50376
1974
N° 495
178

50376
1974
178

THÈSE

PRÉSENTÉE A L'UNIVERSITÉ
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir
le

TITRE DE DOCTEUR 3e CYCLE
Discipline : Biologie Cellulaire

par

François EB
Assistant a l'UER de Médecine de l'Université de Picardie

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES RICKETTSIALES PATHOGÈNES DE VERTÉBRÉS

(CRITÈRES DE CLASSIFICATION)

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section SCIENCES
LILLE

Soutenue le 7 Décembre 1974 devant la Commission d'Examen :

M. le Professeur E. VIVIER :	Président
M. le Professeur J. GUILLAUME :	Examinateur
Melle le Professeur J. ORFILA :	Rapporteur
M. G. DEVAUCHELLE, Maitre de Conférences :	Invité

A ma Femme

A mes Parents

A ma Famille

A mes Amis

Qu'ils trouvent ici l'humble témoignage
de ma reconnaissance et de mon profond attachement.

A la mémoire du Docteur Anita CALAIS.

AVANT-PROPOS

Il nous est agréable de vous remercier, Monsieur le Professeur E. VIVIER, pour la confiance que vous nous avez toujours témoignée. Nous tenons à vous exprimer ici notre profond respect.

Nous vous devons beaucoup, Mademoiselle le Professeur J. ORFILA, de nous avoir accepté dans votre laboratoire et initié à la recherche. Vous avez su nous faire partager votre enthousiasme dans le domaine qui vous est cher. Que ce travail soit pour vous le témoignage de notre profonde gratitude.

Que Monsieur le Professeur J. GUILLAUME qui a bien voulu accepter de juger ce travail, trouve ici l'expression de notre profond respect.

Nous sommes reconnaissant à Monsieur G. DEVAUCHELLE de nous avoir toujours si amicalement prodigué ses conseils, notamment en microscopie électronique, et de nous avoir constamment encouragé. Nous lui exprimons toute notre profonde gratitude.

Nous tenons à remercier Monsieur le Docteur M. CAPPONI de l'Institut Pasteur de PARIS, Monsieur le Professeur L.H. COLLIER du Lister Institute de LONDRES et Monsieur le Professeur F. DEKKING de l'Institut d'Hygiène d'AMSTERDAM pour les souches qu'ils ont eu l'obligeance de nous envoyer. Nous remercions également Monsieur le Professeur S.P. WANG de SEATTLE pour les cellules HeLa 229, Monsieur le Professeur J. SCHACHTER du Centre OMS de SAN FRANCISCO, l'Institut de Virologie SASC de BRATISLAVA et le laboratoire OMS de COPENHAGUE pour les antigènes et les sérums de référence, Monsieur le Professeur B. JONES et Monsieur le Docteur J. TREHARNE de l'Institut d'Ophtalmologie de l'Université de LONDRES pour les typages en immunofluorescence de la souche de conjonctivite à inclusions.

Nous avons une pensée particulière pour notre ami le Docteur G. SORODOC de l'Institut S. Nicolaii de BUCAREST avec qui nous avons travaillé durant six mois.

Que tous nos collègues, Assistants et Techniciens du laboratoire de Microbiologie de l'U.E.R. de Médecine d'AMIENS, en particulier Mademoiselle F. HAIDER et Monsieur J.F. LEFEBVRE, trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude.

Nous sommes enfin très redevable à Madame H. LECLERCQ et à Monsieur G. CALAIS pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée durant l'élaboration de ce travail.

I N T R O D U C T I O N 1

CHAPITRE I. GENERALITES SUR L'ORDRE DES RICKETTSIALES.

I.1. LA FAMILLE DES RICKETTSIACEAE 3

I.2. LA FAMILLE DES CHLAMYDIACEAE 5

I.3. LA FAMILLE DES BARTONELLACEAE 8

I.4. LA FAMILLE DES ANAPLASMATACEAE 8

CHAPITRE II. ETUDE MORPHOLOGIQUE ET ULTRASTRUCTURALE.

II.1. MATERIEL ET METHODES 9

II.1.1. SOUCHES ETUDIEES 9

II.1.1.1. SOUCHE D'ORIGINE HUMAINE 9

II.1.1.2. SOUCHES D'ORIGINE MAMMALIENNE 10

II.1.1.3. SOUCHES D'ORIGINE AVIAIRE 10

II.1.2. CULTURES CELLULAIRES 11

II.1.3. PREPARATION DE LA SUSPENSION INFECTIEUSE 12

II.1.4. DEROULEMENT D'UNE EXPERIENCE 12

II.1.5. TECHNIQUES DE MICROSCOPIE PHOTONIQUE 13

II.1.6. TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 14

II.2. ETUDE IN OVO 15

II.3. ETUDE MORPHOLOGIQUE IN VITRO 15

II.3.1. ETUDE DE LA SOUCHE ROUMAINE ET DE LA SOUCHE RICHARD 15

II.3.2. ETUDE DES SOUCHES LOTH ET T 13 17

II.3.3. ETUDE DES SOUCHES Q 18 ET D 41 19

II.3.4. ETUDE DE LA SOUCHE MRC 4 DE CONJONCTIVITE A INCLUSIONS 20

II.3.5. CONCLUSION 21

II.3.6. CAS PARTICULIER DE LA SOUCHE D'AVORTEMENT DE LA VACHE 23

II.4. ETUDE ULTRASTRUCTURALE 24

II.4.1. ETUDE DE LA SOUCHE ROUMAINE ET DE LA SOUCHE RICHARD 24

II.4.1.1. SOUCHE ROUMAINE 24

II.4.1.2. SOUCHE RICHARD 26

II.4.2. ETUDE DES SOUCHES LOTH ET T 13 26

II.4.2.1. SOUCHE LOTH D'ORNITHOSE 26

a- Les corps initiaux 27

b- Les corps élémentaires 27

c- Les corps intermédiaires 27

d- Les corps géants 28

e- Les formations vésiculaires 28

f- Le cycle de développement intracellulaire 28

II.4.2.2. SOUCHE T 13 DE PSITTACOSE 29

II.4.3. SOUCHE Q 18 ET SOUCHE D 41 30
II.4.4. SOUCHE MRC 4 DE CONJONCTIVITE A INCLUSIONS 31
II.4.5. SOUCHE D'AVORTEMENT DE VACHE 33
II.4.6. CONCLUSION 33

CHAPITRE III. ETUDE IMMUNOLOGIQUE.
III.1. RESULTATS OBTENUS AVEC LA REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT 35
III.2. RESULTATS OBTENUS AVEC LA TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE 37
III.2.1. ADAPTATION EXPERIMENTALE DE LA MICROMETHODE EN IMMUNOFLUORESCENCE 37
III.2.1.1. PREPARATION ET CHOIX DES ANTIGENES 37
a- A partir de sacs vitellins 37
b- A partir de sacs vitellins purifiés par une extraction à l'alcool-éther 38
c- A partir de cultures cellulaires 38
d- Comparaison des méthodes de préparation 39
e- Choix des antigènes 39
III.2.1.2. PREPARATION DE LA LAME 40
III.2.1.3. TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE 41
III.2.1.4. AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE LA METHODE 42
III.2.2. IDENTIFICATION DES GERMES 43
III.2.3. TENTATIVE DE TYPAGE DES SOUCHES DE CHLAMYDIA PSITTACI 44
III.2.3.1. PREPARATION DES ANTIGENES POUR L'IMMUNISATION DES ANIMAUX 44
III.2.3.2. ESSAIS D'OBTENTION DE SERUMS IMMUNS MONO-SPECIFIQUES UTILISABLES POUR LE TYPAGE DES SOUCHES 45
a- Résultats obtenus chez la souris 45
b- Résultats obtenus chez le lapin 46
c- Résultats obtenus chez le rat blanc 47
III.2.3.3. CONCLUSION 53

CHAPITRE IV. DISCUSSION.
IV.1. DIFFERENCIATION DES RICKETTSIES ET DES CHLAMYDIAE 55
IV.2. GENRE COXIELLA 62
IV.2.1. CARACTERES DISTINCTIFS DES GENRES RICKETTSIA ET COXIELLA 62
IV.2.2. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DE COXIELLA BURNETI 64
IV.2.3. LA VACUOLE CHEZ LES RICKETTSIACEAE 67

IV.3. GENRE CHLAMYDIA 69

IV.3.1. RECONNAISSANCE D'UN GENRE UNIQUE DANS LA FAMILLE DES CHLAMYDIACEAE 69

IV.3.2. LIMITES DU GENRE CHLAMYDIA 72

a- Morphologie, structure et mode de reproduction 72

b- Composition chimique et métabolisme 74

c- Structure antigénique 75

d- Place et avenir des "Néorickettsies" 76

IV.3.3. RECONNAISSANCE DE DEUX ESPECES CHLAMYDIA TRACHOMATIS ET CHLAMYDIA PSITTACI DANS LE GENRE CHLAMYDIA 76

a- Chlamydia trachomatis 77

b- Chlamydia psittaci 80

c- Clé de détermination des espèces du genre Chlamydia 82

d- Discussion des critères adoptés 82

IV.4. LA NOTION D'ESPECE EN BACTERIOLOGIE 87

IV.4.1. DEFINITION DE L'ESPECE BACTERIENNE 87

IV.4.2. CRITERES A CONSIDERER POUR DEFINIR L'ESPECE BACTERIENNE 89

IV.4.3. LA NOTION D'ESPECE DANS LA FAMILLE DES CHLAMYDIACEAE 90

IV.5. NOTION ACTUELLE SUR LES RICKETTSIALES 95

C O N C L U S I O N S G E N E R A L E S 97

B I B L I O G R A P H I E

P L A N C H E S

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DES RICKETTSIALES PATHOGENES DE VERTEBRES
(critères de classification)

L'ordre des *Rickettsiales* regroupe des microorganismes assez différents les uns des autres, mais possédant les caractères d'être très petits et très exigeants pour leur culture. La plupart d'entre eux ne peuvent se multiplier en dehors d'une cellule vivante ce qui implique l'utilisation des techniques virologiques de culture.

