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*

III. — ETUDE SEROLOGIQUE DU PARASITE APRES CONGELATION

Résumé.

La congélation et la conservation à — 79 °C de souches de toxoplasmes, n'entraînent pas de perturbations dans les résultats des réactions sérologiques les plus couramment pratiquées pour le séro-diagnostic de la toxoplasmose (fixation du complément, test de lyse, immunofluorescence indirecte). Pour des raisons essentiellement pratiques, il est préférable, après congélation, de faire un premier passage sur souris, pour enrichir l'exsudat, celui-ci servant d'inoculum à un second passage qui produira un matériel adéquat pour la production des différents antigènes.

Summary.

Preservation of T. gondii Nicolle and Manceaux, 1909 at low temperatures. Effect of dimethyl sulfoxide. III. Serological study after freezing of the parasite.

Freezing and preservation at — 79 °C of *Toxoplasma* strains do not cause any variation in the results of serological reactions currently used for the sero-diagnosis of Toxoplasmosis (complement fixation, lysis-test, indirect immunofluorescence). For essentially practical reasons it is preferable after freezing to make a first injection into mice to enrich the exudate, providing an inoculum for a second injection which will produce a suitable material for the production of the various antigens.

Certains auteurs dont Deschiens et Molinari, 1963 ont mis en garde les utilisateurs des techniques de conservation aux basses températures, en présence de substances protectrices, contre d'éventuelles altérations des réponses biologiques des parasites.

Cette étude aura pour propos d'essayer de déceler les perturbations possibles lors des réactions sérologiques les plus couramment utilisées en laboratoire pour le diagnostic de la toxoplasmose, à savoir :

- la fixation du complément,
- le test de lyse,
- l'immunofluorescence.

La souche B₁₂, ayant toujours été conservée sans aucune interruption, sur souris depuis son isolement, fournit un point de comparaison absolu avec des exsudats de cette même souche, congelés. Les souches C₃₆ et D₃₆ furent entretenues plusieurs mois sur souris avant d'être comparés avec des exsudats congelés de ces souches. Pour ces deux souches non isolées par nous, nous ne connaissons pas leur passé en ce qui concerne les conservations par congélation.

Techniques

Fixation du complément *

Dès 1937 Nicolau et Ravelo démontrent la présence d'anticorps fixant le complément chez des animaux infectés par des toxoplasmes. Depuis, cette technique, bien qu'assez peu sensible, mais applicable dans n'importe quel laboratoire de diagnostic, a été largement utilisée.

Actuellement les antigènes sont généralement préparés, soit à partir du milieu nutritif de cultures cellulaires infectées, soit à partir d'exsudats péritonéaux de souris toxoplasmiques. C'est à ce dernier matériel que nous nous sommes adressés pour deux raisons : d'une part, la souris, très sensible à *Toxoplasma gondii*, permet une meilleure culture des parasites après congélation, d'autre part, les exsudats fournissent des antigènes de pouvoir antigénique plus élevé.

Nous avons comparé les antigènes par la méthode de titrage ci-après.

Les sérums positifs ont été dilués de 1/2 en 1/2, du 1/4 au 1/512. Ils avaient été inactivés à 56 °C à la dilution du 1/4, ainsi que les sérums négatifs, utilisés à cette seule dilution.

Les antigènes à titrer ont été dilués au 1/10, 1/20, 1/40, 1/60, 1/80 pour une première série de titrage et au 1/2, 1/4, 1/8, 1/10, 1/20 pour une seconde série.

(*) Nous remercions M^{me} Virat, Chef du Laboratoire de Sérologie, service des Virus, Institut Pasteur - Paris, de nous avoir communiqué sa technique de fixation du complément ainsi que les sérums de référence.

Les dilutions de sérums ont été réparties dans les rangées verticales à raison d'une goutte par cupule, celles d'antigènes dans les rangées horizontales aussi à raison d'une goutte par cupule d'une plaque de plexiglas selon le schéma suivant.

		Dilutions du sérum +							
		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Dilutions de l'anti- gène	1/2 ou → 1/10								
	1/4 ou → 1/20								
	1/8 ou → 1/40								
	1/10 ou → 1/60								
	1/20 ou → 1/80								

En outre on compare le dosage avec un antigène de référence de titre connu mis en présence des dilutions du sérum positif, on met aussi en présence des dilutions de ce sérum et une suspension-témoin de l'antigène, et dans une autre série, le diluant. Nous avons mis en présence les dilutions des antigènes et le sérum négatif au 1/4. Un témoin sérum négatif en présence de diluant est distribué.

Ensuite chaque cupule reçoit 2 gouttes de complément préalablement dosé renfermant 2 Unités-Hémolyse 100, trois cupules témoins-complément reçoivent respectivement 2 U, 1 U, 1/2 U de complément. Enfin une cupule contenant seulement du diluant sera le témoin des hématies sensibilisées.

Les plaques après une nuit à + 4 °C sont mises 30 mn à l'étuve à 37 °C, avant que soit ajouté le système hémolytique constitué à parties égales de sérum hémolytique à 3 unités et de globules rouges de mouton à 2 p. 100. Les plaques sont remises à l'étuve à 37 °C, 15 mn puis, après vérification de la lyse des témoins, placées à + 4 °C pour laisser sédimenter, ce qui facilite la lecture.

L'unité antigénique est définie comme la plus grande dilution d'antigène qui donne une fixation en présence de la plus grande dilution de sérum.

Test de lyse

Cette réaction est une modification apportée par Lelong et Desmonts (1951 et 1952) au test de Sabin et Feldman (1948) ou dye-test.

Le dye-test permet de déceler la présence d'anticorps toxoplasmiques, ceux-ci empêchant la coloration vitale des toxoplasmes par le bleu de méthylène, la réaction nécessitant la présence du « Facteur accessoire », identique à l'ensemble « complément + properdine ».

Cette non-coloration des toxoplasmes correspond à une perte de vitalité des parasites qui sont partiellement lysés par les anticorps : cette lyse est aisément visible au microscope à contraste de phase. C'est la lecture de la réaction au contraste de phase, évitant la coloration délicate au bleu de méthylène, qui fut préconisée par Lelong et Desmonts, 1951.

Pour comparer nos antigènes d'une façon plus sensible nous nous sommes adressés à la réaction quantitative du test de lyse, afin de comparer les éventuelles variations du taux limite de positivité d'un sérum anti-toxoplasmique connu.

Test d'immunofluorescence indirecte (Ambroise-Thomas, 1969)

Cette technique a été préférée à l'immunofluorescence directe dont les résultats semblent toujours s'être montrés très inférieurs.

La réaction se fait en deux temps : le premier consistant à fixer les anticorps spécifiques éventuellement présents dans un sérum, sur les parasites, le second révélant cette fixation par un conjugué fluorescent contenant des anti-globulines correspondant au sérum testé dans le premier temps.

Résultats

Fixation du complément

La comparaison la plus valable est faite avec la souche B₁₂ qui depuis son isolement n'a jamais été congelée, mais conservée par passages péritoine-péritoine sur souris.

Pour la simplicité de l'exposé, les résultats obtenus avec la souche B₁₂ d'une part, et les souches C₃₆-D₃₆ d'autre part, seront exposés indépendamment.

Souche B₁₂

Une première comparaison a été faite entre un antigène fabriqué à partir d'exsudats prélevés à 48 heures sur la souche n'ayant jamais subi de congélation et un antigène fabriqué à partir d'exsudats prélevés sur des souris inoculées avec une suspension congelée diluée au 1/10 avec 10 p. 100 de DMSO et conservée 15 jours à — 79 °C. Les souris inoculées avec l'exsudat congelé ne fournissent un exsudat suffisamment abondant pour fabriquer l'antigène que 7 jours après l'inoculation.

