

# ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Volume 61

1986

N° 3

© Masson, Paris, 1986.

*Ann. Parasitol. Hum. Comp.*,  
1986, 61, n° 3, pp. 265-272.

## MÉMOIRES ORIGINAUX

### INFLUENCE DU NOMBRE DE PARASITES INOCULÉS SUR L'INFESTATION *IN VITRO* DE CELLULES HELA PAR LA COCCIDIE *BESNOITIA JELLISONI* FRENKEL

A. SADAK\*, S. FRONTIER\*\* et E. PORCHET\*\*\*

**RÉSUMÉ.** L'influence du nombre de bradyzoïtes de *Besnoitia* (Coccidie), introduits dans le milieu de culture de cellules Hela en confluence, sur leur taux de pénétration dans ces cellules a été recherchée. Le taux de pénétration intracellulaire augmente avec la concentration des parasites inoculés, mais atteint un palier au-dessus d'une certaine densité. De fortes densités de bradyzoïtes dans l'inoculum conduisent à une inégale répartition des parasites intracellulaires dans la surface de la monocouche des cellules Hela. Les infections multiples dans une même cellule ne surviennent pas au hasard. Il semble que certaines cellules soient meilleures candidates que d'autres à l'infestation parasitaire.

#### **Influence of the number of bradyzoites of the *Coccidia Besnoitia jellisoni* Frenkel inoculated *in vitro* in culture medium of Hela cells**

**SUMMARY.** The influence of the number of bradyzoites of the *Coccidia Besnoitia* inoculated in the culture medium of Hela cells on their penetration rate was investigated. The intracellular penetration rate increased with the "size of inoculum", then seemed constant when a certain density is reached. Important densities of bradyzoites in the inoculum led to an unequal distribution of intracellular parasites among the cellular sheet. Multiple infective units in a same host cell did not occur randomly. It seems that some cells are more suitable than others to parasite invasion.

\* Adresse actuelle : Laboratoire de Biologie, Université de Rabat, Maroc.

\*\* Laboratoire de Biologie animale, Service d'Écologie numérique.

\*\*\* U.A. C.N.R.S. n° 148, Université des Sciences et Techniques de Lille I, F 59655 Villeneuve-d'Ascq Cedex.

Ce travail a reçu l'aide du C.N.R.S. (ERA n° 184).

Accepté le 8 mars 1985.

La pénétration et le développement des Coccidies dans des cellules animales dépendent non seulement de la nature, de l'âge, du nombre des parasites, mais aussi d'une infinité de facteurs « environnants », qu'il est difficile de maîtriser, même en système *in vitro*. De nombreux travaux ont été publiés sur ce thème (voir revue dans Doran, 1982), mais la diversité même des protocoles expérimentaux employés ne permet pas de dégager des conclusions claires de ces résultats. Ainsi Dvorak et Howe (1977) écrivent-ils à propos des capacités infectieuses de *Toxoplasma* : « many of studies... have been hampered by a lack of suitable methodology or instrumentation to allow an unambiguous interpretation of the phenomena observed ». L'addition à des milieux de culture par ailleurs standardisés, de facteurs de croissance comme des sérums naturels, de composition variable et en quantité variable, est un exemple des paramètres peu contrôlables qui peuvent amener les auteurs à des interprétations contradictoires.

La phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule-hôte influence elle-même l'infection par *Toxoplasma* et *Trypanosoma* (Dvorak et Crane, 1981), ce qui souligne l'intérêt d'employer des cultures cellulaires synchronisées.

La plupart des études réalisées jusqu'alors dans ce domaine concernent *Eimeria* et *Toxoplasma*, très peu *Besnoitia* (revue dans Doran 1982).

Le travail qui suit se propose de rechercher les relations numériques entre le nombre des *Besnoitia* introduits dans une culture de cellules Hela et celui des parasites qui pénètrent effectivement dans les cellules.

