsudat frais juste prélevé sur une souris inoculée avec la souche B₁₂ a été photographié pour servir de référence.

Sur les formes libres isolées dans le milieu l'observation est plus facile et les différences plus visibles (Pl. I, fig. 4 à 10).

Lors de la congélation sans substance protectrice, nous voyons les parasites se gonfler, s'arrondir, se vacuoliser, ce dernier phénomène est d'autant plus net que l'exsudat est dilué, la dilution en eau physiologique doit probablement agir d'une façon doublement néfaste, par apport d'eau et par dilution des substances protectrices de l'exsudat : ce phénomène a déjà été signalé par de nombreux auteurs et retrouvé par nous-mêmes lors de nos essais comparatifs sur animaux. Dans l'exsudat non dilué, les vacuoles sont moins importantes et si la congélation a été de durée assez courte, nous retrouvons de 1 à 10 p. 100 de formes non vacuolisées, presque normales (généralement plus rondes que les formes typiques), ce phénomène ne se retrouve pratiquement plus au-delà d'un mois à -79°C .

Dès que l'on ajoute du DMSO, le phénomène s'inverse : ce sont les exsudats dilués au 1/10 qui présentent les formes les plus proches de la normale : le DMSO plus soluble dans l'eau que dans l'exsudat serait-il en contact d'une façon plus homogène et plus directe avec le parasite et par là sa pénétration en serait-elle facilitée ?

Avec 5 ou 10 p. 100 de DMSO ajouté à l'exsudat dilué au 1/10, la majorité des toxoplasmes est de formes allongées, non vacuolisées, c'est avec 5 p. 100 de DMSO que se retrouvent les quelques formes les plus semblables au témoin (en particulier noyau visible). Cette observation traduit peut-être la légère toxicité du DMSO sur les toxoplasmes, déjà observée au cours de ce travail, cette toxicité étant plus marquée au taux de 10 p. 100.

Les résultats sont différents lorsqu'on ajoute du DMSO à l'exsudat non dilué. Avec 5 p. 100 de DMSO, nous ne retrouvons que peu de formes à vacuolisation nette, mais peu aussi de formes allongées, les toxoplasmes paraissent en majorité légèrement arrondis et on peut distinguer des micro-vacuoles. Avec 10 p. 100 de DMSO, les parasites gardent une forme plus allongée et les micro-vacuoles ont disparu. Le DMSO doit mal se diluer dans l'exsudat épais des souris atteintes de toxoplasmose, exsudat qui, pur, a tendance à coaguler très rapidement (nous avons cependant toujours mélangé soigneusement le DMSO à l'exsudat, en aspirant et refoulant plusieurs fois le mélange avec une seringue munie d'une aiguille fine).

Morphologiquement la meilleure conservation des formes isolées est obtenue avec l'exsudat dilué au 1/10 auquel on ajoute le DMSO.

Mais si un exsudat péritonéal à un stade avancé de l'infection ne contient pratiquement plus de toxoplasmes intracellulaires, il contient beaucoup de toxoplasmes en amas, soit groupés entre eux, soit groupés sur des débris cellulaires. Sur ces amas, les résultats de la congélation sont légèrement différents (Pl. II, fig. 11 à 17).

Témoin sans congélation

Exsudat congelé non dilué Exsudat congelé dilué au $\frac{1}{10}$

sans substance protectrice

+ DMSO 5 p 100

+ DMSO 10 p 100

PLANCHE I

FIG. 4 à 10. — Formes libres isolées (contraste de phase) $\times 1575$

Témoin sans congélation

Exsudat congelé non dilué

sans substance protectrice

Exsudat congelé dilué au $\frac{1}{10}$

+DMSO 5 p 100

+DMSO 10 p 100

PLANCHE II

FIG. 11 à 17. — Formes libres en amas (contraste de phase) $\times 1575$

Dans le témoin, nous constatons que les toxoplasmes des amas sont plus polymorphes : formes légèrement arrondies à côté de formes typiques, noyau moins nettement visible à l'intérieur du parasite et surtout nombreux parasites ayant déjà des vacuoles (c'est cette raison qui fait écarter ces formes non isolées lors du comptage des parasites dans le test sérologique de lyse des toxoplasmes).