Le sérum positif était un sérum de lapin expérimental, le sérum négatif : un sérum de lapin neuf, sans anticorps vis-à-vis des toxoplasmes.

Les résultats suivants furent obtenus :

Sérum +		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Sér. — au 1/4	Di- luent
B 12 sans congélation	1/10	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
	1/20	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
	1/40	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	+	±	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	+	±	±	0	0	0	0	0	0	0
B 12 15 jours à — 79 °C	1/10	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/40	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Témoins antigène	2 U	+	+	+	+	+	+	+	0	0	
	1 U	+	0	0	0	0	0	0	0	0	
Témoins diluant		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Complément		0	0	0	0						
		2 U	1 U	1/2 U	H *	* Témoin hématies sensibilisées					

On voit que l'antigène obtenu après congélation a un pouvoir antigénique nettement inférieur à celui obtenu sans congélation. Mais des critiques sont à adresser à cet antigène : en effet, le pouvoir infectant de l'inoculum congelé est très inférieur à celui de l'inoculum non congelé (cf. 1^{re} partie) entraînant un allongement de la production d'exsudat en quantité suffisante pour être prélevée.

Or, s'il est conseillé de prélever les exsudats précocement pour les antigènes, c'est qu'après 3 jours, l'animal commence à produire des anticorps contre les toxoplasmes, amoindrissant la valeur antigénique du matériel : notre antigène n'a pu être prélevé que 7 jours après l'inoculation.

Aussi avons-nous comparé l'antigène sans congélation, avec des antigènes de 1^{er} passage après congélation, de 2^e passage et de 3^e passage, puisque nous avons constaté (cf. 1^{re} partie) que c'est après 2 ou 3 passages que la suspension de toxoplasmes congelés retrouvait son pouvoir pathogène initial.

Lors de la première série de titrages, le sérum positif de lapin n'agissait jusqu'au 1/256 avec l'antigène de référence, le sérum négatif était aussi un sérum de lapin.

Les antigènes à titrer furent dilués au 1/10, 1/20, 1/40, 1/60, 1/80.

Les résultats obtenus furent les suivants :

Sérum +		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Sér. — au 1/4	Di- luant
B 12 sans congé- lation	1/10	+	+	+	±	0	0	0	0	0	0
	1/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B 12, 1 ^{er} passa- ge après 1 mois à — 79° C	1/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B 12, 2 ^e passage après 1 mois à — 79° C	1/10	+	+	+	±	±	0	0	0	0	0
	1/20	+	+	+	±	±	0	0	0	0	0
	1/40	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	±	±	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	±	±	±	0	0	0	0	0	0	0
B 12, 3 ^e passage après 1 mois à — 79° C	1/10	±	±	±	±	±	±	±	0	0	0
	1/20	±	±	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Témoins antigè- ne	2 U	+	+	+	+	±	±	±	0	0	
	1 U	±	±	±	±	0	0	0	0	0	
Témoins diluant		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Complément		0	0	0	0						
		2 U	1 U	1/2 U	H *	* Témoin hématies sensibilisées					

Les antigènes obtenus aux deuxième et troisième passages après congélation sont plus antigéniques que ceux obtenus avant congélation. L'absence du pouvoir antigénique de l'antigène de premier passage après congélation s'explique par le fait qu'il fallut attendre une semaine pour pouvoir prélever sur les souris de petites quantités d'exsudat assez pauvres en parasites mais contenant déjà des anticorps toxoplasmiques.

Une autre série d'antigènes fut titrée de la même façon, mais en diluant les antigènes au 1/2, 1/4, 1/8, 1/10, 1/20, afin d'augmenter la précision des résultats. Le sérum de lapin était positif à 1/512.

Le tableau suivant consigne les résultats.

Sérum +		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Sér. — au 1/4	Di- luant
B 12 sans congé- lation	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
	1/4	+	+	+	+	+	+	+	+	±	0
	1/8	+	+	+	+	+	±	0	0	0	0
	1/10	+	+	+	±	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0
B 12, 1 ^{er} passa- ge après 1 mois à — 79° C	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
	1/4	+	+	+	+	+	+	+	±	0	0
	1/8	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
	1/10	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
B 12, 2 ^e passage après 1 mois à — 79° C	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
	1/4	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/8	+	+	+	±	0	0	0	0	0	0
	1/10	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B 12, 3 ^e passage après 1 mois à — 79° C	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
	1/4	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/8	+	+	+	+	+	±	0	0	0	0
	1/10	+	+	+	±	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
Témoins antigè- ne	2 U	+	+	+	+	+	+	+	+	0	
	1 U	±	0	0	0	0	0	0	0	0	
Témoins diluant		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Complément		0	0	0	0						
2 U 1 U 1/2 U H * * Témoin hématies sensibilisées											

L'unité antigénique étant définie comme la plus grande dilution d'antigène qui donne une fixation en présence de la plus grande dilution de sérum, cette série donnerait les titrages suivants :

— sans congélation	1/4
— 1 ^{er} passage après congélation	1/4
— 2 ^e passage après congélation	1/4
— 3 ^e passage après congélation	1/4

Si on regarde les pouvoirs antigéniques des suspensions aux différentes dilutions, on constate un décalage au 1/8 et au 1/10 pour les suspensions de 1^{er} et 2^e passages après congélation, alors que le titrage de l'antigène obtenu avec le troisième passage est pratiquement identique au titrage de l'antigène obtenu avec la souche B₁₂ n'ayant jamais subi de congélation.

(suite de la 2^e série de titrages).

	1/10	+	+	+	+	±	±	0	0	0	0
C 36, 1 ^{er} passage	1/20	+	+	+	±	±	0	0	0	0	0
après 1 mois	1/40	+	+	+	±	0	0	0	0	0	0
à — 79° C	1/60	±	±	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	±	±	0	0	0	0	0	0	0	0
<hr/>											
	1/10	+	±	±	±	0	0	0	0	0	0
C 36, 2 ^e passage	1/20	±	±	±	0	0	0	0	0	0	0
après 1 mois à	1/40	±	±	±	0	0	0	0	0	0	0
— 79° C	1/60	±	±	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<hr/>											
	1/10	+	+	+	+	±	±	0	0	0	0
C 36, 3 ^e passage	1/20	+	+	±	±	±	0	0	0	0	0
après 1 mois à	1/40	+	+	±	±	0	0	0	0	0	0
— 79° C	1/60	+	±	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	±	±	0	0	0	0	0	0	0	0
<hr/>											
Témoins antigène	2 U	+	+	+	+	±	±	±	0	0	
	1 U	±	±	±	±	0	0	0	0	0	
<hr/>											
Témoins diluant		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<hr/>											
Complément		0	0	0	0						
<hr/>											
2 U 1 U 1/2 U H * * Témoin hématies sensibilisées											

Les première et seconde séries de titrages montrent une baisse de pouvoir antigénique aux premiers passages après congélation, ainsi qu'au second passage dans la seconde série. Pour cette seconde série, le titre du troisième passage (1/10) est le même que celui de la suspension « sans congélation ». La troisième série de titrages ne montre pas de variations antigéniques notables pour l'antigène « sans congélation », celui du premier passage et celui du second passage (titre au 1/4), alors que l'antigène de troisième passage atteint un titre plus élevé (1/8).

3^e série de titrages.

Sérum +		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Sér. — au 1/4	Di- luent
	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+
C 36 sans congé-	1/4	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
lation	1/8	+	+	+	+	+	±	0	0	0	0
	1/10	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0

(suite de la 3^e série de titrages).