## Matériel et méthodes

Les cellules Hela utilisées dans les expériences sont cultivées dans des flacons Nunclon de 25 cm<sup>2</sup>, dans 4 ml de milieu M E M, additionné de 2 % de sérum de veau fœtal. Le même sérum a été employé dans toutes les expériences, et la faible concentration de 2 % a été retenue comme étant suffisante à la fois à la croissance des cellules et aux capacités de pénétration des parasites (Sadak, 1983). Toutes les infections ont été réalisées sur des cellules en confluence qui, selon Dvorak et Crane (1981), sont en majorité en phase G1, ce qui se rapproche des conditions d'une culture synchrone ; l'état de confluence limite en outre les possibilités de mitoses susceptibles de faire varier le nombre des cellules dans la durée des expériences. Par ailleurs, cette durée a été choisie très inférieure à celle du cycle des cellules Hela dont nous disposons (26 à 29 heures) et à celui du rythme des divisions du parasite (24 heures) (Porchet-Henneré *et al.*, 1985).

La question du « synchronisme » des parasites eux-mêmes a été résolue en employant des bradyzoïtes, stades infectieux issus de kystes chroniques où ils peuvent être considérés comme étant en « dormance », ce qui n'est pas le cas des tachyzoïtes des infections aiguës, dont l'état physiologique n'est pas contrôlable.

Les kystes sont prélevés sur le péritoine de souris infectées au Laboratoire. Après stérilisation dans une solution d'antibiotiques (5000 000 U I pénicilline, 500 mg de streptomycine/litre) en tampon P B S, ils sont repris dans le milieu de culture, écrasés

à l'aide d'un broyeur de tissus manuel, libérant les bradyzoïtes. Ceux-ci sont purifiés par tamisage sur une trame de nylon de maille 1,25 mm, puis sur une membrane nucléopore de pore 9  $\mu\text{m}$ . Les concentrations en bradyzoïtes requises pour chaque expérience sont calculées après comptage sur cellule de Malassez. Chaque « inoculum » est une suspension de parasites de 1 ml. Les cultures infectées sont incubées à 37° ; le milieu est remplacé après 6 heures par 5 ml de milieu neuf. Nous avons en effet déterminé précédemment qu'après 6 heures les parasites perdent leur pouvoir infectieux (Sadak, 1983).

Les tapis cellulaires sont fixés à la glutaraldéhyde à 2 % en tampon cacodylate, et colorés par la méthode rapide fushsine L M R et 22 bleu L M R 18 (Labo. moderne). Les couches de cellules sont ensuite incluses dans un film de polyvinyle (Solursh *et al.*, 1981). La totalité du fond de chaque boîte peut être ainsi prélevée, et après découpage en 3 rectangles, collée au Xam sur des lames histologiques.

Les cellules sont comptées dans une surface de référence arbitrairement constituée par le champ de préparation visible dans le rectangle gravé d'un oculaire de microscope. Cinq champs — dont les coordonnées sont déterminées au hasard — sont examinés par lame. Pour chaque flacon 15 champs sont donc considérés, ce qui correspond à une surface de  $525 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2$ .

Chaque expérience est conduite simultanément dans 2 flacons et réalisée 2 fois.

Les relevés numériques considérés sont : le nombre total de cellules dans la surface de référence, le pourcentage de cellules infestées et le nombre de parasites intracellulaires pour 100 cellules (ou R N I U : « relative number of infective units » selon Lycke et Lund, 1964).

La répartition des cellules et des parasites est étudiée par des méthodes statistiques faisant référence à la loi de Poisson (Fischer, 1954).

## Résultats et discussion

Des inoculums contenant 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 ou 32 millions de parasites sont utilisés. La *figure 1* montre que le R N I U et le pourcentage de cellules infectées augmentent jusqu'à une « taille d'inoculum » de 16 millions, puis stagnent.

Une corrélation linéaire entre le nombre de *Toxoplasma* de l'inoculum et le nombre de parasites infectants a été rapportée (Holtz et Albrecht 1953, Lycke et Lund 1964, Norrby 1970).