En l'absence de substance protectrice les lésions dues à la congélation sont profondes et là aussi beaucoup plus nettes avec la dilution au 1/10 de l'exsudat où la vacuolisation et le gonflement des toxoplasmes sont très nets.

Avec l'exsudat non dilué et 5 p. 100 de DMSO, les résultats ne paraissent guère meilleurs que sans DMSO, il faut 10 p. 100 de DMSO pour voir le nombre des formes vacuolisées reculer nettement, mais les formes restent légèrement arrondies. La difficulté de pénétration de DMSO au sein de l'exsudat non dilué est encore plus net au niveau des amas que sur les formes libres.

Pratiquement on observe dans les amas, quelques formes assez allongées, mais on ne trouve aucune forme normale ou proche de la normale comme avec les formes isolées.

Grâce à ces deux séries d'observations, en microscopie à contraste de phase, il semble qu'on puisse ajouter aux observations faites sur l'animal que la pénétration du DMSO dans le toxoplasme soit facilitée par la dilution de l'exsudat, mais aussi qu'il importe d'avoir le maximum de formes libres isolées : pour cela il faut prélever l'exsudat péritonéal des souris le plus tard possible sur la souris infectée ; pour notre souche B₁₂ (et la majorité des souches à virulence élevée pour la souris) 4 jours après l'inoculation paraît être le plus favorable, évitant ainsi les infections bactériennes qui interviennent souvent peu avant la mort des souris 5-6 jours après l'inoculation.

Pour chiffrer ces observations morphologiques, nous avons fait *des comptages* des diverses formes contenues dans des exsudats congelés selon les modalités déjà décrites et conservés plus ou moins longtemps à — 79 °C.

Les toxoplasmes congelés furent classés en trois catégories « les normaux », « les lysés » et « les abîmés ». Dans cette dernière catégorie sont classés tous les parasites présentant un aspect anormal allant de la simple augmentation de volume à l'aspect granuleux, stade précédent probablement la lyse, cette dernière faisant apparaître le toxoplasme avec de grandes vacuoles. Ces aspects correspondent peut-être à des toxoplasmes encore viables jusqu'à des toxoplasmes pratiquement « morts. »

La comparaison porte sur un exsudat congelé soit pur, soit dilué au 1/10 avec adjonction de 5 ou 10 p. 100 de DMSO. Les ampoules ont été décongelées après 24 heures, 10 jours, 60 jours et 100 jours de conservation à — 79 °C. Les résultats du tableau ci-après ont permis d'obtenir les courbes de la Pl. III, fig. 18-21.

Sur ces courbes, que l'on considère les toxoplasmes « lysés » ou les « normaux » il ressort que le DMSO agit plus efficacement lorsque l'exsudat est dilué au 1/10. La protection est-elle meilleure avec 5 ou 10 p. 100 de DMSO ? Si l'on pense que la courbe de toxoplasmes « lysés » traduit mieux la qualité de la conservation, elle est légèrement inférieure avec 10 p. 100 de DMSO. Au cours des dix premiers jours de conservation, on constate une chute plus importante du nombre des toxoplasmes « nor-

			24 h	10 j.	60 j.	100 j.
Exsudat pur	+ DMSO 5 p. 100	N*	57 p. 100	23 p. 100	10 p. 100	8 p. 100
		A*	18 p. 100	62 p. 100	50 p. 100	53 p. 100
		L*	25 p. 100	15 p. 100	40 p. 100	39 p. 100
	+ DMSO 10 p. 100	N	63 p. 100	16 p. 100	9 p. 100	5 p. 100
		A	16 p. 100	45 p. 100	58 p. 100	44 p. 100
		L	21 p. 100	39 p. 100	33 p. 100	51 p. 100
Exsudat au 1/10	+ DMSO 5 p. 100	N	53 p. 100	29 p. 100	32 p. 100	38 p. 100
		A	25 p. 100	46 p. 100	45 p. 100	39 p. 100
		L	22 p. 100	25 p. 100	23 p. 100	23 p. 100
	+ DMSO 10 p. 100	N	57 p. 100	40 p. 100	32 p. 100	33 p. 100
		A	29 p. 100	40 p. 100	50 p. 100	47 p. 100
		L	14 p. 100	20 p. 100	18 p. 100	20 p. 100

* N = toxoplasmes normaux, A = t. abîmés, L = t. lysés.