Sérum +	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Sér. — au 1/4	Di- luent
C 36, 1 ^{er} passage après 1 mois à —79° C	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	0
	1/4	+	+	+	+	+	+	±	0	0
	1/8	+	+	+	+	±	0	0	0	0
	1/10	+	+	+	+	±	0	0	0	0
	1/20	+	+	±	0	0	0	0	0	0
C 36, 2 ^e passage après 1 mois à —79° C	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/4	+	+	+	+	+	+	+	0	±
	1/8	+	+	+	+	±	0	0	0	0
	1/10	+	+	+	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	±	0	0	0	0	0	0	0
C 36, 3 ^e passage après 1 mois à —79° C	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/8	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/10	+	+	+	+	+	±	0	0	0
	1/20	+	+	+	+	±	0	0	0	0
Témoins antigè- ne	2 U	+	+	+	+	+	+	+	0	
	1 U	±	0	0	0	0	0	0	0	
Témoins diluant		0	0	0	0	0	0	0	0	
Complément		0	0	0	0					
2 U 1 U 1/2 U H * * Témoin hématies sensibilisées										

*Souche D₃₆*1^{re} série de titrages.

Sérum +	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Sér. — au 1/4	Di- luent
	1/10	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/20	+	+	+	+	+	0	0	0	0
D 36 sans congélation	1/40	+	+	+	+	0	0	0	0	0
	1/60	+	+	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	+	0	0	0	0	0	0	0	0

(suite de la 1^{re} série de titrages).

	1/10	+	+	+	±	0	0	0	0	0	0
D 36 15 jours	1/20	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0
à — 79 °C	1/40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Témoins antigène	2 U	+	+	+	+	+	+	+	0	0	
	1 U	+	0	0	0	0	0	0	0	0	
		=									
Témoins diluant		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Complément		0	0	0	0						
		2 U	1 U	1/2 U	H *	* Témoin hématies sensibilisées					

2^e série de titrages.

Sérum +		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Sér. —	Di- au 1/4 luant
D 36 sans congé- lation	1/10	+	+	+	±	±	0	0	0	0	0
	1/20	+	±	±	±	0	0	0	0	0	0
	1/40	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	±	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D 36 1 ^{er} passage après 1 mois à — 79 °C	1/10	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/40	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D 36 2 ^e passage après 1 mois à — 79 °C	1/10	+	+	+	+	±	±	±	±	0	0
	1/20	+	+	±	±	±	0	0	0	0	0
	1/40	+	±	0	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	+	±	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	±	±	±	0	0	0	0	0	0	0
D 36 3 ^e passage après 1 mois à — 79 °C	1/10	+	+	±	±	±	0	0	0	0	0
	1/20	+	±	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/40	±	±	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/60	±	±	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/80	±	±	±	0	0	0	0	0	0	0
Témoins antigène	2 U	+	+	+	+	±	±	±	0	0	
	1 U	±	±	±	±	0	0	0	0	0	
Témoins diluant		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		0	0	0	0						
		2 U	1 U	1/2 U	H *	* Témoin hématies sensibilisées					

3^e série de titrages.

Sérum +		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	Sér. — au 1/4	Di- luant
D 36 sans congé- lation	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/4	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/8	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
	1/10	+	+	+	+	±	0	0	0	0	0
	1/20	+	+	+	±	0	0	0	0	0	0
D 36 1 ^{er} passage après 1 mois à — 79 °C	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/4	+	+	+	+	±	±	0	0	0	0
	1/8	+	+	+	±	0	0	0	0	0	0
	1/10	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
D 36 2 ^e passage après 1 mois à — 79 °C	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/4	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	1/8	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
	1/10	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
D 36 3 ^e passage après 1 mois à — 79 °C	1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±
	1/4	+	+	+	+	+	+	±	0	0	0
	1/8	+	+	+	+	±	0	0	0	0	0
	1/10	+	+	±	0	0	0	0	0	0	0
	1/20	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
Témoins antigè- ne	2 U	+	+	+	+	+	+	+	+	0	
	1 U	±	0	0	0	0	0	0	0	0	
Témoins diluant		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Complément		0	0	0	0						
2 U 1 U 1/2 U H * * Témoin hématies sensibilisées											

Les suspensions D₃₆ faites avec l'exsudat de premier passage montrent comme pour les autres souches une baisse d'antigénicité, mais la valeur antigénique se retrouve toujours aux second et troisième passages.

Test de lyse

Pour nos trois souches, il n'a pas pu être fait de comparaison entre souche non congelée et premier passage après congélation d'un mois à — 79 °C avec 10 p. 100 de DMSO et une dilution de l'exsudat au 1/10, ce premier passage ne permettant pas un prélèvement d'ascite 48 heures après inoculation.

Les second et troisième passages après congélation ont été pour chaque souche, comparés respectivement avec de l'exsudat témoin provenant de souris inoculées avec de l'exsudat non congelé. Chaque exsudat a été éprouvé vis-à-vis d'un sérum humain positif et d'un sérum humain négatif, ainsi que d'un sérum de lapin positif et d'un

sérum de lapin négatif. Les sérums positifs étaient conservés depuis cinq ans : le sérum humain était + au 1/10, $\pm$ au 1/100, O au 1/1000, le sérum de lapin était + au 1/1000, $\pm$ au 1/10000, O au 1/100000, c'est pourquoi nous avons fait des dilutions plus élevées pour le sérum de lapin expérimental.

Souche B₁₂

Les résultats suivants furent obtenus :

Sérums humains

Sérum +	SM	1/10	1/100	1/1 000	Sérum —
B 12 2 ^e passage après congélation	+	+	22 p. 100	0	0
B 12 Témoin sans congélation	+	+	14 p. 100	0	0
B 12 3 ^e passage après congélation	+	+	25 p. 100	0	0
B 12 Témoin sans congélation	+	+	30 p. 100	0	0

Sérums de lapin

Sérum +	1/10	1/100	1/1 000	1/10 000	Sérum —
B 12 2 ^e passage après congélation	+	25 p. 100	8 p. 100	0	0
B 12 Témoin sans congélation	+	30 p. 100	12 p. 100	0	0
B 12 3 ^e passage après congélation	+	40 p. 100	0	0	0
B 12 Témoin sans congélation	+	33 p. 100	11 p. 100	0	0

Les résultats sont assez homogènes, car si on constate quelques écarts dans les pourcentages de toxoplasmes lysés, ces écarts n'entraîneraient pas de différences dans les réponses relatives aux positivités des sérums.

*Souche C₃₆**Sérums humains*

Sérum +	SM	1/10	1/100	1/1 000	Sérum —
C 36 2 ^e passage après congélation	+	+	0	0	0
C 36 Témoin sans congé- lation	+	+	33 p. 100	0	0
C 36 3 ^e passage après congélation	+	+	34 p. 100	0	0
C 36 Témoin sans congé- lation	+	+	32 p. 100	0	0

Sérums de lapin

Sérum	1/10	1/100	1/1 000	1/10 000	Sérum —
C 36 2 ^e passage après congélation	+	19 p. 100	0	0	0
C 36 Témoin sans congé- lation	+	32 p. 100	21 p. 100	0	0
C 36 3 ^e passage après congélation	+	30 p. 100	18 p. 100	0	0
C 36 Témoin sans congé- lation	+	35 p. 100	15 p. 100	0	0

*Souche D₃₆**Sérums humains*

Sérum +	SM	1/10	1/100	1/1 000	Sérum —
D 36 2 ^e passage après congélation	+	+	47 p. 100	0	0
D 36 Témoin sans congé- lation	+	+	21 p. 100	0	0
D 36 3 ^e passage après congélation	+	+	30 p. 100	0	0
D 36 Témoin sans congé- lation	+	+	46 p. 100	0	0

Sérums de lapin

Sérum +	1/10	1/100	1/1 000	1/10 000	Sérum —
D 36 2 ^e passage après congélation	+	44 p. 100	56 p. 100	0	0
D 36 Témoin sans congélation	+	56 p. 100	66 p. 100	0	0
D 36 3 ^e passage après congélation	+	28 p. 100	23 p. 100	0	0
D 36 Témoin sans congélation	+	22 p. 100	0	0	0

Immunofluorescence indirecte :

Le sérum positif était un sérum humain de malade dont les résultats en pratique courante avaient été les suivants : + au 1/400, + au 1/1000, ± au 1/2000. Le sérum négatif était aussi un sérum humain.