Ces microorganismes vivent en symbiose, en commensalisme ou sont pathogènes. On les rencontre chez des hôtes extrêmement variés : mammifères y compris l'homme, oiseaux, acariens et insectes, voire même des Protozoaires et un Myxomycète (*in 28*).

Le but de notre travail est d'étudier différents agents pathogènes de l'homme, du bétail et des oiseaux appartenant à l'ordre des *Rickettsiales* afin de clarifier certains points de la classification.

Des généralités sur l'ordre des *Rickettsiales* constitueront le *premier chapitre* de ce mémoire.

Dans le *second chapitre*, nous regrouperons les méthodes et les résultats concernant l'étude morphologiques et ultrastructurale des divers agents que nous nous proposons d'étudier.

Le *troisième chapitre* sera consacré à l'étude immunologique de ces agents. Les techniques sérologiques et les schémas d'immunisation seront décrits, les premiers résultats exposés sous forme de tableaux.

Nous avons ainsi été amené dans un *quatrième chapitre* :

- à différencier la notion d'identification et celle de classification ;

- à discuter la valeur de certains caractères retenus comme critères de classification ;

- à définir la notion d'espèce en bactériologie, notamment en ce qui concerne le genre *Chlamydia* et à discuter la valeur du terme "*Néorickettsie*" que beaucoup d'auteurs français emploient encore à tort nous semble-t-il.

Certains résultats ont déjà fait l'objet de publications. Ce sont :

- *ETUDE DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS - POLYMORPHISME DE L'AGENT DU TRACHOME EN CULTURES CELLULAIRES.*
  Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 1973, 124 B, 41-71.
  En collaboration avec J. ORFILA et G. DEVAUCHELLE

- *ETUDE DU DEVELOPPEMENT EN CULTURE CELLULAIRE D'UNE RICKETTSIALE ISOLEE A PARTIR D'UN PERROQUET.*
  Rev. Roum. Virol. 1973, 10, 3, 199-208.
  En collaboration avec J. ORFILA et G. SORODOC

- *RICKETTSIALE ISOLEE CHEZ UN PERROQUET : MORPHOLOGIE - ULTRASTRUCTURE - IMMUNOLOGIE.*
  A paraître
  En collaboration avec J. ORFILA et J-F. LEFEBVRE

CHAPITRE I

GENERALITES SUR L'ORDRE DES RICKETTSIALES

°°
°

L'ordre des *Rickettsiales* établi initialement par *BUCHANAN* et *BUCHANAN (1938)* repose essentiellement sur la notion de parasitisme intracellulaire obligatoire. Dans la 7ème édition du Bergey's Manual *(1957) PHILIP* rangeait l'ordre des *Rickettsiales* avec celui des *Virales* dans la classe des *Microtatobiotes (95)*.Actuellement cette réunion des *rickettsies* et des *virus* dans une même classe ne peut plus être admise. Les *Virus* appartiennent à l'embranchement spécial des *VIRA* et les *Rickettsiales*, malgré leur physiologie particulière, sont rattachées à la classe des *SCHIZOMYCETES* dont elles forment le onzième ordre (*in 40*).

L'ordre des *Rickettsiales* est divisé en 4 familles subdivisées elles-mêmes en nombreuses tribus et genres (*95*).

I.1. LA FAMILLE DES RICKETTSIACEAE.

Elle regroupe des parasites tissulaires ou intracellulaires, mais non érythrocytaires, transmis par des arthropodes ou inféodés aux arthropodes. Leur pouvoir pathogène permet de distinguer 3 tribus (*63*): les *Rickettsiae*, les *Ehrlichiae* et les *Wolbachiae*.

Les données les plus importantes dont nous disposons actuellement concernent la tribu des *RICKETTSIAE* qui comprend deux genres principaux : *Rickettsia* et *Coxiella*. Les membres de cette tribu sont tous des parasites de vertébrés, mammifères et oiseaux, transmis par des tiques ou des insectes. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires à l'exception de *Rickettsia quintana* qui est extracellulaire chez son hôte vecteur naturel et probablement chez l'homme et qui peut cultiver sur gélose au sang. Dans la 8ème édition du Bergey's Manual, elle est séparée du genre *Rickettsia* et constitue l'espèce type du genre *Rochalimaea (in 124)*.

Tous ces agents d'allure bactérienne ont une structure et une composition chimique similaires à celles des bactéries à Gram négatif. La cellule rickettsienne typique est un bâtonnet de *0,3 à 0,5 µm* de large sur *1,5 à 2 µm* de long, douée d'un grand polymorphisme, entourée d'une paroi et d'une membrane plasmique sous jacente. *Coxiella burneti* est plus petite (*0,2 à 0,4 µm* de large et *1 µm* de long) et la seule rickettsie qui présente une variation de phase antigénique *(41)*.

Elles diffèrent profondément des virus parce qu'elles possèdent les 2 acides nucléiques et des parois complexes, produisent des liaisons phosphate avec l'énergie dérivée de l'oxydation des acides aminés et des hydrates de carbone et se multiplient de façon caractéristique par division binaire *(in 91)*.

Elles sont distinctes des *Chlamydiaceae* par leur mode de reproduction et par des différences métaboliques fondamentales *(in 124)*.

Les germes du genre *Rickettsia* sont responsables d'affections très diverses dont les unes sont en principe propres à l'homme (typhus épidémique ou rickettsiose à pou dû à *Rickettsia prowazecki*); les autres sont des affections plûtot animales pouvant accidentellement infecter l'homme (typhus murin ou typhus à puce dû à *Rickettsia mooseri*, fièvre boutonneuse ou fièvre à tique due à *Rickettsia conori*, fièvre d'Extrême Orient due à *Rickettsia tsutsugamushi*). *Coxiella burneti* est également un agent de zoonose responsable chez l'homme de la fièvre Q.

Quant aux données concernant les autres genres de *Rickettsiaceae*, elles sont peu nombreuses et il est parfois difficile de caractériser ces agents.

Les *EHRLICHIAE* pathogènes de certains vertébrés, mais non de l'homme sont transmis par des arthropodes. On connaît actuellement 3 genres : *Ehrlichia, Cowdria et Néorickettsia (95).*

La tribu des *WOLBACHIAE* regroupe un grand nombre d'agents parasites d'arthropodes et expérimentalement de certains vertébrés. Elle comprend 4 genres principaux : *Rickettsoides, Enterella, Rickettsiella et Wolbachia.* Elle ne retiendra pas notre attention dans ce mémoire.

I.2. LA FAMILLE DES CHLAMYDIACEAE.

Longtemps considérés comme des virus (virus basophiles de *VAN ROYEN*) ces microorganismes n'en sont pas du fait de la présence simultanée des 2 acides nucléiques, de leur division par fission binaire, de leur morphologie avec une membrane rigide, de leur structure chimique avec présence d'acide muramique, de leur équipement enzymatique et de leur sensibilité aux antibiotiques. La place de cette famille à côté de la précédente a été déterminée pour la première fois par *BREED, MURRAY et HITCHENS* lors de la 6ème édition du Bergey's Manual (*1948*).

Le groupe ne renferme dans l'état actuel de nos connaissances que des parasites intracellulaires de vertébrés dont on ne connaît pas d'arthropodes vecteurs.

Ce sont des microorganismes immobiles, basophiles, de forme sphérique variant de *0,3 à 1 µm* de diamètre. Ils sont caractérisés par un cycle de développement intracytoplasmique où alternent les corps infectieux de *0,3 µm* de diamètre avec un nucléoïde dense aux électrons et les corps initiaux de *1 µm* de diamètre qui se multiplient activement pour redonner des corps élémentaires en passant par un stade intermédiaire.