PLANCHE III

Fig. 18 et 21. — Comptage en contraste de phase après congélation

maux » avec 5 p. 100 de DMSO, ce qui correspond peut-être à une moins bonne protection contre les méfaits de la congélation, mais l'abaissement du nombre des toxoplasmes « normaux » se poursuit avec 10 p. 100 de DMSO : est-ce l'action toxique de DMSO, plus sensible à 10 p. 100, qui entre en jeu lors de la conservation ?

Le liquide nutritif de tubes de cultures cellulaires parasité par *T. gondii*, dans les mêmes conditions de décongélations et de conservation, montre les mêmes aspects en contraste de phase.

Après fixation et colorations, en microscopie photonique :

Sur Frottis d'exsudat péritonéal :

La plupart des colorations sont plutôt applicables aux coupes ou aux cultures cellulaires comme l'hémalum-éosine, le vert de méthyle-pyronine, le Feulgen : les toxoplasmes n'étant pas nettement colorés, il est impossible de voir des différences entre parasites congelés et parasites non congelés. Les colorations utilisées couramment sur frottis comme le Macchiavello et sa variante, le Stamp ne donnent pas non plus de bons résultats sur les toxoplasmes. La coloration de May-Grünwald-Giemsa permet de voir, bien colorés, les toxoplasmes isolés avec leur cytoplasme bleu pâle contenant un corps nucléaire, violet foncé (Pl. IV, fig. 22).

Lorsque l'exsudat est congelé sans DMSO (Pl. IV, fig. 23 et 24) le cytoplasme est peu ou pas visible surtout pour l'exsudat dilué au 1/10, les noyaux sont aisément observables, mais déformés. La durée de conservation est particulièrement importante avec l'exsudat non dilué qui après quelques heures présente encore de nombreuses formes très reconnaissables alors qu'après 4 jours, l'aspect est identique que l'exsudat soit dilué ou non.

Avec 5 ou 10 p. 100 de DMSO (Pl. IV, fig. 25 à 28) introduit dans l'exsudat non dilué, les contours du cytoplasme sont estompés, les granulations violet foncé du noyau paraissent disposées à la périphérie juste sous la membrane nucléaire.

Lorsque les mêmes proportions de DMSO sont introduites dans l'exsudat dilué au 1/10, on obtient des aspects proches du témoin non congelé. La présence de DMSO dans le produit étalé ne permet pas des colorations fines : les toxoplasmes paraissent empâtés par le colorant qui se fixe peut-être plus intensément en raison de la présence de DMSO. Généralement avec 5 p. 100 de DMSO, le cytoplasme est quelquefois vacuolisé, mais l'aspect général est normal, comme avec 10 p. 100 de DMSO.

La May-Grünwald-Giemsa fait apparaître, comme l'observation en contraste de phase, une meilleure conservation de l'aspect des parasites congelés dans de l'exsudat dilué au 1/10 avec 5 ou mieux 10 p. 100 de DMSO.

Sur lamelles de cellules en culture

Hémalum-Eosine

Les toxoplasmes apparaissent rose très pâle, mais quelles que soient les modalités de congélation et les résultats de la conservation, l'aspect paraît en général normal ou du moins semblable au témoin non congelé ; ces résultats furent retrouvés aussi bien pour la souche B₁₂ que pour la souche Z₃₄.

Témoin sans congélation

Exsudat congelé non dilué

Exsudat congelé dilué au $\frac{1}{10}$

sans substance protectrice

+ DMSO 5 p.100

+ DMSO 10 p.100

PLANCHE IV

FIG. 22 à 28. — Formes libres isolées (May-Grünwald Giemsa) $\times 1575$

May-Grünwald-Giemsa

Sur les cultures non soumises à la congélation, les toxoplasmes sont arqués, assez fins, leur cytoplasme est coloré en bleu et leur noyau en violet (Pl. V, fig. 29).