Les exsudats des différentes souches ont été conservés 1 mois à — 79 °C avant d'être réinoculés à des souris : pour les premiers passages de chacune des trois souches, les exsudats ont été prélevés 6 jours après inoculation, alors que tous les autres exsudats ont été prélevés 48 heures après inoculation.

Souche B₁₂

Sérum +	1/400	1/1 000	1/2 000	Sérum —
B 12 sans congélation ..	+	+	±	0
B 12 1 ^{er} passage après congélation	+	±	+	0
B 12 2 ^e passage après congélation	+	+	+	0
B 12 3 ^e passage après congélation	+	+	0	0

Les résultats, quel que soit le passage, sont assez homogènes, sauf pour le troisième passage où le sérum positif aurait été répondu à un taux inférieur, pour un séro-diagnostic.

Souche C₃₆

Sérum +	1/400	1/1 000	1/2 000	Sérum —
C 36 sans congélation	+	+	+	0
C 36 1 ^{er} passage après congélation	+	+	+	0
C 36 2 ^e passage après congélation	±	+	±	0
C 36 3 ^e passage après congélation	+	+	±	0

Les résultats pour cette souche sont très homogènes et il faut noter que les lectures étaient particulièrement nettes.

Souche D₃₆

Sérum +	1/400	1/1 000	1/2 000	Sérum —
D 36 sans congélation ..	+	±	$\frac{+}{=}$	0
D 36 1 ^{er} passage après congélation	+	+	+	0
D 36 2 ^e passage après congélation	+	±	0	0
D 36 3 ^e passage après congélation	+	±	0	0

Les résultats du sérum positif avec l'antigène de 2^e et 3^e passages sont inférieurs d'un taux, mais d'une façon générale les lectures avec cette souche sont difficiles.

Commentaires

Les résultats obtenus avec trois des techniques les plus utilisées actuellement pour le sérodiagnostic de la toxoplasmose ne montrent pas de différences importantes entre les souches entretenues sur souris et les souches conservées à — 79 °C. Pratiquement, après la congélation, il faut attendre le second passage sur animaux, d'une part parce que les résultats des premiers passages ne sont pas toujours satisfaisants, d'autre part parce que la faible quantité d'exsudat produit tardivement au premier passage, aboutissent à des conditions défavorables pour la fabrication des antigènes. Ainsi que nous

l'avons proposé en première partie, le premier passage après congélation doit être considéré comme fait avec un inoculum très pauvre.

Dans la pratique courante, les antigènes de fixation du complément n'ont pas toujours la même valeur antigénique et certains insuffisamment antigéniques doivent être rejetés, ceci en dehors de toute congélation. Ainsi au tableau p. 270, nous voyons que l'antigène B₁₂, bien que la souche n'ait jamais été congelée, donne un antigène de valeur très inférieure au témoin, alors qu'au troisième passage, nous retrouvons un taux-limite équivalent au taux de l'antigène-témoin.

Le test de lyse par contre a donné des résultats relativement plus homogènes, quoique les critiques faites à cette réaction soient nombreuses, la principale étant le problème de l'étalonnage antigénique difficile avec un antigène vivant : nous utilisons toujours un exsudat de 48 heures, très riche en toxoplasmes, aussi nous devons toujours faire la réaction avec un excès d'antigène. Les résultats défavorables obtenus en fixation du complément avec les antigènes des premiers passages près congélation, ne pouvaient être vérifiés en test de lyse.

Le mode de fabrication des antigènes d'immunofluorescence indirecte doit faire éviter l'écueil de la pauvreté antigénique constatée lors des premiers passages en fixation du complément sur le dernier culot de lavage, on fait un comptage grossier et on cherche à obtenir un antigène dont la richesse soit environ de 1.500.000 toxoplasmes par ml. Mais cette dernière réaction est par là justement intéressante car elle montre qu'à richesse égale en toxoplasmes, le premier passage après congélation est aussi antigénique que les second et troisième, ou que les antigènes obtenus sans congélation.

Cette analyse antigénique obtenue par les réactions sérologiques courantes n'est que très grossière, et il faudrait étudier le devenir des différentes fractions antigéniques par les techniques immunologiques fines d'électrophorèse, cela pourrait constituer un travail important et complet en lui-même, alors que nous nous étions proposés de vérifier s'il était valable de conserver les souches de toxoplasmes à basses températures sans que cela perturbe les résultats des réactions sérologiques courantes.

CONCLUSIONS GENERALES

Toxoplasma gondii, fait l'objet de recherches dans de nombreux laboratoires et la toxoplasmose voit son importance s'accroître depuis ces dernières années, en pathologie humaine et animale. La conservation de ce parasite s'effectue traditionnellement par passages bi-hebdomadaires sur souris, méthode aléatoire, astreignante et coûteuse. C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'étudier une technique de conservation à la fois simple et efficace, qui respecte l'intégrité biologique du parasite.

De toutes les méthodes utilisées jusqu'ici pour conserver *Toxoplasma gondii*, la plus simple et la plus sûre paraît être celle décrite dans ce travail. Elle consiste à congeler lentement jusqu'à — 79 °C de l'exsudat péritonéal de souris infectées, dilué au 1/10 en eau physiologique avec adjonction de 10 p. 100 de DMSO, à le conserver à — 79 °C et à le décongeler rapidement à 37 °C. Dans de telles conditions les caractères biologiques et sérologiques du parasite ne sont pas modifiés.

Le diméthyl-sulfoxyde n'est pas dénué de toxicité pour les toxoplasmes, ce qui ne permet pas d'utiliser ce produit à des doses supérieures à 10 p. 100 ; mais à cette dose il est moins toxique que la glycérine et doué d'un meilleur pouvoir protecteur (ce dernier caractère étant particulièrement net lors de conservations prolongées).

Nous avons ainsi conservé pendant des périodes allant de plusieurs mois jusqu'à plusieurs années (5 ans 1/2), quatre souches de toxoplasmes avec une perte transitoire de pouvoir infectant, consécutive à la congélation, mais sans perte de virulence.

Ces résultats sont applicables aux toxoplasmes se multipliant sur cellules en culture.

L'étude cytologique a confirmé et précisé les résultats expérimentaux de la première partie, que ce soit en contraste de phase à l'état frais ou après fixation et coloration en microscopie optique et en microscopie électronique. Particulièrement en microscopie électronique, des lésions profondes du cytoplasme et de ses structures, du noyau et du nucléole sont constatées, alors que les éléments contribuant à donner son architecture au toxoplasme (membranes, tubules, conoïde, etc.) sont peu touchés et très visibles alors même que la vitalité de la cellule est profondément atteinte. Ceci confirme bien que l'action du froid, lors de mauvaises congélations n'est pas seulement mécanique : les membranes, très résistantes, apparaissent assez peu déchirées. Le froid exerce plutôt son action létale en modifiant les perméabilités membranaires, provoquant des modifications importantes des perméabilités ioniques, dénaturant les protéines cellulaires.