Doran (1971) observe, comme dans le cas présent, un palier dans la courbe représentant la croissance du nombre de sporozoïtes d'*Eimeria* infectant des cellules de rein de poulet, au-dessus d'une certaine concentration de parasites dans l'inoculum.

La répétition des expériences dans le temps donne des résultats qui conduisent à la construction de courbes similaires. Cependant le pourcentage de parasites infectants varie selon les cas. Il est probable que certains kystes, plus « vieux » peut être que d'autres, contiennent moins de parasites virulents ; cette hypothèse a été retenue à propos des capacités infectantes des sporozoïtes d'*Eimeria meleagridis* par Doran et Vetterling (1963).

On peut remarquer sur la *figure 1* que le R N I U est toujours supérieur au pourcentage de cellules parasitées, ce qui signifie que certaines cellules abritent plusieurs parasites. La répartition au hasard des parasites au sein de la culture est testée par référence à la loi de Poisson. On sait (Fisher, 1954) qu'en cas de répartition au hasard, la quantité  $(n-1)\frac{s^2}{\bar{x}}$ , (où  $\bar{x}$  et  $s^2$  sont les estimations de la moyenne et de la variance des nombres d'éléments dénombrés dans  $n$  échantillons), est distribuée comme un  $\chi^2$  à  $(n-1)$  DL. On peut alors calculer un intervalle de confiance de la loi

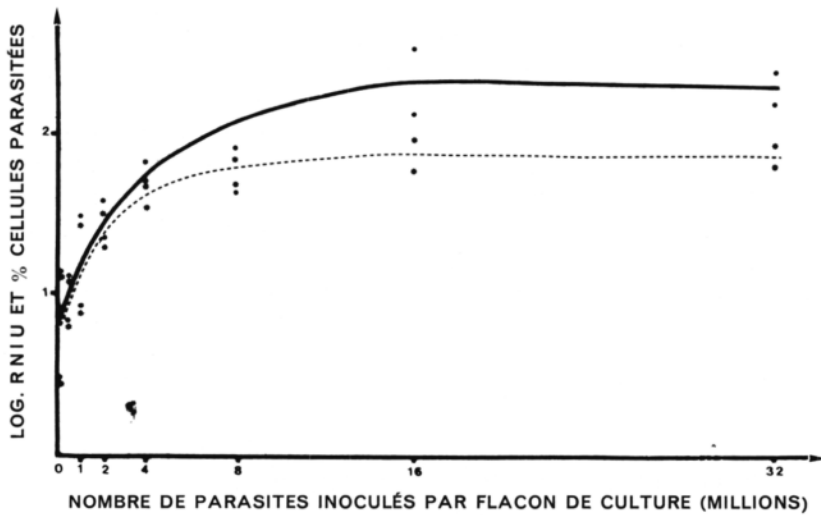


FIG. 1. — Influence du nombre de parasites dans l'inoculum, sur le R N I U (trait plein) et le pourcentage de cellules infectées (trait pointillé).

de Poisson ( $\sigma^2/m = 1$ ). Nous représentons cet intervalle de confiance au niveau 95 %, sur un graphique ( $\log x$ ,  $\log s^2$ ), par l'espace situé entre deux droites parallèles à la première diagonale (*fig. 2*). Des points observés en dehors de cet intervalle indiquent une surdispersion (« overdispersion ») significative.