Ce groupe de microorganismes couramment désigné *PLT* (Psittacose-Lymphogranulomatose vénérienne - Trachome) a reçu des appellations diverses. Le terme de "*Bedsoniae*" leur a été attribué en souvenir de *BEDSON* qui a étudié la psittacose, mais on trouve également les dénomminations de "*Chlamydozoaceae*", de "*Chlamydiaceae*" et de "*Miyagawanellae*".

La famille des *Chlamydiaceae* comprend non seulement les agents d'origine humaine et aviaire qui lui donnent son nom, mais également des agents responsables chez les mammifères et les marsupiaux de syndromes souvent mal définis à manifestations respiratoires, nerveuses, génitales et intestinales. Leur identité presque totale, au laboratoire du moins, avec les agents d'origine humaine et aviaire pose le problème de leurs rapports avec les autres membres du groupe.

L'origine mammalienne de certains de ces agents isolés notamment chez les bovins et les ovins (*52*) et "*situés à la limite inférieure des rickettsies, à côté du groupe de la psittacose*" a conduit *GIROUD* à suggérer, en *1955* à VERONE au cours des Journées médicales internationales, le nom de *Néorickettsia mundi* pour ce type d'agents et à parler de "*Néorickettsiose*", car il lui semblait difficile de parler d'ornithose et de psittacose. Le terme de "*Néorickettsiose*" a d'abord été utilisé dans un sens restrictif et pour ne pas prendre le terme de "*Pararickettsiose*" déjà employé par *LEVADITI* pour le groupe complet Psittacose-Lymphogranulomatose vénérienne-Trachome (*49*).

En *1961*, *GORET* alla jusqu'à étendre le terme de "*Néorickettsiose*" à toutes les maladies non virales à la limite inférieure des rickettsioses et il intitulait sa publication : "L'ORNITHOSE, ZOONOSE NEORICKETTSIENNE", maladie qu'il considérait comme chef de file des néorickettsioses, due à *Néorickettsia ornithosis (in 109)*.

LEVADITI (67) a donné, en *1964*, une nouvelle classification des *Rickettsiales* et principalement des *Chlamydiaceae* basée d'abord sur un critère biologique pour la description des familles et des sous familles, épidémiologique ensuite pour la séparation de quelques genres (*TABLEAU 1*). On y retrouve le souci d'individualiser des genres "*en raison de la séparation nette entre les microorganismes des oiseaux et ceux des mammifères*". Ainsi, à côté des genres *Chlamydia* et *Miyagawanella*, "les genres nouveaux *Rakeia* et *Bedsonia* ont été créés afin de rendre compte de la dualité épidémiologique essentielle des *Bedsoniae*". Le genre *Rakeia* comprend des espèces nombreuses, saprophytes ou pathogènes, épidémiologiquement spécialisées, essentiellement parasites de mammifères. Quant au genre *Bedsonia* il est beaucoup plus ubiquitaire, capable notamment de contaminer l'homme et dont les oiseaux constituent le réservoir, tel qu'il a été défini sous le concept d'ornithose à la suite des travaux de *MEYER* et *EDDIE (74)*.

En *1966*, *TARIZZO* et *NABLI* émettaient le voeu que "ces *virus* — suivant une terminologie qui n'est pas tout à fait satisfaisante, et en attendant qu'une opinion qualifiée soit émise par les instances internationales compétentes en matière de systématique — soient considérés dans leur ensemble et non exclusivement du point de vue des maladies dont ils sont responsables, ou des espèces qu'ils peuvent normalement infecter" (*115*).

La même année, *PAGE* ne proposait aucune appellation nouvelle, mais simplifiait et stabilisait la nomenclature proposée précédemment. Selon les règles du Code Internationale de Nomenclature des Bactéries, le premier nom valablement publié, légitime et correct pour ce genre était *CHLAMYDIA (JONES, RAKE et STEARNS - 1945)*. Ces auteurs étaient aussi les premiers à énoncer le concept que tous les agents causant soit le trachome, soit la psittacose ou des maladies apparentées étaient membre d'un seul genre (*93*).

TABLEAU 1

- TENTATIVE DE CLASSIFICATION DES CHLAMYDIACEAE (RAKE 1955) ORDRE DES RICKETTSIALES -

(d'après Cornélius Philip BERGEY 1957 mais modifié)

SUPER-FAMILLE	FAMILLE	SOUS-FAMILLE	GENRE	ESPECE
I. *RICKETTSIACEAE*	*COLESIDAE* Epi ou intracellulaires. Epithélium des muqueuses. Mammifère. Pas de diffusion dans l'organisme. Non cultivables.	*Colesinae* Pathogènes *Colettsinae* Saprophytes	*COLESIOTA* *RICOLESIA* *COLETTSIA*	*Conjonctivae* *Conjonctivae* *Pecoris*
II. *CHLAMYDIACEAE* Visibles 450 ± 100 mμ. ARN + ADN + Glucides, Lipides, Protides. Système enzymatique. Antigène thermostable commun. Images de division. Non connus comme étant transmis par des arthropodes.	*CHLAMYDIDAE* Endocellulaires. Epithélium des muqueuses conjonctivales ou génitales. Homme. Pas de diffusion dans l'organisme. Cultivable en sac vitellin. Pathogènes.		*CHLAMYDIA*	*Trachomatis* *Oculogenitalis*
	MYAGAWELLIDAE Endocellulaires. Mésenchyme Homme. Oiseaux, Mammifères. Dissémination. Cultivables. Pathogènes	*Myagawellinae* Homme. Diffusion par voie lymphatique.	*MYAGAWELLA*	*Lymphogranulomatose* *et* *Lymphoréticulose bénigne*
		Bedsoninae Mammifères, Oiseaux et Homme accidentellement. Diffusion par voie sanguine	*RAKETA* Mammifères *BEDSONIA* Oiseaux	*Pecoris, Felis Pneumonia, Ovis* *Psittaci* *Ornithosis*
III. *BARTONELLACEAE*				

BUS LILLE

Enfin, en *1968*, *PAGE* a proposé la reconnaissance de deux espèces : *Chlamydia trachomatis* et *Chlamydia psittaci* dans l'unique genre *Chlamydia* *(94)*. Cette proposition est basée sur les résultats de *GORDON* et *QUAN (53)* et de *LIN* et *MOULDER (69)* qui ont utilisé des critères morphologiques et chimiques. Le tableau 2 que l'on peut comparer au précédent, montre l'évolution de la classification des *Chlamydiaceae (in 27)*.

I.3. LA FAMILLE DES BARTONELLACEAE.

Elle groupe des parasites des érythrocytes de vertébrés. Elle comprend 4 genres très différents : *Bartonella*, *Haemobartonella*, *Eperythrozoon* et *Grahamella*. Tous sont transmis par des insectes et sont extracellulaires, fixés contre la membrane des cellules sanguines (*123*).

I.4. LA FAMILLE DES ANAPLASMATACEAE.

Elle est constituée du seul genre *Anaplasma*, parasite intra érythrocytaire (*101*).

Les deux dernières familles dont l'étude détaillée permet de penser que leurs représentants n'ont que peu de rapports avec les autres familles de *Rickettsiales (in 28)* ne feront l'objet d'aucune étude dans ce mémoire.

TABLEAU 2

- TENTATIVE DE CLASSIFICATION DES CHLAMYDIACEAE (RAKE, 1955) ORDRE DES RICKETTSIALES -

(d'après Cornélius Philip BERGEY, (1957), modifiée selon L.A. PAGE, 1966)

FAMILLE	GENRE	ESPECE	Dénomination des espèces dans l'ancienne classification du Bergey's Manual
RICKETTSIACEAE			
CHLAMYDIACEAE Visibles : 450 ± 100 mμm ARN + ADN + Glucides, Lipides, Protides. Système enzymatique Antigène thermostable commun Images de division Sensibilité aux antibactériens Non connus comme étant transmis par des arthropodes.	*Colesiota* *Ricolesia* *Colettsia* . Epi ou endo-cellulaire . Non cultivés . Trop peu connus pour être classés . Seuls les 2 premiers sont pathogènes *Chlamydia (1)* . Endocellulaires . Cultivables en sac vitellin . Pathogènes	*Conjonctivae* *Conjonctivae* *Pecoris* *Trachomatis* . Inclusions rigides . Présence de glycogène . Sensibilité à la sulfadiazine *Psittaci* . Inclusions diffuses . Absence de glycogène . Résistance à la sulfadiazine	*C. trachomatis* *C. oculogenitale* *M. lymphogranulomatosis (2)* *M. bronchopneumoniae* *M. psittaci* *M. ornithosis* *M. felis* *M. louisianae* *M. illinii* *M. opossumi* *M. ovis* *M. bovis* *M. pecoris*
BARTONELLACEAE, etc...			