La conservation des souches de toxoplasmes dans les conditions définies ci-dessus n'entraîne pas de perturbations lors des différentes réactions sérologiques pratiquées couramment pour le sérodiagnostic de la toxoplasmose (fixation du complément, test de lyse, immunofluorescence indirecte).

Nous pouvons donc conclure que l'entretien des souches de toxoplasmes sur souris peut-être évité en congelant ces parasites en présence de diméthyl-sulfoxyde ; ils peuvent ainsi être conservés plusieurs années ; une telle méthode n'entraîne pas de modifications biologiques et sérologiques.

Bibliographie

- AMBROISE-THOMAS (P.), 1969. — Etude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immunofluorescence. Institut de Médecine et d'Hygiène Tropicale. Faculté de Médecine de Lyon.
- ANDJUS (R. K.), 1955. — Suspended animation in cooled, super cooled and frozen rats. *J. Physiology*, 128, 547-556.
- et RAJEVSKI (V.), 1961. — Réanimation du cœur isolé de grenouille après congélation. Effet du calcium. *J. Physiol.*, 53, 245-246.
- , — et POVLOVIC-HOURNAC (M.), 1962. — Réanimation et transplantation du cœur fœtal de Rat après congélation. *J. Physiol.*, 54, 272-273.
- ANSEL (H. C.) et LEAKE (W. F.), 1966. — Hemolysis of Erythrocytes by Antibacterial Preservatives III. Influence of Dimethyl-sulfoxyde on the Hemolytic activity of Phenol. *J. Pharm. Sc.*, 55, 685-688.

- ASHWOOD-SMITH (M. J.), 1967. — Radioprotective and Cryoprotective Properties of Dimethyl-Sulfoxide in Cellular Systems. Biological Actions of dimethyl-sulfoxide, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 141, 45-62.
- BECQUEREL (P.), 1909. — Sur la suspension momentanée de la vie chez certaines graines. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), (1) 149, 1052-1054.
- , 1910. — Recherches expérimentales sur la vie latente des spores des Mucorinées et des Ascomycètes. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 1, 150, 1437-1439.
- , 1925. — La suspension de la vie des graines dans le vide à la température de l'hélium liquide. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 181, 805-807.
- , 1932. — La reviviscence des plantules desséchées soumises aux actions du vide et à de très basses températures. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 194, 2158-2159.
- , 1936. — La vie latente de quelques Algues et Animaux inférieurs aux basses températures et la conservation de la vie dans l'univers. *C.R. Acad. Sci.*, 202, 978-981.
- , 1937. — La mort par le gel de la cellule végétale dans l'azote liquide à — 190 °C. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 204, 1267-1269.
- , 1948. — Reviviscence du *Xantheria parietina* desséché avec sa faune, six ans dans le vide et deux semaines à — 189 °C. Ses conséquences biologiques. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 226, 1413.
- , 1950. — La suspension de la vie au-dessous de 1/20 °K absolu par démagnétisation adiabatique de l'alun de fer dans le vide le plus élevé. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 231, 261.
- , 1950. — La vie latente des graines aux confins du zéro absolu. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 231, 1274-1277.
- BEN RACHID (M. S.), 1970. — Contribution à l'étude de la toxoplasmose du gondi. II. Comportement de *Ctenodactylus gundi* vis-à-vis d'*Isospora bigemina*. *Arch. Inst. Pasteur, Tunis*, 47, 33-35.
- et BLAHA (R.), 1969. — Contribution à l'étude de la toxoplasmose du gondi. I. Sensibilité du *Ctenodactylus gundi* à la souche Beverley de *toxoplasma*. *Arch. Inst. Pasteur, Tunis*, 46, 217-226.
- BOURONCLE (B. A.), 1965. — Preservation of Living cells at — 79 °C with Dimethyl-Sulfoxide. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 119, 958-961.
- , ASCHENBRAND (J. F.) and TODD (R. F.), 1970. — Comparison study of the effectiveness of dimethyl-sulfoxide and polyvinylpyrrolidone in the preservation of human leukemic blood cells at — 80 °C. *Cryobiology*, 6, 409-415.
- BRITTON (S. W.), 1924. — The effects of extreme temperatures on fishes. *Amer. J. of Physiol.*, 67, 411-421.
- CAUJOLLE (F. M. E.), CAUJOLLE (D. H.), CROS (S. B.) and CALVET (M. J. M.), 1967. — Limits of toxic and Teratogenic Tolerance of dimethyl-sulfoxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *Biological actions of DMSO*, 141, (1), 110-125. Disc. 126.
- CHATTON (E.) et BLANC (G.), 1951. — Notes et réflexions sur le Toxoplasme et la Toxoplasmose du Gondii (*Toxoplasma gondii*, Nicolle et Manceaux, 1909). *Arch. Inst. Pasteur, Tunis*, 1917, 10, 1-45. Réimpression *Inst. Pasteur Maroc*, 4, 245-290.
- CROS (S.), VOISIN (M. C.), TOLLON (Y.) et OREGLIA (J.), 1970. — Atteinte des bourgeons de membres d'embryons de poulet par le diméthyl-sulfoxyde. *Ann. Pharm. Franç.*, 28, 263-270.

- DESCHIEUS (R.) et MOLINARI (V.), 1963. — Le comportement des trypanosomes aux basses températures. *Ann. Soc. Belge Méd., Trop.*, 5, 811-820.
- DESMONTS (G.). — Diagnostic sérologique de la toxoplasmose. Cours d'immunologie générale et de sérologie de l'Institut Pasteur, publié sous la direction de STAUB (A. M.) et RAYNAUD (M.). 2^e éd., Fasc. VII, 1021-1041.
- , 1971. — Une découverte importante : le cycle naturel du Toxoplasme. *Presse médicale*, 79, 471-474.
- DISTEFANO (V.) and KLAHN (J. J.), 1965. — Observations on the Pharmacology and Hemolytic Activity of dimethyl-sulfoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7, 660-665.
- DUBEY (J. P.), 1967. — Studies on *Toxocara cati* larvae infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.*, 14, suppl. 42.
- , MILLER (N. L.) and FRENKEL (J. K.), 1970. — The *Toxoplasma gondii* Oocyst from cat feces. *Journ. Exp. Med.*, 132, 636-662.
- , MILLER (N. L.) and FRENKEL (J. K.), 1970. — Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasit.*, 56, 447-456.
- EYLES (Don. E.), COLEMAN (N.) and CAVANAUGH (D. J.), 1956. — Preservation of *Toxoplasma gondii* by freezing. *J. Parasit.*, (4), 42, 408-413.
- FARKAS (A. V.) and GÖBEL (M.), 1969. — Effect of dimethyl-sulfoxide on barley and yeast glucose-6 phosphate deshydrogenase. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sc. Hung.*, 4, 161-171.
- FARRANT (J.), 1965. — Mechanism of cell damage during freezing thawing and its prevention. *Nature*, 205, 1284-1287.
- FRANZ (T. J.) and van BRUGGEN (J. F.), 1967. — A possible Mechanism of Action of DMSO. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 141, 302-309.
- FRENKEL (J. K.), DUBEY (J. P.) and MILLER (N. L.), 1969. — *Toxoplasma gondii* Fecal Forms Separated from Eggs of the Nematode *Toxocara cati*. *Science*, 164, 432-433.
- , —, and —, 1970. — *Toxoplasma gondii* in Cats. Fecal Stages Identified as Coccidian Oocysts. *Science*, 167, 893-896.
- FULTON (J. D.) and SMITH (A. U.), 1953. — Preservation of *Entamoeba histolytica* at — 79 °C in the presence glycerol. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 47, 240-246.
- GARNHAM (P. C. C.), BAKER (J. R.) and BIRD (R. G.), 1962 a. — Fine structure of cystic form of *Toxoplasma gondii*. *Brit. Med. J.*, 5271, 83-84.
- , 1966. — Locomotion in the parasitic protozoa. *Biol. Rev.*, 41, 561-586.
- GIROUD (P.), LE GAC (P.), ROGER (F.) et GAILLARD (J. A.), 1953. — La toxoplasmose de l'adulte. *Sem. des Hôpitaux*, 77, 4036.
- GREENE (A.), BALU (H. A.), LEHR (H. B.) and CORIEIL (L. L.), 1970. — The effect of prolonged storage of cell cultures in dimethyl sulfoxide and glycerol prior to freezing. *Cryobiology*, 6, 552-555.
- GUSTAFSSON (P. V.), AGAR (H. D.) and CRAMER (D. I.), 1954. — An electron microscope study of « *Toxoplasma* ». *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 3, 1008-1021.
- HAGEMAN (R. F.), 1969. — Effect of dimethyl-sulfoxide on RNA synthesis in S. 180 tumor cells. *Experientia*, 25, 1298-1300.