On peut estimer que, jusqu'à une concentration de 4 millions de parasites inoculés par boîte, la répartition des parasites est faite au hasard, puisque la majorité des valeurs est comprise dans la zone de confiance de la loi de Poisson à 95 %. Par contre ce n'est plus le cas pour des inoculums plus concentrés où il y a surdispersion. Il se peut que les fortes concentrations en parasites favorisent leur agglomération dans des inoculums denses, ce qui aurait pour conséquence une inégale répartition de ceux-ci lors de leur sédimentation sur le tapis cellulaire. Une surdispersion apparaît de même pour les fortes densités dans le plancton ; cependant la divergence avec la loi de Poisson ne dépend que du nombre moyen d'éléments par unité échantillon, de sorte que la conformité avec cette loi ne signifie pas qu'il n'y a pas de surdispersion, mais seulement que celle-ci ne peut être mise en évidence lorsque la taille de l'échantillon

est trop petite (Frontier 1973). Ainsi, la surdispersion observée dans la répartition des parasites sur le tapis cellulaire ne pourrait être mise en évidence à l'échelle d'une seule cellule prise comme unité d'échantillonnage.

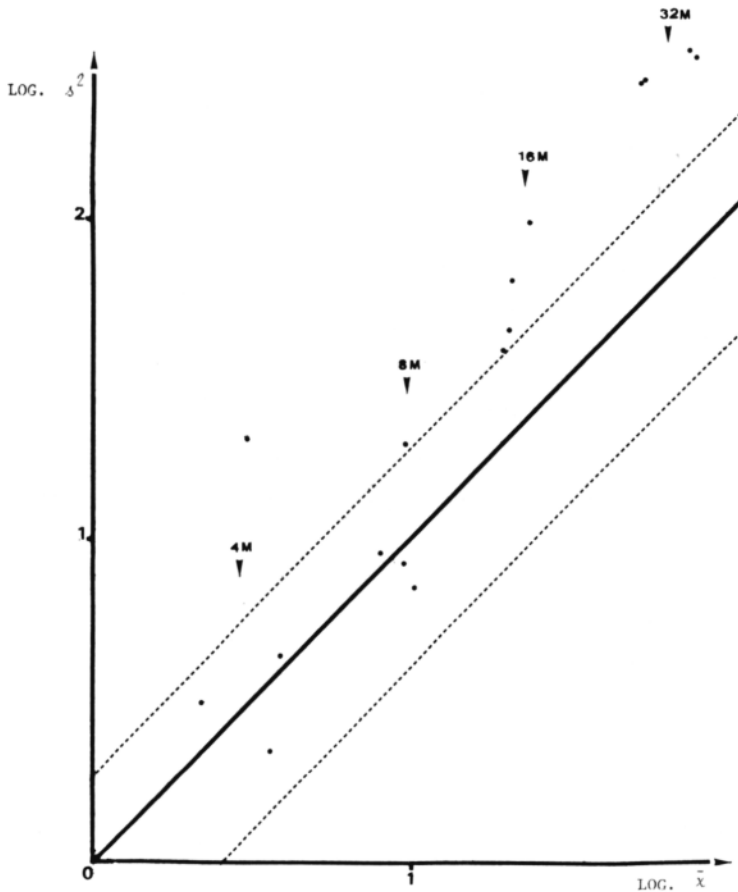


FIG. 2. — Relation moyenne-variance (en coordonnées log. log.) pour les nombres de parasites intracellulaires. Chaque moyenne et variance est calculée à partir des 15 rectangles de référence considérés par boîte. Les lignes pointillées délimitent la zone de confiance à 95 % de la loi de Poisson théorique représentée par la diagonale en trait plein.

Nous avons recherché par la même référence à la loi de Poisson si le nombre de parasites par cellule est lié au hasard. Dans chacun des 15 rectangles des boîtes ayant reçu 8, 16 et 32 millions de parasites nous avons noté le nombre de cellules contenant  $k = 0, 1, 2, \dots, 10$  parasites. La comparaison entre les fréquences observées et les fréquences théoriques selon la loi de Poisson est représentée dans les doubles histogrammes de la distribution des fréquences (fig. 3).