(1) Abréviation usuelle PLT (Psittacose, Lymphogranulomatose vénérienne, Trachome)
(2) Avant que l'agent du trachome ne soit cultivé, les espèces précédées de M étaient réunies dans le genre Miyagawanella. Elles sont parfois dénommées à tort : Bedsonia, genre non reconnu par le Comité International de Nomenclature.

BUS LILLE

CHAPITRE II

ETUDE MORPHOLOGIQUE ET ULTRASTRUCTURALE

°°
°

II.1. MATERIEL ET METHODES.

Seules seront développées dans ce chapitre :

- les techniques n'ayant pas été utilisées dans le travail réalisé pour l'obtention du DEA : "*CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'AGENT DE LA LYMPHOGRANULOMATOSE VENERIENNE*" (*33*).

- les modifications apportées à certaines techniques déjà citées.

II.1.1. SOUCHES ETUDIEES.

Toutes les souches énumérées ci-après sont entretenues au laboratoire par passages successifs sur oeufs de poule embryonnés âgés de 6 jours. La richesse des membranes vitellines, prélevées stérilement, en corps infectieux est contrôlée par coloration de Castanéda. Des ensemencements sur gélose au sang permettent de contrôler l'absence de contamination bactérienne. Notre étude ne concerne que des souches pathogènes de vertébrés.

II.1.1.1. SOUCHE D'ORIGINE HUMAINE.

Souche de conjonctivite à inclusions LB 4 "*fast*" fournie par le Pr. COLLIER du Lister Institute de LONDRES. Selon la nouvelle nomenclature internationale adoptée pour les agents TRIC, cette souche est appelée *TRIC/GB/ /MRC 4 - ON "fast"*. Elle a été typée à plusieurs reprises, à notre demande, en immunofluorescence, par la microméthode de *WANG* et *GRAYSTON (121)* par le Professeur B.R. JONES et le Docteur J. TREHARNE de l'Institut d'Ophtalmologie de l'Université de LONDRES.

II.1.1.2. SOUCHES D'ORIGINE MAMMALIENNE.

a- Souche Q 18

Cette souche a été isolée à partir de l'estomac d'un avorton de brebis. Elle nous a été fournie par Mr le Docteur CAPPONI de l'Institut Pasteur de PARIS.

b- Souche D 41

Souche bulgare d'avortement de brebis fournie également par l'Institut Pasteur de PARIS.

c- Souche d'avortement de vache

Souche isolée en Roumanie et apportée au laboratoire par le Docteur G. SORODOC de l'Institut de Virologie Stefan Nicolau de BUCAREST.

II.1.1.3. SOUCHES D'ORIGINE AVIAIRE.

a- Souche Loth

Elle nous a été fournie par le Professeur DEKKING de l'Institut d'hygiène d'AMSTERDAM. Cette souche a été isolée à partir d'un pigeon atteint d'ornithose.

b- Souche T 13

Elle a été isolée à partir d'un perroquet du Brésil atteint de psittacose. Elle provient de l'Institut Pasteur de PARIS.

c- Souche Roumaine

Il s'agit d'une souche isolée en 1971 en Roumanie à partir des organes (poumons, rate) d'un perroquet mort. Le produit lyophilisé ouvert à AMIENS représentait le 7ème passage sur oeufs. Elle nous a été donnée par le Docteur G. SORODOC.

d- Souche Richard

Nous avons nous même réalisé l'isolement de cette souche sur oeufs embryonnés de poulet à partir d'un prélèvement pharyngé effectué chez une petite poule. L'oiseau appartenait à une personne hospitalisée pour pneumopathie atypique et qui présentait un taux d'anticorps de 32 vis-à-vis de l'antigène de l'ornithose (Institut Pasteur de PARIS) par réaction de fixation du complément.

II.1.2. CULTURES CELLULAIRES.

Hormis la souche MRC 4 et la souche Roumaine cultivées, la première sur cellules HeLa et KB, la deuxième sur cellules KB et L et dont les études ont déjà fait l'objet de publications (*35, 36*), nous avons utilisé, pour toutes les autres souches, un type cellulaire unique : la cellule HeLa 229, afin de pouvoir comparer nos résultats, tout en sachant que "de grandes précautions doivent être prises pour faire une étude de l'ultrastructure comparée quand ces organismes sont placés dans les mêmes conditions ou quand ils sont placés dans des conditions différentes" (*3*).

Des cellules HeLa 229, dépourvues de contamination par les Mycoplasmes, nous ont été envoyées par le Professeur WANG de SEATTLE ; elles sont entretenues en milieu de Earle additionné d'acides aminés, de vitamines, de glutamine, de sérum de veau à 10 % et de streptomycine à 100 γ/ml. Les cultures sont effectuées en flacons de 250 ml et en tubes de Leighton.

II.1.3. PREPARATION DE LA SUSPENSION INFECTIEUSE.

Un sac vitellin riche en agents pathogènes est broyé dans du liquide de Hanks contenant 50 γ de streptomycine par ml de façon à réaliser une suspension infectieuse au 1/10ème. Une centrifugation modérée à 1000 tours/mn pendant 5 minutes détermine la superposition de 3 couches dont l'intermédiaire constitue le premier inoculum.

La suspension infectieuse est mise en contact d'une culture cellulaire pendant 1 heure à 37° C. L'inoculum est alors rejeté et remplacé par du milieu de Eagle additionné de glucose (0,02 µg/ml) de sérum de veau à 7 % et de streptomycine (50 à 100 γ/ml). Le taux d'infectiosité donné par le pourcentage de cellules infectées varie de 5 à 20 % à la 96ème heure. Après 2 ou 3 trypsinations à 72 ou 96 heures d'intervalle suivant les souches la culture cellulaire est généralement infectée à 90 - 100 %. Les cellules sont grattées et broyées avec des billes de verre. Une centrifugation légère permet d'éliminer les débris cellulaires ; le surnageant constitue l'inoculum définitif utilisé pour les études dynamiques en cultures cellulaires et l'immunisation des animaux.

L'action de la trypsine est encore mal connue, mais il semble qu'elle agisse sur la division cellulaire permettant ainsi d'obtenir une augmentation importante et rapide du nombre des cellules parasitées.

II.1.4. DEROULEMENT D'UNE EXPERIENCE.

Les expériences s'étant déroulées sur une période de 4 ans, des améliorations ont progressivement été apportées et expliquent la non uniformité des schémas expérimentaux.

Ainsi, l'étude de la souche MRC 4 sur cellules HeLa et KB a été effectuée (comme l'étude de la souche de lymphogranulomatose vénérienne pour le DEA) par inoculation à chaque tube de culture de 1 ml d'une suspension de sac vitellin au 1/10ème.

Puis nous avons utilisé un inoculum préparé sur cellules après trypsinations répétées : c'est le cas de la souche Roumaine sur cellules L.

Enfin, l'intérêt du DEAE Dextran dans l'augmentation de la pénétration intracellulaire des agents TRIC ayant été démontré (*64, 105*), nous avons traité les cellules HeLa 229 par ce polymère du D-glycopyranose à raison de 1 ml par tube, à la concentration de 30 µg/ml pendant 30 minutes, à la température du laboratoire. Les cellules sont ensuite lavées avec du liquide de Hanks, puis recouvertes avec 1 ml de l'inoculum définitif préparé sur cellules.

L'incubation est dans tous les cas de 1 h à 37° C puis l'inoculum est rejeté et remplacé par du milieu de Eagle contenant glucose, sérum de veau et streptomycine.

A des temps variables après l'inoculation : 1, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 et 168 heures, les lamelles sont retirées du liquide nutritif, lavées dans du PBS et fixées.

II.1.5. TECHNIQUES DE MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

Pour l'étude cytologique classique, les cellules sont fixées à l'alcool méthylique durant 10 minutes puis colorées au May-Grünwald-Giemsa pendant 20 minutes.

Pour la réaction à l'iode, après lavage au PBS, la lamelle est recouverte pendant 10 minutes d'une solution d'iode à 5 % dans une solution d'iodure de potassium à 10 %. La lamelle est montée dans l'iode et observée immédiatement.

Les examens sont effectués au microscope Leitz avec un équipement automatique de microphotographie Orthomat.

II.1.6. TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Les différentes étapes de préparation sont effectuées directement sur lamelles à l'exception de la souche MRC 4 pour laquelle nous avons travaillé sur des culots cellulaires inclus dans l'Epon seul.

- double fixation par la glutaraldéhyde à 1,8 % et par le tétroxyde d'osmium à 1 % dans le tampon cacodylate à pH = 7,2.
- déshydratation dans un gradient d'acétone
- inclusion des morceaux de lamelle dans le mélange comprenant 20 % d'Araldite, 25 % d'Epikote 812, 60 % de DDSA et 2 % de DMP 30.

Les capsules sont laissées 48 h à 60° C puis les blocs sont trempés dans l'azote liquide pour décoller les morceaux de lamelle.