- HIEMISCH (I.), 1970. — Erfahrungen mit der lokalen Anwendung eines in dimethyl-sulfoxyd (DMSO) incorporierten Antimycoticums) bei Onycho-Mykosen. *Mykosen*, 13, 175-177.
- HONIGBERG (B. M.), BALAMUTH (W.), BOVEE (E. C.), CORLISS (J. O.), GOJDICS (M.), HALL (R. P.), KUDO (R. R.), LEVINE (N. D.), LOEBLICH (A. R. Jr), WEISER (J.) and WENRICH (D. H.), 1964. — A revised classification of the phylum Protozoa. *J. Protozool.*, 11, 7-20.
- HUTCHISON (W. M.), 1965. — Experimental Transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 206, 961-962.
- , 1967. — The nematode transmission of *Toxoplasma gondii*. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 61, 80-89.
- , DUNACHIE (J. F.), SIIM (J. Ch.) and WORK (K.), 1970. — Coccidian-like. Nature of *Toxoplasma gondii*. *Brit. Med. J.*, 1, 142-144.
- , DUNACHIE (J. F.) and WORK (K.), 1968. — The faecal transmission of *Toxoplasma gondii*. *Acta path. microbiol. scandinav.*, 74, 462-464.
- , and WORK (K.), 1969. — Observations on the faecal transmission of *Toxoplasma gondii*. *Acta path. microbiol. Scand.*, 77, 275-282.
- JACOBS (L.), 1967. — *Toxoplasma* and Toxoplasmosis. *Adv. Parasitol.*, 5, 1-45.
- , JONES (F. E.) and MELTON (M. L), 1952. — The survival of *Toxoplasma gondii* in various suspending media. *J. Parasit.*, 38, 293-297.
- JADIN (J. M.) et CREEMERS (J.), 1968. — Etude de l'ultrastructure et de la biologie de *Toxoplasma gondii* (Nicolle et Manceaux, 1908). *Louvain Méd.*, 87, 361-375.
- , —, 1968. — Ultrastructure et biologie des Toxoplasmes III. Observations de Toxoplasmes intra-érythrocytaires chez un Mammifère. *Acta tropica*, 25, 267-270.
- J.A.M.A., 1965. — Editorials. The story of DMSO. *Jama*, 192, 320-321,
- KASS (E.), 1955. — The viability of *toxoplasma* in mouse carcass. *Acta Path. microbiol. scand.*, 37, 84-88.
- KIKKAWA (Y.) and GUEPT (B.), 1964. — *Toxoplasma* cysts in the human heart an electron microscopi study. *J. Parasit.*, 50, 217-225.
- KOBAYASHI (A.) et JACOBS (L.), 1963. — The effect of irradiation on « *Toxoplasma gondii* ». *J. Parasit.*, 49, 814-818.
- LALONDE (E. R.), 1969. — Absorption through oral mucous membranes. *J. Dent. Res.*, 48, 680-684.
- LAVERAN (A.) et MESNIL (F.), 1899. — Sur la morphologie des Sarcosporidies. *C.R. Soc. Microbiol.*, 6, n° 10, 245-248.
- LEAKE (Ch. D.), 1967. — Introductory Remarks. *Ann. N.Y. Ac. Sc., Biological actions of DMSO*, 141, 1, 1-2.
- LEAKE (Ch. D.), ROSENBAUM (E. E.) and STANLEY (W. J.), 1967. — Summary of the New York Academy of Sciences Symposium on the « Biological Actions of dimethyl-sulfoxide ». Biological actions of DMSO. *Ann. N.Y. Ac. Sc.*, 141, 1, 670-671,
- LEE (D.), 1970. — The relative Permeability of Lysosomes from *Tetrahymena pyriformis* to carbohydrates, lactate and the cryoprotective none lectrolytes glycerol and dimethyl-sulfoxide. *Biochem. Biophys. Acta.*, 211, 550-554.

- DE LEIRIS (J.), FEUVRAY (D.), DIACONO (J.) et DIETRICH (J.), 1969. — Action du diméthylsulfoxyde (DMSO) sur le cœur isolé et perfusé du rat. *J. Physiol.* (Paris), suppl. 2, 2, 338-339.
- LELONG (M.) et DESMONTS (G.), 1951. — L'emploi du microscope contraste de phase dans la réaction de Sabin et Feldman. *C.R. Soc. Biol.*, 145, 1660-1661.
- LEVINE (N. D.) 1961. — Problems in the Systematics of the « *Sporozoa* ». *J. Protozool.*, 8, 442-451.
- and MARQUARDT (W. C.), 1954. — The effect of glycerol on survival of *Trichomonas foetus* at freezing temperatures. *J. Protozool.*, 1, suppl. 4, 4-16.
- LOVELOCK (T. E.) and BISHOP (M. W. H.), 1959. — Prevention of freezing damage to living cells by dimethylsulfoxide. *Nature*, 183, 1394-1395.
- LUDVIK (J.), 1958. — Morphology of *Toxoplasma gondii* in electron microscope. *Acta Soc. Zool. Bo hemealovenic. Svazen., Cisko.*, 2, 130-136.
- , 1959. — Die Silberfivillenstruktur vei *Toxoplasma gondii* und *Sarcocystis tenella*. *Z. Parasitenk.*, 19, 311-314.
- LUND (E.), LYCKE (E.) and SOURANDER (P.), 1961. — Studies of « *Toxoplasma gondii* » in cells cultures by means of irradiation experiments. *Brit. J. Exp. Path.*, 42, 404-407.
- LUYET (B. J.), 1938. — Sur la survie des poissons plongés dans l'air liquide. *C.R. Soc. Biol.*, 127, 788-790.
- LUYET (B. J.) and HODAPP (E. J.), 1938. — Sur les noyaux cristallins dans un tissu végétal préalablement chauffé ou gelé. *C.R. Soc. Biol.*, 127, 788-790.
- and —, 1938. — Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Proc. Soc. Exp. Biol., and Med.*, 39, 433-434.
- , On the mechanism of growth of ice crystals in aqueous solutions and on the effect of rapid cooling in linderling crystallization, in *Recent research in freezing and drying*.
- LUYET (B. J.) and GEHENIO (P. M.), 1940. — Life and death at low temperatures. *Monograph. Normandy M.W.A. Biodynamica Press*.
- et GONZALES (F.), 1952. — Protective action of glycerol against freezing injury in embryonic tissues of chick. *Biodynamica*, 7, 101.
- et THOENNES (G.), 1938. — The survival of plant cells immersed in liquid air. *Sciences.*, 88, 284-285.
- MC CORD (J. M.) and FRIDOVICH (I.), 1969. — The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, DMSO and oxygen. *J. Biol. Chem.*, 244, 6056-63.
- MC ENTERT (M. G.), 1954. — The maintenance of stock strains of trichomonads by freezing. *J. Hyg. Cambridge*, 52, 545.
- , 1959. — Prolonged survival of *Trichomonas vaginalis* at — 79 °C. *Nature*, 183, 270-271.
- MC FARLANE (J. O.), RUCHMAN (I.), 1948. — Cultivation of *Toxoplasma* in the Developing chick Embryo. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 67, 1-4.
- MAC GREGOR (W. S.), 1967. — The chemical and Physical Properties of DMSO. Biological actions of DMSO. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 141, 3.
- MALININ (Th. I.) and PERRY (V. P.), 1967. — Toxicity of dimethylsulfoxide on Hela Cells. *Cryobiology*, 4, 90-96.