Lorsque les tubes sont congelés avec ou sans liquide nutritif, le cytoplasme des parasites n'est plus visible, les noyaux sont augmentés de volume et présentent un aspect piqueté réticulé. En présence de liquide nutritif, la coloration violette des noyaux est plus pâle que lorsqu'on a enlevé le liquide (Pl. V, fig. 30 et 31).

Avec adjonction de 5 p. 100 de DMSO dans le liquide nutritif, les toxoplasmes ont un aspect gonflé et le noyau, lui aussi augmenté de volume, paraît moins dense. Si après 30 mn de contact avec le liquide nutritif contenant 5 p. 100 de DMSO, on enlève ce liquide avant la congélation, des toxoplasmes ont un aspect normal, mais on trouve des plages de toxoplasmes qui ont l'aspect gonflé et le noyau abîmé (Pl. V, fig. 32 et 33).

Lorsqu'on ajoute 10 p. 100 de DMSO, les toxoplasmes présentent après congélation sans liquide nutritif un aspect normal en particulier avec le cytoplasme bien coloré faisant apparaître nettement le contenu du parasite. C'est ce caractère qui n'apparaît pas toujours lorsque les cultures sont congelées avec le milieu nutritif où le contour du parasite est souvent mal délimité (Pl. V, fig. 34 et 35).

Avec 5 p. 100 de DMSO et 30 mn de contact, la protection semble insuffisante, lorsqu'on laisse le liquide, l'excès d'eau paraît masquer le pouvoir protecteur de 5 p. 100 de DMSO puisqu'on obtient des aspects proches de ceux obtenus sans DMSO. Avec 10 p. 100 de DMSO, les toxoplasmes ne semblent pas souffrir de la congélation particulièrement en l'absence de liquide nutritif.

Ces constatations ont été faites sur des cultures âgées où les cellules étaient à un état de lyse avancée due à l'abondante multiplication des parasites: ce sont ces cultures qui ont parallèlement fourni le matériel en vue de l'étude au microscope électronique.

Les mêmes observations furent faites sur des cultures jeunes, avec plus de netteté peut-être, car les toxoplasmes ont un aspect meilleur lorsqu'ils sont intracellulaires. Avec ces cultures jeunes nous avons admis la supériorité de la dose 10 p. 100 de DMSO, nous avons comparé les aspects avec ou sans milieu nutritif (Pl. VI, fig. 36 à 40).

Cette coloration fait apparaître la nécessité de congeler les cultures cellulaires en l'absence du milieu nutritif, après un temps de contact cellules-milieu nutritif avec DMSO que nous avons limité à 30 mn en raison de la rapidité de pénétration de cette substance protectrice; elle nous montre, dans certaines conditions de congélations, des lésions cytoplasmiques profondes accompagnées d'apparentes modifications du noyau du parasite, aussi avons-nous essayé des colorations spécifiques de cette importante structure cellulaire.

Vert de méthyle pyronine

Les toxoplasmes non congelés présentent un cytoplasme rose, mais le corps central nucléaire est toujours mal coloré et sa teinte gris verdâtre est peu visible. Les résultats sont identiques que la fixation au Carnoy, après lavage à l'eau physiologique, soit faite sur lamelles humides ou sur lamelles sèches et en faisant agir la solution de vert de méthyle-pyronine 7 ou 18 heures.

Lorsqu'on congèle les toxoplasmes (souche B₁₂), sans substances protectrices, quelques parasites donnent l'impression d'une lyse, mais d'autres ont leur corps central gris-vert comme le témoin. Avec 5 p. 100 de DMSO, les toxoplasmes sont presque homogènes, roses, mais

Témoin sans congélation

Congélation sans milieu

Congélation avec milieu

sans substance protectrice

+DMSO 5 p100

+ DMSO 10p100

PLANCHE V

FIG. 29 à 35. — Cultures cellulaires âgées (May-Grünwald Giemsa) $\times 1050$

Témoin sans congélation

Congélation sans milieu Congélation avec milieu

Sans substance protectrice

+ DMSO 10 p 100

PLANCHE VI

FIG. 36 à 40. — Cultures cellulaires jeunes (May-Grünwald Giemsa) $\times 1050$

bien visibles, et le corps central est si pâle qu'il est à peine discernable. Avec 10 p. 100 de DMSO, même aspect rose, mais le corps central est plus visible ; par contre avec 10 p. 100 de glycérine, ce corps central est peu visible.