Les coupes sont réalisées à l'aide de l'ultramicrotone LKB III et recueillies sur grilles carbonées ou recouvertes d'un film de Parlodion. Elles sont contrastées à l'acétate d'uranyle à 2 % dans l'alcool absolu et au citrate de Plomb.

Pour la recherche des polysaccharides, nous avons employé la méthode de *SELIGMAN* modifiée par *THIERY (118)*.

Les examens sont effectués avec un microscope électronique RCA - EMU 3 D sous une tension d'accélération de 100 kV et avec un microscope Siemens Elmiskop 1 A sous une tension de 80 kV pour la souche MRC 4.

II.2. ETUDE IN OVO.

Les frottis exécutés à partir de membranes vitellines infectées, prélevées stérilement après la mort de l'embryon, se font de préférence sur une partie vascularisée de la membrane. Le fragment de membrane doit être écrasé sur du buvard stérile pour obtenir un frottis mince qui sera coloré par le Castaneda. Après coloration, les *Chlamydiaceae* sont colorées en bleu sur un fond rose. Elles apparaissent sous forme de microcci soit isolés, disséminés dans toute la membrane et dont la reconnaissance parmi d'autres organites de même taille pose des problèmes redoutables, soit sous forme de groupements typiques que sont les "inclusions".

Nous n'avons trouvé aucune différence marquée à la lecture des frottis réalisés à l'occasion de la culture des divers agents. Toutefois, avec un certain recul et une meilleure connaissance des souches Roumaine et Richard, un examen très approfondi des frottis montre une tendance au polymorphisme et à une morphologie bacilliforme de certains corps.

II.3. ETUDE MORPHOLOGIQUE IN VITRO.

II.3.1. ETUDE DE LA SOUCHE ROUMAINE ET DE LA SOUCHE RICHARD. (Planche I - Fig. 1 à 8)

Ces deux souches sont caractérisées par leur développement intracytoplasmique à l'intérieur de vacuoles dont la taille augmente en fonction du temps.

Le développement de ces agents est relativement lent car les premières vacuoles ne sont observées, en microscopie photonique, que vers la 36ème heure dans une cellule pour 500 environ. Toutefois, dès la 6ème heure, les cellules infectées sont plus vacuolisées que les cellules témoins.

Le pourcentage de cellules infectées croît régulièrement jusqu'au 6ème jour. A ce stade, les vacuoles ovoïdes provoquent une distension considérable de la cellule ; le cytoplasme est limité à une bande extrêmement mince autour de la vacuole et le noyau déformé, hémisphérique est refoulé à l'un des pôles de la cellule. A un stade ultime, les cellules ballonisées (*Pl. I - Fig. 4*) libèrent leur contenu dans le milieu ambiant.

Les microorganismes contenus dans les vacuoles sont colorés en rose par la coloration de May-Grünwald-Giemsa. Ce sont soit des cocci, soit le plus souvent des petits bâtonnets d'allure rickettsoïde, soit encore, dans de rares cas, des formes filamenteuses. Les bacilles sont le plus souvent isolés, mais ils peuvent être groupés en chaînettes ou disposés en palissade.

Les corps microbiens peuvent être très nombreux à l'intérieur d'une vacuole, serrés les uns contre les autres, remplissant tout le contenu vacuolaire et définissant ainsi le type condensé (*Pl. I - Fig. 1, 5 et 7*). La seconde éventualité est la présence d'un nombre restreint de corps à l'intérieur d'une vacuole. Les corps sont alors répartis à la périphérie de la vacuole ou groupés à l'un des pôles. Cet aspect est très caractéristique de ces deux souches (*Pl. I - Fig. 2 et 6*).

L'étude dynamique montre un remplissage progressif des vacuoles en corps microbiens, en fonction du temps de développement intracellulaire (*Pl. I - Fig. 2, 3 et 4*) jusqu'à ce qu'il y ait libération des corps par rupture de la vacuole (*Pl. I - Fig. 8*).

La coloration à l'iode ne montre jamais de polysaccharides au niveau de la vacuole.

Ainsi, l'étude morphologique des souches Roumaine et Richard, isolées toutes deux à partir d'oiseaux malades apporte les éléments suivants :

- petits bacilles colorés en rose par le May-Grünwald-Giemsa ;
- grandes vacuoles intracytoplasmiques contenant le plus souvent des corps microbiens dispersés.

- lenteur du développement, les meilleures conditions d'observation étant réalisées à la 96ème heure
- absence, apparemment, d'un véritable cycle de développement
- absence de coloration par l'iode.

II.3.2. ETUDE DES SOUCHES LOTH ET T 13. (Planche II - Fig. 9 à 16)

Ces deux souches d'origine aviaire sont comme les précédentes caractérisées par leur développement intracytoplasmique. Cependant, dès la 12ème heure des formations arrondies colorées en bleu par le May-Grünwald-Giemsa, groupées soit par 2 soit par 4, apparaissent dans le cytoplasme de quelques cellules.

A la 24ème heure, l'aggrégation de plusieurs corps arrondis de *1 µm* de diamètre environ, ayant la même affinité tinctoriale que précédemment, détermine des formations évoquant des *morula* (*Pl. II - Fig. 11*). Ces dernières sont constituées de corps initiaux.

Douze heures plus tard, les inclusions sont formées. Elles sont localisées dans la région paranucléaire. Leur taille est variable et leur contenu est dense (*Pl. II - Fig. 12*).

A la 48ème heure, les corps initiaux sont mêlés à de nombreuses granulations plus petites colorées en violet par le Giemsa : ce sont les corps élémentaires. Le contenu des inclusions est toujours dense ; leur taille a augmenté et leur forme est très variable : en fuseau, en chapeau ou arrondie (*Pl. II - Fig. 13*).

A la 72ème heure, les éléments microbiens commencent à diffuser dans le cytoplasme de la cellule-hôte : les inclusions s'étendent autour du noyau, sans le déformer. Certaines cellules contiennent plusieurs amas qui restent distincts les uns des autres sans former une seule et grande inclusion.

Vingt quatre heures plus tard, la culture cellulaire est très infectée avec de grandes inclusions (*Pl. II - Fig. 10 et 14)*. Les premières figures de lyse apparaissent. Des stades jeunes suggèrent l'initiation d'un second cycle de développement.

Au 6ème jour enfin, la mortalité des cellules-hôtes est fort importante. Les cellules s'arrondissent. Des fragments de cytoplasme bourrés de corps élémentaires et des noyaux pycnotiques constituent l'essentiel de la préparation à ce stade (*Pl. II - Fig. 16*). Dans de rares cas, les cellules présentent un noyau apparemment normal et un cytoplasme constitué de logettes vidées de leurs corps et limitées par de fines travées de cytoplasme (*Pl. II - Fig. 15*).

Lors de nos observations, nous avons noté quelques cas particuliers :

- certaines cellules parasitées possèdent simultanément 2 *morula*.
- plusieurs inclusions dont le développement est asynchrone peuvent se rencontrer dans une même cellule à un stade tardif (*Pl. II - Fig. 10*).
- des cellules parasitées peuvent se diviser (*Pl. II - Fig. 9*).

Les colorations à l'iode se sont révélées négatives au cours des différents stades du développement.

Les souches Loth et T 13 sont donc caractérisées par :

- leur vitesse de développement plus rapide que les précédentes ;
- la présence d'inclusions denses, diffuses et irrégulières et l'absence généralement de vacuoles (bien qu'il puisse parfois exister une certaine exclusion cytoplasmique autour des inclusions) ;

- l'existence d'un véritable cycle de développement où alternent des corps initiaux et des corps élémentaires ;
- l'absence de coloration par l'iode ;
- l'effet cytopathogène marqué.

II.3.3. ETUDE DES SOUCHES Q 18 ET D 41. (Planche III - Fig. 17 à 24)

Ces deux souches d'avortement de la brebis ont un développement comparable à celui des deux souches précédentes d'origine aviaire. Toutefois le cycle de développement débute plus tardivement à la 36ème heure avec la souche Q 18 (*Pl. III - Fig. 17*).

Les inclusions formées par ces deux souches sont comparables à celles décrites pour les souches Loth et T 13. Les inclusions denses, irrégulières et diffuses envahissent tout le cytoplasme de la cellule-hôte (*Pl. III - Fig. 19 et 20*) ; certaines forment même un anneau autour du noyau évoquant une cocarde (*Pl. III - Fig. 23*). Quelques petites inclusions sont entourées d'un halo clair (*Pl. III - Fig. 18*). Certaines cellules contiennent à un stade tardif des vacuoles de grande taille dans lesquelles sont éparpillés quelques corps arrondis (*Pl. III - Fig. 24*) rappelant les vacuoles décrites au premier chapitre. Dans de rares cas, on observe des corps arrondis de plus grande taille (*Pl. III - Fig. 21*).

