CRYOPRÉSERVATION D'ISOLATS DE *TOXOPLASMA GONDII* EN CULTURE CELLULAIRE

COTTY F.*, DESCAMPS P.**, FERRER A.*, DUONG T.H.* & RICHARD-LENOBLE D.*

Summary: *TOXOPLASMA GONDII*: FREEZE-PRESERVATION IN CELL CULTURE

For a better preservation and identification of *Toxoplasma gondii* isolates, we propose a new method of freezing of toxoplasma grown in THP-1 cell culture. A cystogenic strain isolated from foetal blood has been grown in these cells and frozen in liquid nitrogen. After thawing, toxoplasma recover the same growth rate and morphology *in vitro* and the same capacity to form brain cysts into mice compared to the initial strains. The freezing of the cell suspension provides a simple and appropriate method for preservation of *Toxoplasma gondii* within in « bank » isolates.

KEY WORDS : *Toxoplasma gondii*, cell culture, freeze-preservation.

Résumé :

Afin de mieux conserver et répertorier les souches de *Toxoplasma gondii*, nous proposons une méthode de cryopréservation des toxoplasmes en cultures de cellules THP1. Une souche kystogène isolée de sang foetal est cultivée sur ces cellules, puis soumise à la cryopréservation en azote liquide. Après décongélation, les toxoplasmes reprennent la même cinétique de croissance et la même morphologie *in vitro*, et forment des kystes cérébraux chez la souris, comme la souche initiale. Cette cryopréservation après culture en suspension est une méthode simple et adaptée à la conservation des isolats de *Toxoplasma gondii*. Elle devrait permettre la création de « banques » de toxoplasmes, et ultérieurement, une identification plus précise des souches.

MOTS CLÉS : *Toxoplasma gondii*, cultures cellulaires, cryopréservation.

INTRODUCTION

L'isolement de *Toxoplasma gondii* par culture cellulaire est de plus en plus pratiqué aujourd'hui dans le cadre du diagnostic précoce des toxoplasmoses aiguës, survenant lors de toxoplasmose congénitale (Derouin, Thulliez, Candolfi, Daffos et Forestier, 1988) ou chez des patients immunodéprimés (Tirard, Niel, Rosenheim, Katlama, Ciceron, Ogunkolade, Danis et Gentilini, 1991). Dans les prélèvements de sang, de liquide de lavage broncho-alvéolaire, de liquide céphalo-rachidien, ou de liquide amniotique, l'isolement de *Toxoplasma gondii* sous formes trophozoïtes invasives, témoigne d'une maladie aiguë, différenciable de l'affection chronique (Hofflin et Remington, 1985). Les toxoplasmes sont de plus en plus fréquemment isolés. Les moyens actuels pour les différencier restent encore peu codifiés. Leur polymorphisme est exprimé selon des caractères de pathogénicité ou de virulence pour la souris, selon leur aptitude à former des kystes ou encore selon leur profil isoenzymatique (Rinder, Thomshke, Darde et Loscher, 1995). Tous ces paramètres sont susceptibles de varier lors de l'entretien des isolats par passages répétés sur l'animal ou par repiquages en cultures cellulaires.

* Service de Parasitologie et Médecine Tropicale, Hôpital Bretonneau, 2, Boulevard Tonnelé, 37044 Tours Cedex, France.

** Centre de Diagnostic Prénatal, Hôpital Bretonneau, Tours, France.
Correspondance : Dr. Françoise Cotty.
Tél. : (16) 47.47.59.02 – Fax : (16) 47.37.69.55.

Une caractérisation plus précise et plus systématique des isolats apparaît donc souhaitable. Afin de répertorier et de conserver un grand nombre d'isolats récemment obtenus à partir de prélèvements en évitant toute variation au cours du temps et des manipulations par rapport à l'isolat originel, notre objectif a été de mettre au point une méthode de cryopréservation des toxoplasmes kystogènes. L'aptitude de ces toxoplasmes à se multiplier dans les cellules hôtes THP1 avant et après leur congélation a été évaluée. L'intérêt d'utiliser des cellules en suspension THP1 pour cryopréserver les parasites dans leur environnement intracellulaire est discuté.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

SOURCE DE *TOXOPLASMA GONDII* ET MAINTIEN DE LA SOUCHE

L'isolat kystogène de toxoplasmes provient d'un sang foetal humain; il a été isolé sur souris au Centre Hospitalo-Universitaire de Tours (France). Six semaines après l'infestation, les souris sont sacrifiées et leur cerveau est broyé. Le broyat est observé au microscope photonique afin de rechercher des kystes toxoplasmiques. Les kystes toxoplasmiques sont dénombrés et injectés en suspension dans une solution physiologique (environ 10 kystes par souris) par voie intrapéritonéale à des souris. Cette opération peut

être reprise autant de fois que nécessaire pour maintenir l'isolat de toxoplasmes.