Avec la souche Z_{34} on retrouve les mêmes aspects avec cependant des résultats un peu différents avec 10 p. 100 de glycérine : aspects lésés de certains toxoplasmes alors que d'autres semblent bien conservés avec des corps centraux bien visibles.

Nous n'avons pas appliqué le test de Brachet à la ribonucléase, puisque nous ne cherchions à voir que les différentes modifications d'une même cellule, soumise à des traitements divers.

Feulgen

L'aspect d'une culture de cellules parasitées avec des toxoplasmes colorés par cette technique est assez difficile à interpréter et il faut que les toxoplasmes soient très nombreux pour les distinguer à coup sûr, d'autant qu'ils ne se colorent pas toujours très bien.

D'après l'étude relatée dans la partie « TECHNIQUES » (2^e partie), les lamelles légèrement desséchées ont été fixées au Kahle, laissées 1 h 30 dans le Schiff et recolorées à l'éosine.

Avec la souche B_{12} , les toxoplasmes congelés ou non montrent des noyaux pourpres, pâles, mais visibles ; avec le DMSO à 5 p. 100 après congélation, les noyaux sont mauve, assez pâle ; avec 10 p. 100 de DMSO, ils sont mauve, mais plus visibles, et avec 10 p. 100 de glycérine on retrouve le même aspect qu'avec le DMSO à 5 p. 100. Avec la souche Z_{34} , on retrouve sensiblement les mêmes résultats.

En fait, toutes ces colorations, sauf le May-Grünwald-Giemsa (et en faisant les réserves dues au mode de fixation) ne nous ont pas apporté de critère probant en relation avec la conservation ou la non conservation des toxoplasmes congelés avec ou sans substances protectrices.

Après fixation et coloration en microscopie électronique

Vacuolisation du cytoplasme observé en contraste de phase et au May-Grünwald-Giemsa, lésions du noyau perçues avec cette coloration, correspondent à des lésions profondes, voir létales. Pour pénétrer plus avant au niveau des structures fines de la cellule, seule la microscopie électronique pouvait nous y aider.

Sur lamelles de cellules en culture

Les toxoplasmes congelés sans substance protectrice ont généralement leur forme très altérée, particulièrement lorsque la congélation est faite en présence du liquide nutritif (fig. 42, 43 et 45) (3), dans ces dernières conditions, la membrane du parasite est quelquefois largement rompue et le cytoplasme s'échappe par cette brèche (fig. 42 et 44) alors qu'en l'absence de liquide nutritif les déchirures de la membrane sont beaucoup plus discrètes. Lors de la congélation avec le liquide nutritif, les structures paraissent profondément altérées, souvent difficilement reconnaissables ; le noyau (N) et son nucléole (Nu) sont

(3) Légende adoptée pour ces figures : C : conoïde, CF : couche sous-fibrillaire, M : micropyle, ME : membrane unitaire à double feuillet, MT : mitochondrie, N : noyau, Nu : nucléole, T : toxonème, TR : tubule radiale ou sous-pelliculaire.