- MANWELL (R. D.), COULSTON (F.), BINCKLEY (E. C.) and JONES (V. P.), 1945. — Mammalian and avian *Toxoplasma*. *J. Inf., Dis.*, 76, 1-14.
- and DROBECK (H. P.), 1952. — Mammalian Toxoplasmosis in Birds. *Exp. Parasit.*, 1, 83-93.
- , —, 1953. — The behaviour of *Toxoplasma* with notes on its taxonomic status. *J. Parasit.*, (39), 6, 577-584.
- and EDGETT (R.), 1943. — The low-temperature freezing of malaria parasites. *Amer. Jour. Trop. Med.*, 23, 123-131.
- MANWELL (R. D.) and JEFFERY (G.), 1942. — Preservation of avian malaria parasites by low temperature freezing. *Proc. Soc. Exp. Biol., and Med.*, 50, 222-224.
- MAZUR (P.), 1960. — Physical factors implicated in the death of micro-organisms at subzero temperatures. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 85, 610-629.
- MAZUR (P.), 1962. — Mechanisms of injury in frozen and frozen dried cells. *Spec. Cong. Coll. Ottawa*, 55-68.
- MEYER (H.), and DE ANDRADE MENDONCA (I.), 1955. — Electron microscopic observations of *Toxoplasma* « Nicolle et Manceaux » grown in tissue cultures (first note). *Parasitology*, 45, 449-451.
- MIDDLETON (Ch. J.), HOWES (E. L.) and MAZENS (M. F.), 1970. — Effects of dimethyl-sulfoxide on normal and burned dog skin. *Proc. Soc. Exp., Biol. Med.*, 134, 1096-1103.
- NICOLAU (S.) et RAVELO (A.), 1937. — La réaction de fixation du complément dans le sérum et les extraits d'organes d'animaux atteints de toxoplasmose expérimentale. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 30, 855-859.
- NICOLLE (Ch.), 1930. — Naissance, vie et mort des maladies infectieuses, Nouvelle coll. Scientifique, Félix Alcan, édit.
- , 1961. — Destin des maladies infectieuses suivi de l'expérimentation dans l'Etude des maladies infectieuses. Les classiques de la Médecine. Guilde internationale des Médecins. Alliance culturelle du Livre. Genève-Paris-Bruxelles.
- et MANCEAUX (L.), 1908. — Sur une infection à corps leishmann (ou organisme voisin) du gondii. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 147, 763-766.
- et —, 1909. — Sur un protozoaire nouveau du gondii (*Toxoplasma N.Gen.*). *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 148, 639.
- NORBY (R.) and LYCKE (E.), 1967. — Factor enhancing the host cell penetration of *Toxoplasma gondii*. *J. Bacteriol.*, 93, 53-58.
- NORRED (W. P.), ANSEL (H. C.), ROTH (I. L.) and PEIFER (J. J.), 1970. — Mechanism of dimethyl-sulfoxide induced hemolysis. *J. Pharm. Sci.*, 59, 618-622.
- OLISA (E. G.), 1963. — The fine structure of reproducing « *Toxoplasma gondii* ». *Parasitology*, 53, 643-649.
- O.M.S., 1969. — La Toxoplasmose. *Org. Mond. Santé. Sér. Rapp. Techn.*, 431, 27-29.
- PARKES (A. S.), 1945. — Preservation of human spermatozoa at low temperatures. *Brit. Med. J.*, 2, 212.
- and SMITH (A. U.), 1952-1953. — Regeneration of rat ovarian tissue fed-after exposure to low temperatures. *Proc. Roy. Soc.*, 140, 455.
- and —, 1954. — Preservation of ovarian tissue at — 79 °C for transplantation. *Acta Endocrinol.*, 17, 313.

- , 1958. — Factors affecting the viability of frozen ovarian tissue. *J. Endocrinol.*, 17, 337.
- and SMITH (A. V.), 1960. — Recent research in freezing and drying. (Ed. Parkes), 1 vol., 320, Blackwell-Oxford publ., 304.
- PICTET (R.), 1893. — De l'emploi méthodique des basses températures en biologie. *Arch. Sci., Phys. et Nat.*, 30, 293.
- POLGE (C.), 1951. — Functional Survival of Focal Spermatozoon after Freezing at — 79 °C. *Nature (Lond.)*, 167, 949-950.
- and ROWSON (L. E. A.), 1952. — Fertilizing Capacity of Bull Spermatozoa after Freezing at — 79 °C. *Nature (Lond.)*, 169, 626-627.
- , SMITH (A. V.) and PARKES (A. S.), 1949. — Revival of spermatozoa after vitrification and deshydration at low temperatures. *Nature (Lond.)*, 164, 666.
- and SOLTYS (M. A.), 1957. — Preservation of Trypanosomes in the frozen state. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.*, 51, 519-526.
- and —, 1960. — Protective action of some neutral solutes during the freezing of bull spermatozoa and trypanosomes in Recent Research in freezing and drying by PARKES (A. S.) and SMITH (A. V.), 1, 87-100.
- POUCHET (F.), 1866. — Recherches expérimentales sur la congélation des animaux. *J. Anat. et Physiol.*, 3, 1-36.
- PRIBORD (B.) and NOVAK (R.), 1969. — The relation of the cryoprotective action of dimethylsulfoxide to salt damage to frog sciatic nerves. *Cryobiology*, 6, 126-129.
- RAMMLER (D. H.), 1967. — The effect of DMSO on Several Enzyme Systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 141, 291-299.
- et ZAFFARONI (A.), 1967. — Biological Implications of DMSO Based on a Review of Its chemical Properties. Biological Actions of DMSO. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 141, 13-23.
- RAPATZ (G.) and LUYET (B.), 1968. — Combined effects of freezing rates and of various protective agents on the preservation of human erythrocytes. *Cryobiology*, 4, 215-222.
- RESSLER (R.), LERAY (D.) et GOEDVRIEND (J.), 1965. — Conservation de protozoaires particulièrement en culture, à la température de l'azote liquide. *Ann. Soc. belge Med. Trop.*, 45, 665-678.
- ROSEBAUM (E. E.), MERSCHLER (R. J.) et JACOB (S. W.), 1965. — Dimethyl-sulfoxide in Musculoskeletal Disorders. *Jama*, 192, 309-313.
- ROSTAND (J.), 1946. — Glycérine et résistance du sperme aux basses températures. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 223, 1524-25.
- SABIN (A. B.), 1938. — Isolation of a filtrable, transmissible agent with « neurolytic » properties from toxoplasma-infected tissues. *Science*, 88, (2278), 189-191.
- , 1941. — Toxoplasmic encephalitis in children. *Jama*, 116, 801-807.
- and FELDMAN (H. A.), 1948. — Dyes as microchemical indicators or a new immunity phenomena affecting a protozoon parasite (Toxoplasma). *Science*, 108, 660-663.
- and OLITSKY (P. K.), 1937. — Toxoplasma and obligate intra-cellular parasitism. *Science*, 85, 336-338.
- SCHNURRENBERGER (P. R.), TJALMA (R. A.), WENTWORTH (F. H.) et WENTWORTH (B. B.), 1964. — Association of human reaction to intradermal toxoplasmin with degree of animal contact and rural residence. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 13, 281-286.