ENTRETIEN DES CELLULES THP1

Les cellules THP1 (Tsuchiya, Yamabe, Yamaguchi, Kobayashi, Konno et Tada, 1980), sont des cellules leucémiques myélomonocytaires d'origine humaine qui sont cultivées en suspension dans du milieu RPMI 1640 additionné de sérum de veau foetal (SVF) à 15 % dans un tube Falcon pour culture cellulaire.

Elles sont utilisées pour la culture des toxoplasmes à raison de 5×10^5 cellules dans 4 ml de milieu RPMI 1640 additionné de SVF à 2 %.

Les cultures sont incubées à 37 °C en atmosphère enrichie en CO₂ à 5 %.

OBTENTION ET MISE EN CULTURE DES BRADYZOÏTES

Les bradyzoïtes de *Toxoplasma gondii* sont obtenus après isolement des kystes toxoplasmiques d'un cerveau de souris par gradient de Percoll selon la technique décrite par Blewett, Miller et Harding (1982). Les bradyzoïtes sont libérés en traitant les kystes par un solution de trypsine à 0,25 % en solution physiologique, à 37 °C pendant 15 minutes. La suspension obtenue dépourvue de kystes et enrichie en bradyzoïtes est centrifugée pendant 10 minutes à 1 500 g à température ambiante. Les culots sont lavés 3 fois en solution physiologique et après une dernière centrifugation sont remis en suspension dans 2 ml de RPMI 1640. 200 µl de cette suspension sont inoculés à la culture de cellules THP1.

CONTRÔLE DES CULTURES

La croissance des toxoplasmes en culture de THP1 est contrôlée :

- à l'examen direct au microscope inversé,
- après coloration au May Grunwald-Giemsa du culot de centrifugation et observation au microscope photonique à transmission,
- après coloration du culot de centrifugation par immunofluorescence (sérum polyclonal anti-*Toxoplasma gondii*) et observation au microscope à fluorescence.

CRYOPRÉSERVATION DES CELLULES THP1

Congélation : La congélation des cellules s'effectue en milieu RPMI 1640 additionné de sérum de veau foetal à 15 % et de diméthylsulfoxyde à 10 %. Le processus de congélation est initié à froid dans des cryotubes (1,5 ml de suspension de cellules par tube, soit 3×10^6 cellules) dans la glace pilée. Puis les tubes sont placés dans des boîtes de polystyrène expansé et la température est progressivement amenée à -80 °C en trois heures. Les cryotubes sont ensuite immergés dans l'azote liquide.

Décongélation et reprise de la multiplication cellulaire : La décongélation est rapide. Les cryotubes sont placés dans un bain-marie à 37 °C et dès la décongélation les cellules sont dispersées par agitation manuelle dans 15 ml de milieu RPMI 1640 maintenu à 4 °C. La suspension cellulaire est centrifugée à 1 500 g, pendant 10 minutes à 4 °C. Le culot est lavé en milieu RPMI 1640 à 4 °C. La concentration cellulaire est évaluée sur cellule de Malassez et les cellules sont remises en culture (5×10^5 cellules/ml) à 37 °C dans une atmosphère enrichie en CO₂ (5 %) dans le milieu RPMI additionné de sérum de veau foetal à 15 %.

CRYOPRÉSERVATION DES TOXOPLASMES

Après obtention d'une culture *in vitro* de *Toxoplasma gondii*, un ou plusieurs repiquages sont effectués afin d'obtenir un assez grand nombre de trophozoïtes en croissance. Les trophozoïtes destinés à la congélation sont recueillis au stade de leur multiplication intracellulaire. Si les cellules THP1 restent vivantes et intactes au cours du processus de congélation-décongélation, les toxoplasmes se trouvant à l'intérieur de ces cellules devraient demeurer vivants et garder leur capacité de croissance après la décongélation. Leur cryopréservation est donc réalisée selon le principe de la cryopréservation des cellules THP1.

Après décongélation, reprise de croissance et doublement de la population de THP1, le milieu est remplacé par du RPMI 1640 additionné de sérum de veau foetal à 2 % pour favoriser la croissance des toxoplasmes (Tirard, Niel, Rosenheim, Katlama, Ciceron, Ogunkolade, Danis et Gentilini, 1991). Le développement des toxoplasmes est suivi par examen de la culture *in vitro* (voir la section contrôle des cultures). D'autre part la capacité kystogène de cette souche est contrôlée après inoculation intrapéritonéale de la culture à la souris et observation directe des kystes intracérébraux au bout de six semaines.