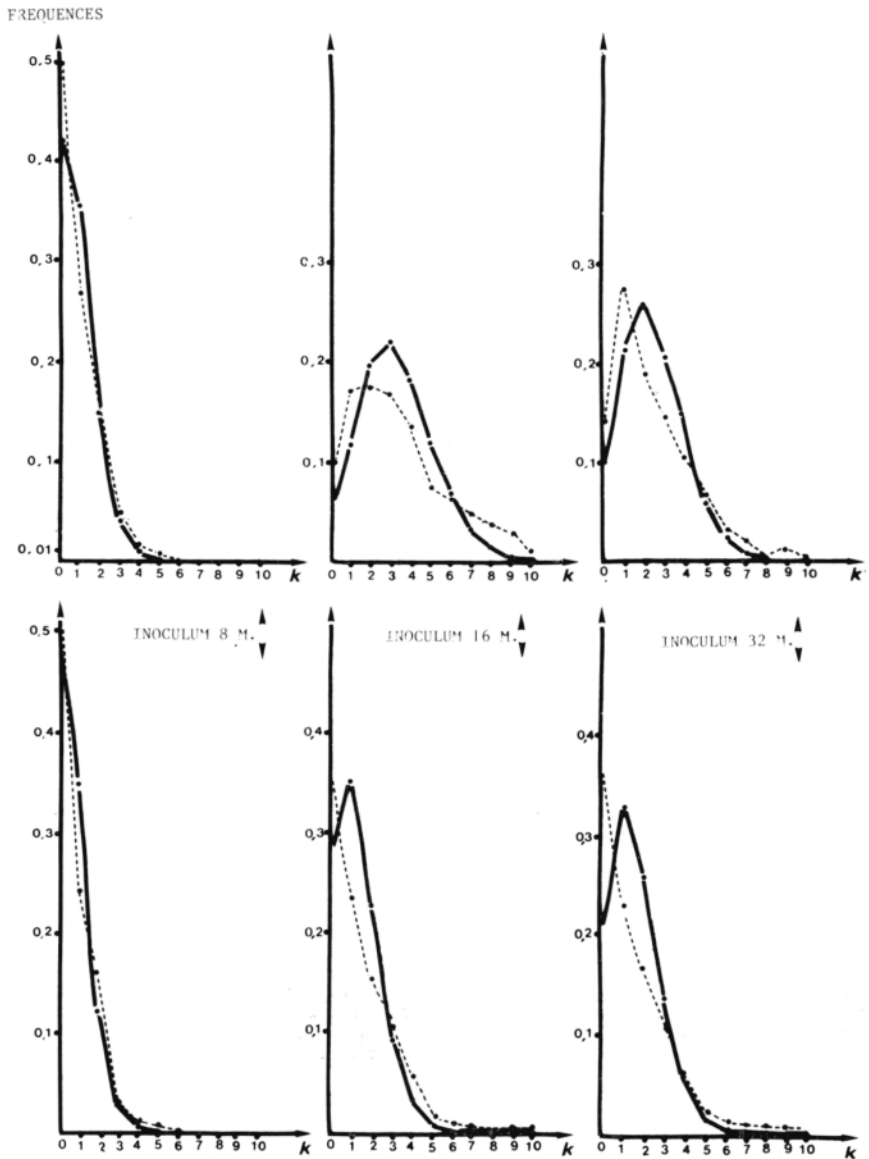


FIG. 3. — Distribution des fréquences observées (trait pointillé) et des fréquences théoriques conformes à la loi de Poisson (trait plein), du nombre ( $k$ ) de parasites ayant pénétré dans une même cellule, pour différentes concentrations de parasites dans l'inoculum (8, 16, 32 millions par flacon). Chaque concentration est testée deux fois.

On voit que les cas où il y a 1 (ou peu de) parasite par cellule sont moins nombreux que par hasard, alors que les cellules non parasitées et multiparasitées sont plus fréquentes.

Cette différence est toujours hautement significative comme le montre le tableau du test  $\chi^2$  sur les fréquences (*tableau I*) :

TABLEAU I. — Comparaison entre la distribution théorique selon Poisson, et la distribution réelle observée pour les 3 concentrations de parasites dans l'inoculum testées.