- SENAUD (J.), 1967. — Contribution à l'étude des Sarcosporidies et des Toxoplasmes. *Protistologica*, 3 (2), 167-232.
- SHEFFIELD (H. G.) and MELTON (M. L.), 1969. — *Toxoplasma gondii*: Transmission through Feces in Absence of *Toxocara cati* Eggs. *Science*, 164, 431-432.
- SMITH (E. R.), MASON (M. M.) and EPSTEIN (E.), 1969. — The ocular effects of repeated dermal applications of dimethyl-sulfoxide to dogs and monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 170, 364-370.
- SPALLANZANI (L.), 1776. — Opusculs de physique animale et végétale. Traduction de l'italien par SENEBIER. *J. Zool.* (Paris), 1787, 189-205.
- STENBACK (F.), 1970. — The solvent effect of dimethyl-sulfoxide in experimental skin carcinogenesis. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.*, 48, 63-65.
- STJERNVALL (L.), 1969. — Dimethyl-sulfoxide (DMSO) abolishes the carcinogenprovoked cytoplasmic barrier of Malignant Epidermal Cells. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.*, 47, 253-258.
- STONE (W. B.) and MANWELL (R. D.), 1963. — Viability of the proliferation form of *Toxoplasma* in distilled water. *J. Parasit.*, 49, 1036-1037.
- SURJUS (A.), LAVILLAUREIX (J.) et GRUNER (J. E.), 1963. — L'encéphalite à toxoplasme de la souris. Apparition de structures fibrillaires dans le noyau des neurones et de la glie. *C.R. Soc. Belge, Biol.*, Paris, 157, 1059-1061.
- THIBAUT (Ph.), 1965. — Que penser du DMSO ? *Presse Médicale*, 73, 2678.
- THOMAS (J. A.), 1962. — Exposés actuels de biologie cellulaire. *Masson et C^{ie}*, édit., Paris, 6 (Survie et conservation biologique).
- VAILLES (Cl.), DEBRAY (Ch.), SOUCHARD (M.) et ROZE (C.), 1970. — Action hémolytique du diméthyl-sulfoxyde chez le Rat. Protection partielle par le Sorbitol. *Ann. Pharm. Franç.*, 28, 85-92.
- VAN DEN BERG (L.) and SOLIMAN (F. S.), 1969. — Effect of glycerol and dimethyl-sulfoxide on changes in composition and pH of buffer salt solutions during freezing. *Cryobiology*, 6, 93-97.
- VAN THIEL (P. H.), 1956. — The taxonomic status of « *Toxoplasma gondii* ». *Antonie v. Leenwenbock.*, 22, 248-256.
- VAN DER WAAIF (D.), 1960. — Formation, growth and multiplication of « *Toxoplasma gondii* » cysts in mouse brains. *Acta Leidensia*, 30, 163-180.
- VERMEIL (C.), TUSQUES (J.), SENELARD (R.) et coll., 1965. — Etude au microscope électronique de l'infrastructure des toxonèmes de « *Toxoplasma gondii* », leur modification sous l'action lytique des anticorps toxoplasmiques. *C.R. Acad. Sci.*, (Paris), 261, 1384-1387.
- VIVIER (E.) et PETIPREZ (A.), 1969. — Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus-fils chez *Toxoplasma gondii*. *J. of cell. Biol.*, 43, 329-343.
- VOGIN (E. E.), CARSON (S.), CANNON (G.), LINEGAR (Ch.) and RUBIN (L. F.), 1970. — Chronic Toxicity of DMSO in Primates. *Toxic Appl. Pharmacol.*, 16, 606-612.
- VUOPALA (U.), ISOMAKI (H.) and KAIPAINEN (W. J.), 1969. — Dimethyl-sulfoxide (DMSO) ointement in the treatment of rheumatoid arthritis. A Double Blind Study. *Acta Rhum. Scand.*, 15, 139-144.

- WALKER (P. J.) and ASHWOOD-SMITH (M. J.), 1961. — Dimethyl-sulfoxide, an alternative to glycerol, for the low-temperature preservation of trypanosomes. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 55, 93-96.
- WANKO (T.), JACOBS (L.) and GAVIN (M. A.), 1962. — Electron microscope study of Toxoplasma cysts in mouse brain. *J. Protozoology*, 9, 235-242.
- WERNER (H.), 1963. — Zur Terminologie der Entwicklungstadien von « Toxoplasma gondii ». *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 188, 121-131.
- WEIGMANN (R.), 1936. — Zur Kältebeständigkeit poikilothermer Tiere Untersuchung an Schnecken und Fischen. *Biol. Centralbl.*, 58, 301-322.
- WEINMANN (D.) and MC ALLISTER (J.), 1947. — Prolonged storage of human pathogenic protozoa with conservation of virulence: observations on the storage of helminths and leptospira. *Amer. J. Hyg.*, 45, 102-121.
- WIKTOR (I. J.), 1950. — Toxoplasmose animale. Sur une épidémie de lapins et de pigeons à Stanleyville (Congo Belge). *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 50, 97.
- WILDFUHR (G.), 1956. — Experimentelle Versuche zur Resistenz der Toxoplasma. *Z. Hyg. Infektr.*, 143, 134-139.
- , 1966. — Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Morphologie und Reproduktion von « Toxoplasma gondii ». Die feinstruktur von « Toxoplasma gondii » nach Einwirkung I. verschiedener Fixationsmittel (Osmium tetroxyd, Kaliumpermanganat und glutamaldehyd). *Zbl. Bakt., I. Abt., Origis*, 200, 525-535.
- WILLSON (J. E.), BROWN (D. E.) and TIMMENS (E. K.), 1965. — A toxicologic Study of dimethyl-sulfoxide. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 104-112.
- WOLF (A.), COWEN (D.) and PAIGE (B. H.), 1939. — Toxoplasmosis encephalomyelitis. III. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoan. *Ann. J. Path.*, 15, 657-694.
- , — and —, 1939. — Human toxoplasmosis. Occurrence in infants as an encephalomyelitis. Verification by transmission to animals. *Science*, 89, 2306-226-227.
- WOOD (D. C.), WEBER (F. S.), LARSEN (J. B.) and SMITH (J. C.), 1970. — Some experimental studies with dimethyl-sulfoxide (DMSO) in cold injury. *Curr. Ther. Res.*, 12, 97-110.
- WORK (K.) and HUTCHISON (W. M.), 1969. — Brief Report. A new cystic form of Toxoplasma gondii. *Acta path. microbiol. scandinav.*, 75, 191-192.
- and —, 1969. — The new cyst of Toxoplasma gondii. *Acta path. microbiol. scand.*, 77, 414-424.
-