RÉSULTATS

MESURE DE LA CROISSANCE ET DE L'APTITUDE À FORMER DES KYSTES DE *TOXOPLASMA GONDII* EN CULTURE DE THP1

Du fait de l'extrême difficulté à observer correctement les toxoplasmes situés dans leur cellule hôte, seuls les toxoplasmes extracellulaires sont comptés et ce comptage ne peut être considéré comme acceptable qu'à partir de 10^4 toxoplasmes/ml qui correspond au seuil minimal de lisibilité sur la cellule de Malassez. Le comptage permet alors de rendre compte de la vitesse de multiplication de la souche. La figure 1 montre que cette vitesse croît

au fur et à mesure des repiquages (de 24×10^4 toxoplasmes/jour pour le 1^{er} repiquage à 88×10^4 toxoplasmes/jour pour le 4^{ème} repiquage). Cette augmentation de vitesse de multiplication pourrait être liée à une évolution du parasite passant du stade bradyzoïte au stade tachyzoïte (Soete, Fortier, Camus et Dubremetz, 1993). Toutefois ainsi que le montre la figure 2, la souche étudiée conserve un aspect caractéristique de celui des bradyzoïtes (Ferguson et Hutchison, 1987) : les parasites présentent un corps cellulaire mince et allongé et la position de leur noyau est très nettement excentrée.

Dans certaines cultures, la souche étudiée ici a tendance à former des kystes (fig. 3). Dans ce cas là, la croissance cellulaire est plus faible. On a donc selon les cultures deux comportements cellulaires différents : une culture à développement rapide et akystogène et une culture à évolution lente et kystogène.

Fig. 1. – Croissance des toxoplasmes kystogènes en cellules THP1. J₀ correspond au jour des repiquages.

Fig. 3. – Kyste de *Toxoplasma gondii* observé en culture de THP1 ($\times 1\,000$).

MESURE DE LA CROISSANCE ET DE L'APTITUDE À FORMER DES KYSTES DE *TOXOPLASMA GONDII* APRÈS CONGÉLATION

Pour la souche étudiée, après décongélation, la suspension cellulaire est remise en milieu RPMI avec du sérum de veau foetal à 15 % de façon à faciliter la reprise de croissance des cellules hôtes THP1. Puis, le passage en milieu RPMI-SVF 2 %, permettant une meilleure croissance des toxoplasmes est effectué. La morphologie et la vitesse de croissance des parasites sont comparables à celles observées sans congélation des parasites (fig. 4). Il faut noter toutefois un phénomène de latence dans le départ de la culture après décongélation puisque la multiplication cellulaire n'est mesurable qu'après 11 jours. Le démarrage de la culture des toxoplasmes non congelés est observée à partir du 9^e jour. D'autre part, l'injection de la souche décongelée par voie intrapéritonéale à la souris pro-

Fig. 2. – *Toxoplasma gondii* — Bradyzoïtes en culture de cellules THP1 ($\times 1\,000$).

Fig. 4. – Croissance des toxoplasmes en cellules THP1 après congélation-décongélation. J₀ correspond à la décongélation et à la mise en culture en milieu RPMI 1640 additionné de S.V.F. à 15 %. A J₈, après doublement des cellules THP1, le milieu est remplacé par un milieu RPMI additionné de S.V.F. à 2 %.

voque la formation de kystes cérébraux après quatre semaines, tout comme la souche non congelée.

DISCUSSION

La conservation des souches de *T. gondii*, kystogènes pour leur très grande majorité, est lourde et fastidieuse (passages répétés sur souris ou sur cultures cellulaires). De plus, au cours de ces repiquages, on peut observer une modification génétique des souches.

La cryopréservation en azote liquide permet une bonne conservation des souches kystogènes de *T. gondii* cultivées sur cellules THP1, puisque, après décongélation, celles-ci reprennent la même vitesse de croissance et la même morphologie *in vitro*, et forment des kystes cérébraux chez la souris comme la souche originelle. La cryopréservation du parasite a été rapportée par différents auteurs : s'il apparaît que la souche virulente RH à multiplication rapide résiste bien à la congélation-décongélation (Bollinger, Musallam et Stulberg, 1974; Eyles, Coleman et Cavanaugh, 1956; Mackie, 1972), il n'en est pas de même pour les souches kystogènes à développement plus lent (Hoff, Dubey, Behbehani et Frenkel, 1977; Kozojed, Jira et Valkoun, 1985).