encore visibles sur le toxoplasme de la fig. 42, Pl. VIII, certaines parties du corps du parasite paraissent vides (Pl. VIII, fig. 42, 43 et 44), par contre la structure de la paroi [membrane unitaire (ME)] et couche fibrillaire (CF) résiste assez bien (Pl. VIII, fig. 43, 44 et 45), et même la structure trilamellaire de la membrane unitaire avec la couche fibrillaire sous-jacente peut être particulièrement nette (Pl. VIII, fig. 45), net aussi le conoïde (C) de forme troncoïde avec alternance de zones claires et sombres enroulées en spirale oblique à 45° environ et les deux anneaux imbriqués de la partie apicale (Pl. VIII, fig. 43 et 45). Sans liquide nutritif les lésions sont peut-être moins profondes, mais le cytoplasme est souvent légèrement décollé de la membrane en restant entouré par les tubules sous-pelliculaires (TR) coupées transversalement (Pl. IX, fig. 47), quelquefois un décollement plus important existe au niveau de la partie apicale (Pl. IX, fig. 46), lorsque le noyau (N) est visible, il apparaît lésé (Pl. IX, fig. 46), et même en partie vide (Pl. IX, fig. 48). Les tubules sous-pelliculaires (TR) coupées longitudinalement peuvent être visibles (Pl. IX, fig. 48).

Cinq p. 100 de DMSO et le liquide nutritif permettent de trouver des formes à structures très nettes (Pl. X, fig. 49), avec noyau (N), nucléole (Nu), mitochondries (MT), mais beaucoup de formes sont largement vacuolisées (Pl. X, fig. 50) ou partiellement vers la partie apicale (Pl. X, fig. 49, toxoplasme central), ce qui permet encore une fois de voir particulièrement bien le conoïde et deux anneaux. Congelés avec 5 p. 100 de DMSO (sans liquide nutritif) (4), les structures sont reconnaissables, mais l'apparence générale est encore loin de la normale.

Avec 10 p. 100 de DMSO, nous retrouvons de beaux aspects avec les structures aisément reconnaissables : noyau-nucléole (N et Nu) avec ergastoplasme (R) particulièrement nets (Pl. XII, fig. 52), mitochondries (MT) (Pl. XIII, fig. 54), conoïdes (C) (Pl. XII, fig. 52), membrane unitaire (ME) et couche fibrillaire (CF) (Pl. XIII, fig. 55, et Pl. XIV, fig. 56), tubules sous-pelliculaires coupées transversalement (fig. 56, pl. XIV), pédicules de toxonèmes coupés transversalement (Pl. XII, fig. 52), et peut-être microphyle (M) (Pl. XIII, fig. 54). Avec le liquide nutritif, nous avons trouvé quelques formes vacuolisées, mais à un stade de vacuolisation moins poussé qu'avec 5 p. 100 de DMSO (Pl. XII, fig. 53).

Sans liquide nutritif, nous avons pu retrouver quelques phénomènes intéressants : le rassemblement des mitochondries (MT) de l'hôte autour de la vacuole contenant le parasite (Pl. XIII, fig. 55), endogénie où le noyau (N) de la cellule-mère semble imbriqué dans les deux cellules-filles (Pl. XV, fig. 57), endogénie encore, où dans les cellules-filles, les tubules sous-fibrillaires (TR) coupées transversalement sont disposées concentriquement à l'intérieur des tubules de la cellule-mère (Pl. XIV, fig. 56).

Commentaires

Les constatations obtenues grâce à l'étude morphologique confirment sensiblement les résultats fournis par les contrôles sur animal, mais avec moins de nuances et de sensibilité.

Alors que nous pensions que les colorations et particulièrement les colorations spécifiques (Feulgen par exemple) nous donneraient des résultats intéressants, c'est le May-Grünwald-Giemsa qui nous a donné les meilleures images, sans pour cela fournir un critère simple de la valeur de la congélation. Quant au pouvoir toxique du DMSO

(4) L'étude de cette série a été difficile car les cellules avaient été très lysées et les coupes comportaient peu de matériel et dans ce matériel peu de toxoplasmes.