Il existe comme pour les souches Loth et T 13, un véritable cycle de développement avec des corps initiaux colorés en bleu par le May-Grünwald-Giemsa lors des premiers stades et des corps élémentaires colorés en violet par le May-Grünwald-Giemsa à partir de la 72ème heure pour Q 18.

A un stade tardif, l'effet cytopathogène est intense (*Pl. III - Fig. 22*).

La coloration à l'iode est négative quel que soit le stade du développement.

Du point de vue morphologique, ces deux souches d'origine mammalienne sont donc très proches des deux souches d'origine aviaire Loth et T 13 et se distinguent nettement des souches Roumaine et Richard à l'exception de certaines images concernant des stades tardifs sur lesquelles nous reviendrons.

II.3.4. ETUDE DE LA SOUCHE MRC 4 DE CONJONCTIVITE A INCLUSIONS (Planche IV - Fig. 25 à 28)

Les inclusions observées contiennent des corps microbiens serrés les uns contre les autres donnant à l'inclusion un aspect granuleux identique à ce que nous avons décrit pour les souches d'ornithose, de psittacose et d'avortement de brebis (*Pl. IV - Fig. 27*).

L'étude dynamique met en évidence un cycle de développement avec corps initiaux et corps élémentaires. Les tétrades s'observent dès la 12ème heure. A la 48ème heure, l'inclusion compacte est essentiellement constituée de corps élémentaires. Elle est intracytoplasmique de forme arrondie ou ovalaire.

A un stade plus tardif, les inclusions se rompent et libèrent leur contenu dans le milieu de culture, mais l'effet cytopathogène est moins intense qu'avec les souches T 13 et Q 18.

La coloration à l'iode réalisée sur les stades précoces et tardifs est négative (*Pl. IV - Fig. 28*).

Toutefois, cette souche cultivée au laboratoire depuis décembre 1969 n'a pas toujours présenté ces caractères. En effet, lors des premières études effectuées, les inclusions observées étaient de type clairsemé, caractérisées par un éparpillement des corps microbiens sphériques dans la vacuole dont le pourtour bien délimité donnait une impression de rigidité (*Pl. IV - Fig. 25*). Le cycle de développement était parallèle à celui décrit pour les inclusions compactes.

La coloration à l'iode révélait alors la présence, dans la vacuole, de polysaccharides ayant les caractéristiques du glycogène (*Pl. IV - Fig. 26*).

Les résultats concernant cette variation morphologique majeure avec le passage, jusqu'à présent irréversible, d'une souche à inclusions rigides, déformant parfois le noyau de la cellule, de type clairsemé et présence de matrice glycogénique, à une souche à inclusions compactes, iode négatif, ont déjà fait l'objet d'une publication (*35*). A cette occasion, nous avons montré que les deux types provenaient bien de la même souche (typage par la microtechnique en immunofluorescence) et qu'il n'y avait pas eu de contamination au cours de notre travail.

La souche est donc caractérisée par la présence d'un véritable cycle de développement.

L'aspect de l'inclusion et la présence de glycogène apparaissent, par contre, comme des caractères variables.

II.3.5. CONCLUSION.

L'étude morphologique des différentes souches de *Rickettsiales* décrites dans ce chapitre permet d'individualiser deux types essentiels de vacuoles (*Cf. Schéma 1*):

a- Des vacuoles intracytoplasmiques vastes, au contenu très épars :

Ces vacuoles refoulent tous les organites cellulaires et provoquent même une déformation du noyau : elles sont dites "rigides". Elles sont facilement repérables in vivo par l'observation au microscope inversé.

Selon la morphologie et les affinités tinctoriales des éléments qu'elles contiennent, nous pouvons distinguer dans toutes les vacuoles d'une même population cellulaire :

- soit des petits bacilles, voire même quelques formes filamenteuses, colorés en rose par le May-Grünwald-Giemsa :

--> type *Coxiella burneti (Sch. 1 - Fig. 2)*

- soit des cocci de *0,3 à 1 µm* de diamètre colorés soit en bleu soit en violet par le May-Grünwald-Giemsa :

--> type *Chlamydia trachomatis (Chlamydiae groupe A)* avec vacuole pouvant être colorée en brun acajou par l'iode facilement repérable lors de l'examen de la préparation au faible grossissement (*Sch. 1 - Fig. 3*).

b- Des vacuoles intracytoplasmiques, caractérisées par la densité de leur contenu : vacuoles dites "compactes".

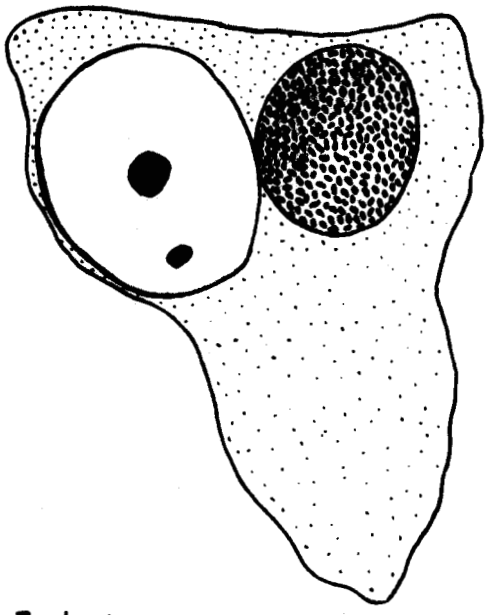
- celles-ci peuvent être arrondies et contenir des petits bacilles colorés en rose par le May-Grünwald-Giemsa :

--> type *Coxiella burneti (Sch. 1 - Fig. 1)*

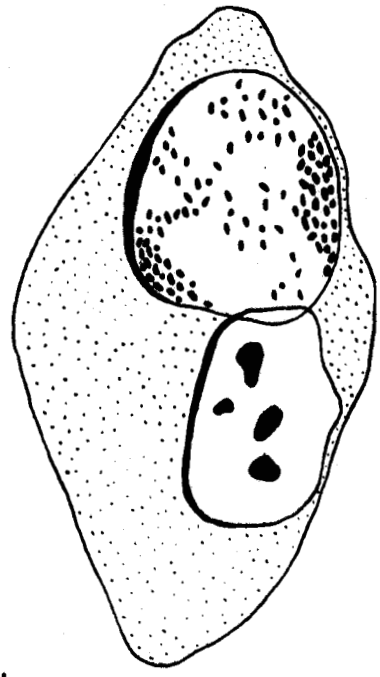
- elles peuvent être arrondies lors des premiers stades (*morula*) puis devenir irrégulières et diffuses, envahissant tout le cytoplasme en contournant les organites cellulaires. Leur contenu est constitué de corps arrondis de *0,3 à 1 µm* de diamètre colorés en bleu ou en violet selon le stade et la taille des corps. Les inclusions sont dans ce cas facilement repérables lors de l'examen de la préparation au faible grossissement :

--> type *Chlamydia psittaci (Chlamydiae groupe B)* avec vacuole non colorée par l'iode (*Sch. 1 - Fig. 4*).

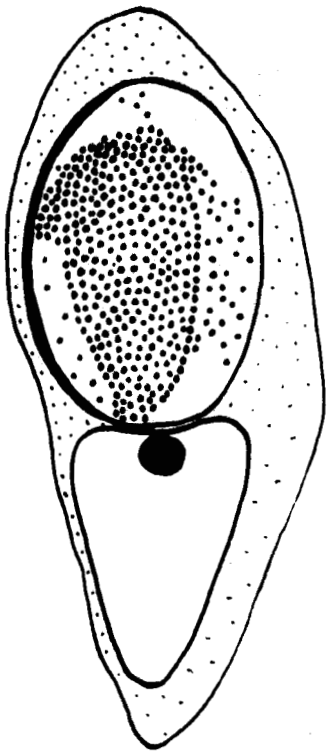
SCHEMA - 1



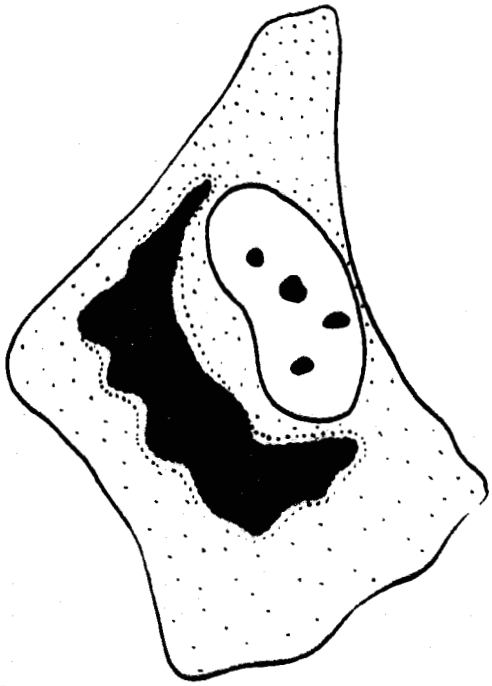
1 - Inclusion rigide et dense
Corps microbiens allongés, colorés en rose par le May-Grunwald-Giemsa
Type : CORIELLA burneti.