Taille de l'inoculum (millions par flacon)	$\chi^2$ calculé	Degrés de liberté DL	Seuil du $\chi^2$ à 1 0/00	Niveau de signification
8	20.65	3	16.266	< 1 0/00
8	19.40	3	16.266	< 1 0/00
16	97.45	8	26.125	≪ 1 0/00
16	100.43	5	20.515	≪ 1 0/00
32	74.52	7	24.322	≪ 1 0/00
32	151.04	6	22.457	≪ 1 0/00

## Conclusion

Le nombre de *Besnoitia* intracellulaires dans une culture confluite de cellules Hela est fonction du nombre de parasites inoculés jusqu'à un certain seuil (8 millions de parasites dans nos conditions expérimentales). Au-delà, il y a un palier exprimant un degré de « saturation » de la culture.

L'inoculation des cultures par de fortes concentrations en parasites aboutit à une inégale répartition des parasites intracellulaires sur la surface de la culture. Ceci peut s'interpréter comme résultant de l'agglomération de groupes de parasites entre eux dans ce type d'inoculum dense.

On remarque en outre que les cellules Hela sont inégalement réceptrices au parasite. Deux hypothèses peuvent être avancées : ou bien une première pénétration dans une cellule crée des conditions favorables à des infestations ultérieures ; ou bien les cellules ne sont pas identiques entre elles, peut-être en raison de modifications membranaires liées aux différentes phases du cycle (Dvorak et Crane 1981, Porchet-Henneré *et al.*, 1985).

## BIBLIOGRAPHIE

- DORAN D. J., VETTERLING J. M. : Influence of storage period on excystation and development in cell culture of sporozoites of *Eimeria meleagridis* Tyzzer. *Proc. Helminth. Soc. Wash.*, 1969, 36, 33-35.
- DORAN D. J. : Increasing the yield of *Eimeria tenella* oocysts in cell culture. *J. Parasitol.*, 1971, 57, 891-900.
- DORAN D. J. : Behavior of Coccidia *in vitro*. In : the Coccidia (Peter L. Long ed.), *University Park Press*, Baltimore, 1982, 230-285.
- DVORAK J. A., CRANE M. StJ. : Vertebrate cell modulates infection by Protozoan parasites. *Science*, 1981, 214, 1034-1036.

- DVORAK J. A., HOWE C. L. : *Toxoplasma gondii* — Vertebrate cell interactions. I. The influence of Bicarbonate Ion, COA, pH and host cell culture age on the invasion of Vertebrate cells *in vitro*. *J. Protozool.*, 1979, 24, 416-419.
- FISHER R. A. : Statistical methods for research workers. *Oliver and Boyd*, London, 1954, 356.
- FRONTIER S. : Étude statistique de la dispersion du Zooplancton. *J. Exp. Mar. Biol. Écol.*, 1973, 12, 229-263.
- HOLTZ A., ALBRECHT M. : Die Zuchtung von *Toxoplasma gondii* in Zell Kulturen. *Z. Hyg. Infect.*, 1953, 136, 605-609.
- LYCKE E., LUND E. : A tissue culture method for titration of infectivity and determination of growth rate of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1964, 60, 221-233.
- NORRBY R. : Host cell penetration of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immunol.*, 1970, 3, 250-255.
- PORCHET-HENNERÉ E., COLLYN D'HOOGHE M., SADAK A., FRONTIER S. : Relations entre une Coccidie : *Besnoitia jellisoni*, et sa cellule-hôte, *in vitro*, étudiées par microcinématographie. *Protistologica*, 1985, XXI, 39-45.
- SADAK A. : Corrélations entre *Besnoitia jellisoni* (Coccidie) et sa cellule hôte *in vitro*. Thèse 3<sup>e</sup> Cycle, Université de Lille I, 1983.
- SOLURSH M., REITER R. S., AHRENS P. B., VERTEL B. : Stage and position — related changes in chondrogenic response of chick embryonic wing mesenchyme to treatment with dibutylryl cyclic AMP. *Develop. Biol.*, 1983, 83, 9-19.
-