PLANCHE VII

FIG. 41. — Témoin sans congélation (Acétate d'uranyle-Citrate ds Pb) $\times 33\,250$

(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 17\,325$ (Acétate d'uranyle) $\times 25\,250$ (Acétate d'uranyle) $\times 6\,310$ (Acétate d'uranyle) $\times 11\,700$

PLANCHE VIII

Fig. 42 à 45. — Sans DMSO, + liquide nutritif

(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 25\,250$

(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 37\,800$

(Acétate d'uranyle) $\times 12\,340$

PLANCHE IX

FIG. 46 à 48. — Sans DMSO, sans liquide nutritif

(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 25\,250$

(Acétate d'uranyle) $\times 23\,400$

PLANCHE X

FIG. 49 et 50. — DMSO 5 % + liquide nutritif

(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 21\,820$

PLANCHE XI

FIG. 51. — DMSO, 5 %, sans liquide nutritif

sur les toxoplasmes, décelé sur souris, il n'entraîne aucune modification morphologique apparente (pour cela nous avons coloré des toxoplasmes non congelés après 1 h 30 mn de contact avec le DMSO) (Pl. XVI, fig. 58 à 60).

Le contraste de phase a permis de juger rapidement la valeur d'une conservation ; le résultat s'évalue par le pourcentage des parasites lysés et des parasites en bon état ; mais les comparaisons sont difficiles eu égard à la masse importante des parasites

(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 35\,115$

(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 24\,120$

PLANCHE XII

FIG. 52 et 53. — DMSO, 10 % + liquide nutritif

(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 25\,250$

Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 16\,565$

PLANCHE XIII

FIG. 54 et 55. — DMSO, 10 %, sans liquide nutritif

(Acétate d'uranyle-Citrate de Pb) $\times 33\,865$

PLANCHE XIV

FIG. 56. — DMSO, 10 %, sans liquide nutritif

« abîmés » parmi lesquels on trouve le passage continu de la forme normale à la forme lysée. La forme lysée après congélation est semblable à celle obtenue en test de lyse avec un sérum positif contenant des anticorps contre les toxoplasmes (Pl. XVII, fig. 61

(Acétate d'uranyle) $\times 15\ 100$

PLANCHE XV

FIG. 57. — DMSO, 10 %, sans liquide nutritif

et 62) : ce rapprochement morphologique traduit-il un phénomène identique (de modification de la perméabilité membranaire par exemple) provoqué par deux causes très différentes, ou l'observation assez grossière donne-t-elle une apparence d'identité ? (cf. fig. 4 à 10).

La microscopie électronique nous a permis de suivre au niveau des structures de la cellule l'influence des divers modes de conservation. Les parties rigides de la cellule (membranes, couches fibrillaires, tubules sous-pelliculaires, conoïdes, anneaux de la partie apicale) sont peu lésées, au plus, la membrane est-elle déchirée localement par les cristaux de glace qui se forment lors de conservation déféctueuse. Par ailleurs, la congélation sans substance protectrice permet d'ailleurs de bien dégager des structures,

PLANCHE XVI

FIG. 58 à 60. — Action du DMSO sur un exsudat péritonéal non congelé (May-Grünwald Giemsa) $\times 1575$

PLANCHE XVII

FIG. 61 et 62. — Test de lyse (Contraste de phase $\times 1575$)

et leur tude (accompagne de contrle sur des tmoins) serait peut-tre poursuivre, les images obtenues tant particulirement nettes. Ceci est en apparente contradiction avec les observations au May-Grnwald-Giemsa o le contour du parasite est peu net : en fait cette coloration ne teinte pas la membrane mais le cytoplasme qui apparat aussi gravement ls en microscopie lectronique. En l'absence de DMSO, les vacuoles observes en contraste de phase se retrouvent sur les clichs de microscopie lectronique, mais les lsions du noyau n'taient visibles qu'avec le May-Grnwald-Giemsa. Morphologiquement les toxoplasmes sur cultures cellulaires sont beaucoup mieux protgs par 10 p. 100 de DMSO et il ne semble pas que la toxicit du produit dcele sur souris entrane des lsions cytologiques apparentes.

L'tude cytologique avec de l'exsudat pritonal observ en contraste de phase ou color au May-Grnwald-Giemsa, a permis de confirmer qu'il faut faire agir le DMSO sur un exsudat dilu au 1/10 ; avec les toxoplasmes, cultivs sur cellules d'embryon de poulet, colors au May-Grnwald-Giemsa ou observs en microscopie lectronique : la meilleure conservation du point de vue cytologique est obtenue avec 10 p. 100 de DMSO.