Les kystes résistent mal aux basses températures, ils perdent rapidement leur caractère infectieux. Les bradyzoïtes des souches kystogènes sont fréquemment soumis à des altérations cellulaires au cours du processus de congélation, altérations dont les conséquences sont d'autant plus graves que le potentiel de développement des bradyzoïtes est faible (Frenkel et Dubey, 1973; Jacobs, Remington et Melton, 1960). Ainsi, la cryopréservation des souches kystogènes de *T. gondii* nécessite d'avoir des tachyzoïtes en culture cellulaire.

Une bonne cryopréservation des toxoplasmes passe par le bon choix et la bonne préparation des cellules hôtes. Lorsque les cultures font appel à des cellules adhérentes comme les cellules fibroblastiques MRC5, le traitement par la trypsine, étape indispensable préalable à la congélation, lèse des éléments cellulaires et risque d'altérer la viabilité des toxoplasmes présents sous forme tachyzoïte car ceux-ci sont — à l'opposé des bradyzoïtes — sensibles à l'action de cette enzyme (Jacobs, Remington et Melton, 1960). L'utilisation de cellules en suspension ne nécessitant pas l'action de la trypsine, minimise les dommages des cellules hôtes et des toxoplasmes. Par ailleurs les parasites doivent être congelés lorsqu'ils sont intracellulaires; cela correspond à un stade précoce de la culture. Pour toutes ces raisons, les cellules THP1 ont été retenues. Mais leur utilisation peut cependant être limitée à cause des

risques de contamination virale de cette lignée cellulaire tumorale d'origine myélomonocytaire humaine. Sous la condition de respecter un délai minimum après l'isolement des parasites, cette cryopréservation rend possible la création d'une banque de toxoplasmes. Ainsi les populations parasitaires en circulation, à l'origine de diverses pathologies ou provenant de différentes contrées, peuvent être conservées. La cryopréservation des isolats de *T. gondii* cultivés en cellules THP1 semble donc être une méthode adaptée à la conservation des isolats. Elle est réalisable dans tous les laboratoires pratiquant la culture cellulaire et disposant d'azote liquide.

RÉFÉRENCES

- BLEWETT D.A., MILLER J.K. & HARDING J. Simple technique for the direct isolation of toxoplasma tissue cysts from foetal ovine brain. *Veterinary Record*, 1982, 112, 98-100.
- BOLLINGER R.O., MUSALLAM N. & STULBERG C.S. Freeze preservation of tissue culture propagated *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*, 1974, 60, 368-369.
- DEROUIN F., THULLIEZ P., CANDOLFI E., DAFFOS F. & FORESTIER F. Early prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis using amniotic fluid samples and tissue culture. *European Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 1988, 7, 423-425.
- EYLES D.E., COLEMAN N. & CAVANAUGH D.J. Preservation of *Toxoplasma gondii* by freezing. *The Journal of Parasitology*, 1956, 42, 408-413.
- FRENKEL J.K. & DUBEY J.P. Effects of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocysts. *The Journal of Parasitology*, 1973, 59, 587-588.
- HOFF R.L., DUBEY J.P., BEHBEHANI A.M. & FRENKEL J.K. *Toxoplasma gondii* cysts in cell culture: new biologic evidence. *The Journal of Parasitology*, 1977, 63, 1121-1124.
- HOFFLIN J.M. & REMINGTON J.S. Tissue culture isolation of *Toxoplasma* from blood of a patient with AIDS. *Archives of Internal Medicine*, 1985, 145, 925-926.
- JACOBS L., REMINGTON J.S. & MELTON M.L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*, 1960, 46, 11-21.
- KOZOJED V., JIRA J. & VALKOUN A. Preservation of laboratory strains of *Toxoplasma gondii* *in vitro*. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, 1985, 29, 97-100.
- MACKIE M.J. Two years studies of the Eyles'glycerol preservation technique for *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*, 1972, 58, 846-847.
- RINDER H., THOMSCHKE A., DARDE M.L. & LOSCHER T. Specific DNA Polymorphisms discriminate between virulence and non virulence to mice in nine *Toxoplasma gondii* strains. *Molecular Biochemistry Parasitology*, 1995, 69, 123-126.
- SOETE M., FORTIER B., CAMUS D. & DUBREMETZ J.F. *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Experimental Parasitology*, 1993, 76, 259-264.

- TIRARD V., NIEL G., ROSENHEIM M., KATLAMA C., CICERON L., OGUNKOLADE W., DANIS M. & GENTILINI M. Diagnosis of *Toxoplasmosis* in patients with AIDS by isolation of the parasite from the blood. *The New England Journal of Medicine*, 1991, 324, 634.
- TSUCHIYA S., YAMABE M., YAMAGUCHI Y., KOBAYASHI Y., KONNO T. & TADA K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP1). *International Journal of Cancerology*, 1980, 26, 171-176.

Reçu le 22 juillet 1995

Accepté le 16 janvier 1996