2 - Vacuole clairsemée et rigide
Corps microbiens en bâtonnets
Type : CORIELLA burneti.



3 - Inclusion clairsemée, rigide
Corps microbiens arrondis
Type CHLAMYDIA trachomatis



4 - Inclusion dense diffuse irrégulière
Corps microbiens arrondis colorés en violet par le May-Grunwald-Giemsa
Type : CHLAMYDIA psittaci

BUS LILLE

Il convient toutefois d'apporter deux remarques :

- certains aspects peuvent être trompeurs, notamment lors des stades tardifs (*Pl. III - Fig. 24*), (*Pl. IV - Fig. 29*), mais l'examen approfondi de l'ensemble de la lamelle ne laisse subsister aucun doute sur le type *Coxiella* ou *Chlamydia*.

- à l'intérieur du groupe des *Chlamydiae*, la caractérisation d'une souche dans l'un des deux sous groupes A ou B en n'utilisant que des critères morphologiques n'est pas suffisante car une même souche peut présenter les deux aspects successivement (tel est le cas de la souche MRC 4) ou simultanément (*116*). Bien plus, certains auteurs vont même jusqu'à suggérer une différentiation des souches basée sur des critères exactement opposés (*in 116*).

II.3.6. CAS PARTICULIER DE LA SOUCHE D'AVORTEMENT DE LA VACHE (Planche IV - Fig. 29 à 32).

Elle se présente sous forme :

- de vacuoles de type clairsemé, de taille variable, bien limitées contenant de petits bacilles colorés en rose ou en violet par le May-Grünwald-Giemsa, type *Coxiella burneti (Pl. IV - Fig. 30)*.

- de vacuoles de type compact contenant :

  . soit des bacilles colorés en rose par le May-Grünwald-Giemsa, type *Coxiella burneti (Pl. IV - Fig. 29)*.

  . soit des corps arrondis colorés en bleu ou en violet, type *Chlamydia (Pl. IV - Fig. 31)*.

Ces différents types de vacuoles s'observent dans le cytoplasme des cellules d'une même population cellulaire (*Pl. IV - Fig. 32*) et dans de rares cas dans le cytoplasme d'une même cellule (*Pl. IV - Fig. 31*).

On dénombre une inclusion de type *Chlamydia* pour environ 200 vacuoles type *Coxiella*.

Du point de vue morphologique la souche d'avortement de vache apparaît donc comme le mélange d'une *Coxiella* et d'une *Chlamydia*.

II.4. ETUDE ULTRASTRUCTURALE.

II.4.1. ETUDE DE LA SOUCHE ROUMAINE ET DE LA SOUCHE RICHARD.

II.4.1.1. SOUCHE ROUMAINE. (Planches V et VI)

L'agent microbien présente un important polymorphisme (*Pl. VI - Fig. 37*) que traduit l'observation de :

- formes coccobacillaires de *0,450 à 0,600 µm* de longueur sur *0,200 à 0,350 µm* de largeur, les plus nombreuses.
- formes bacillaires de *1 à 1,5 µm* de longueur sur *0,200 à 0,350 µm* de largeur.
- formes coccoïdes enfin de *0,250 à 0,400 µm* de diamètre qui ne représentent peut-être que la section transversale des formes décrites ci-dessus.

Il existe par ailleurs des corps allongés, en virgule, ou en chapelet, voire même des corps polylobés.

Les corps sont limités par une paroi à 3 feuillets, plus ou moins plissée dont la structure évoque une paroi de bactérie à Gram négatif et par une membrane protoplasmique.

Le contenu des formes coccobacillaires et bacillaires montre deux zones distinctes :

- une zone périphérique relativement dense aux électrons, composée de granules de taille des ribosomes.

- une zone centrale ou l'on peut distinguer à fort grossissement, des fibrilles de type DNA. Dans de rares cas existe un nucléoïde dense aux électrons.

Certaines formes coccoïdes et coccobacillaires ont un contenu homogène constitué de granules de la taille des ribosomes.

La division des corps est binaire, transversale (*Pl. VI - Fig. 37*).

L'agent envahit le cytoplasme de la cellule-hôte. Les corps isolés ou groupés sont emprisonnés dans des vacuoles limitées par une membrane (*Pl. V - Fig. 33*). Plusieurs microorganismes peuvent pénétrer dans le cytoplasme d'une cellule-hôte. Chaque corps est contenu à l'intérieur d'une petite vacuole de phagocytose, (*Pl. V - Fig. 34*). La confluence des vacuoles développées autour de chaque élément phagocyté aboutit à la formation d'une vacuole de grande taille à contours irréguliers puis de forme arrondie ou ovalaire. Les corps sont alors généralement entourés d'un halo clair (*Pl. V - Fig. 35*).

La vacuole peut être remplie de corps serrés les uns contre les autres. Mais le plus souvent, on ne trouve qu'un nombre restreint de corps à l'intérieur de volumineuses vacuoles. Ils sont alors disposés à la périphérie de la vacuole ou groupés à l'un de ses pôles (*Pl. VI - Fig. 37*).

A côté de corps d'apparence saine, certains semblent plus ou moins digérés (*Pl. V - Fig. 35*). Des fantômes de membranes et des figures myéliniques (*Pl. VI - Fig. 36*) s'observent également dans les vacuoles et sont les témoins de la défense de la cellule contre le microorganisme.

II.4.1.2. SOUCHE RICHARD.
(Planche VII - Fig. 38 et 39)

On retrouve chez cet agent :

- les différentes formes décrites précédemment pour la souche Roumaine ;
- l'aspect rickettsien des corps ;
- la paroi typiquement plissée ;
- la division par étranglement transversal ;
- la localisation à l'intérieur de vacuoles intracytoplasmiques.

II.4.2. ETUDE DES SOUCHES LOTH ET T 13.

II.4.2.1. SOUCHE LOTH D'ORNITHOSE.
(Planches VIII et IX - Fig. 40 à 45)

L'examen de cellules HeLa infectées avec l'agent de l'ornithose montre à partir de la 48ème heure une ou plusieurs vacuoles intracytoplasmiques au contenu hétérogène. Les corps contenus dans ces vacuoles présentent un polymorphisme très net. On rencontre de petites formes plus ou moins sphériques opaques aux électrons, des formes arrondies de grande taille et des formes intermédiaires présentes en moins grand nombre. De la pénétration de l'agent à l'expulsion des corps infectieux, les microorganismes passent successivement de la forme dense à la forme de grande taille puis à nouveau à la forme dense. On peut également observer des formes géantes et des formations vésiculaires.

a- Les corps initiaux (Pl. IX - Fig. 43)

Ce sont des éléments arrondis dont la taille varie de *0,6 à 1 µm* de diamètre environ. Ils sont entourés par deux "*unit membrane*" légèrement sinueuses, séparées l'une de l'autre par un espace clair d'environ 100 Å.

Ils possèdent une structure relativement lâche. Le centre est occupé par un réseau de filaments. La périphérie, plus dense aux électrons, est constituée de granules de 150 Å environ qui évoquent des ribosomes. Ces granules ne sont pas toujours répartis régulièrement à la périphérie du corps, mais peuvent être rassemblés à l'un des pôles.

Certains corps allongés présentent un étranglement médian.

b- Les corps élémentaires (Pl. IX - Fig. 45)

Plus petits que les précédents, ils ne mesurent que *0,3 µm* de diamètre. La membrane externe limite des corps presque sphériques ou de contours plus irréguliers, voire crénelés (*Pl. IX - Fig. 42*). Un espace clair sépare parfois cette membrane du contenu du corps. Une seconde membrane n'est visible qu'en de rares points avec la double fixation utilisée.

Les corps élémentaires sont caractérisés par la présence d'une masse ovoïde, opaque aux électrons, qui occupe l'un des pôles : c'est le *nucléoïde*. Le reste du corps est constitué de granules de 150 Å s'apparentant par leur taille à des ribosomes.

c- Les corps intermédiaires (Pl. IX - Fig. 44)

Ces corps sont intermédiaires par leur taille et leur structure entre les corps initiaux et les corps élémentaires. Limités par deux systèmes membranaires, ils possèdent un nucléoïde dense aux électrons, en position centrale. A la périphérie, on retrouve les granules de 150 Å. Entre les deux zones existe une plage fibrillaire plus claire.

d- Les corps géants (Pl. IX - Fig. 42)

A côté de ces trois corps typiques, on peut rencontrer des corps sphériques de même structure que les corps initiaux mais dont la taille — *2 µm* et plus — est très supérieure à la taille habituelle des corps initiaux. Ils sont rares.

e- Les formations vésiculaires (Pl. VIII - Fig. 41)

Dans la vacuole, sont également disséminées de petites vésicules sphériques ou ovoïdes dont la taille varie de *20 à 200 mµm*. Elles sont entourées par un système membranaire et sont claires aux électrons. Libres ou accolées aux corps, elles pourraient provenir d'évaginations de la membrane externe des corps y compris des corps élémentaires.

f- Le cycle de développement intracellulaire

Vers la *12ème heure*, on rencontre, dans le cytoplasme de certaines cellules, des corps initiaux ou des corps intermédiaires isolés, entourés d'une membrane vacuolaire. Les membranes plasmiques entourant chaque corps phagocyté vont fusionner (*Pl. VIII - Fig. 40*) pour constituer une vacuole unique dont la membrane se moule sur les corps qui se trouvent en contact direct avec elle (*Pl. VIII - Fig. 41*).

A la *24ème heure* est ainsi formée l'inclusion qui contient une quinzaine de corps initiaux. Puis les corps initiaux se divisent par fission binaire et se trouvent mêler à des corps intermédiaires et à des corps élémentaires (*Pl. VIII - Fig. 41*).

A partir de la *48ème heure*, l'inclusion dont la taille continue à croître, se remplit progressivement en corps élémentaires, alors que le nombre de corps initiaux diminue.

Compacte et relativement bien limitée jusqu'à la *72ème heure (Pl. IX - Fig. 42)*, l'inclusion va alors avoir tendance à envahir tout le cytoplasme de la cellule-hôte et à le réduire à une mince bande périphérique.

Les corps microbiens semblent diffuser dans le cytoplasme et il n'est pas rare, à la *96ème heure*, qu'une même cellule renferme plusieurs inclusions de taille variée et à des stades de développement différent, (*Pl. XIX - Fig. 66*). Libérés par rupture de la mince bande cytoplasmique qui sépare l'inclusion de la membrane cellulaire ou par éclatement de la cellule, les corps élémentaires seront à l'origine d'un second cycle.

II.4.2.2. SOUCHE T 13 DE PSITTACOSE. (Planche X - Fig. 46 et 47)

Elle forme des inclusions extrêmement denses et diffuses dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Les vacuoles contiennent comme précédemment des corps initiaux, des corps intermédiaires et des corps élémentaires. Les corps sont sphériques ou de contours plus irréguliers se moulant les uns avec les autres. Il existe un cycle de développement où alternent les corps initiaux et les corps élémentaires.

II.4.3. SOUCHE Q 18 ET SOUCHE D 41. (Planches XI à XIII - Fig. 48 à 53)

Le développement intracytoplasmique de ces deux agents responsables d'avortement chez la brebis aboutit à la formation d'inclusions séparées du cytoplasme par une membrane simple, visible en certains points seulement et se moulant sur les corps en contact avec elle (*Pl. XI - Fig. 49*).

L'inclusion âgée de 24 heures est composée de corps arrondis de *0,550 à 1 µm* de diamètre dont la structure rappele celle des corps initiaux précédemment décrits (*Pl. XI - Fig. 48*). Certains d'entre eux présentent une légère constriction médiane, d'autres semblent en voie de séparation ; certains, enfin, paraissent complètement divisés et chaque cellule-fille possède son double système membranaire (*Pl. XI - Fig. 48 et 49*).

A partir de la *48ème heure*, le contenu de la vacuole est hétérogène (*Pl. XIII - Fig. 52*). La taille des corps constituant l'inclusion varie de *0,750 à 1 µm* pour les corps initiaux sans nucléoïde différencié à *0,250-0,300 µm* pour les corps élémentaires denses aux électrons, avec des formes de passage de *0,300 à 0,500 µm* de diamètre : les corps intermédiaires (*Pl. XII - Fig. 50*). La formation de ces derniers à partir des formes immatures que sont les corps initiaux se réalise par réduction de la taille et apparition d'un "*nucléoïde central*" duquel partent des fibrilles radiées ; ils sont limités par deux systèmes membranaires légèrement sinueux séparés l'un de l'autre par un mince espace clair. Certains d'entre eux se divisent par fission binaire (*Pl. XII - Fig. 51*).

A un stade tardif (*96ème heure*), les vacuoles contiennent peu de corps initiaux, quelques corps intermédiaires et beaucoup de corps élémentaires qui seront à l'origine d'un nouveau cycle infectieux (*Pl. XII - Fig. 50 et Pl. XIII - Fig. 53*). Ceux-ci sont des corps arrondis ou à

contours plus irréguliers, polygonaux avec parfois des évaginations de la membrane externe ; c'est le cas notamment de la souche Q 18. Le nucléoïde est en position excentrée, entouré par une zone homogène composée de granules de 150 Å s'apparentant par leur taille aux ribosomes (*Pl. XII - Fig. 51)*. De rares corps élémentaires contiennent en outre quelques granulations hétérogènes de 250 Å environ.

Les vacuoles, à contours irréguliers, ont alors tendance à envahir tout le cytoplasme de la cellule-hôte. Au contact de certaines inclusions on peut noter la présence de mitochondries (*Pl. XII - Fig. 50*), de lysosomes secondaires (*Pl. XI - Fig. 48*) et de fibrilles (*Pl. XI - Fig. 49*). Plusieurs inclusions peuvent se développer dans une même cellule (*Pl. XI - Fig. 49*).

II.4.4. LA SOUCHE MRC 4 DE CONJONCTIVITE A INCLUSIONS. (Planches XIV et XV - Fig. 54 à 57)

Les premières cultures de la souche réalisées au laboratoire en cellules HeLa ont montré des inclusions de type clairsemé. A la *24ème heure*, l'inclusion, limitée par une membrane simple, "rigide" et déformant le noyau, ne contient que des corps initiaux. Ceux-ci se répartissent à la périphérie de la vacuole qui renferme, en outre, de nombreux granules groupés en rosettes (*Pl. XIV - Fig. 54*). La coloration par la méthode de *THIERY* permet, pour un temps de contact de 30 minutes avec la thiocarbohydrazide, d'affirmer la nature glycogénique de ces granules (*Pl. XIV - Fig. 55*). Un prélèvement effectué à la *48ème heure* montre des corps élémentaires et des corps intermédiaires au sein de la vacuole.

Actuellement, les cultures réalisées conjointement sur cellules KB et HeLa déterminent la formation d'inclusions, non plus de type clair-semé comme précédemment mais de type condensé (*Pl. XV - Fig. 56*). Les résultats sont identiques quel que soit le type cellulaire. La recherche du glycogène dans ces vacuoles est négative ou n'objective que quelques rares granulations positives.

A la *18ème heure*, les vacuoles intracytoplasmiques limitées par une membrane contiennent quelques corps initiaux de *0,6 à 1 µm* de diamètre. Certains d'entre eux, plus allongés, présentent un étranglement médian, indice d'une division par fission binaire. Leur structure est analogue à celle des corps initiaux de l'agent de l'ornithose. A la *24ème heure* apparaissent des corps sphériques, plus petits, à nucléoïde central dense aux électrons : les corps intermédiaires. L'inclusion peut également contenir des "corps miniatures" d'un diamètre moyen de *0,2 µm* et de structure comparable à celle des corps initiaux ; ils semblent résulter du bourgeonnement de ces derniers (*Pl. XIV - Fig. 54*).

Par division répétées des corps initiaux, le nombre des corps microbiens augmente dans la vacuole. Après un nombre encore indéterminé de divisions, les corps initiaux se transforment progressivement, par réduction de taille et différenciation d'un "nucléoïde" opaque aux électrons, en corps intermédiaires puis en corps élémentaires de *0,3 µm* de diamètre. Ainsi de la *24ème* à la *72ème heure*, le contenu des inclusions va se modifier par diminution du nombre des corps initiaux et augmentation parallèle du nombre des corps élémentaires (*Pl. XIX - Fig. 67*). Des formes géantes (*Pl. XV - Fig. 57*) ainsi que des corps intermédiaires en division (*Pl. XIX - Fig. 67*) peuvent être observés.

Même à un stade tardif, la vacuole est toujours bien limitée au sein du cytoplasme ce qui lui confère un aspect "rigide". Elle repousse tous les organites intracytoplasmiques, déforme éventuellement le noyau (*Pl. XIV - Fig. 54*) et réduit le cytoplasme à une mince bande périphérique (*Pl. XIX - Fig. 67*).

II.4.5. LA SOUCHE D'AVORTEMENT DE VACHE. (Planche XVI - Fig. 58 et 59)

En microscopie électronique, la souche d'avortement de vache se présente sous forme de corps d'allure rickettsienne, très polymorphiques, contenus dans des vacuoles limitées par une membrane. Plusieurs vacuoles de taille différente peuvent envahir le cytoplasme d'une même cellule (*Pl. XVI - Fig. 58*). Les corps sont limités par un double système membranaire et présentent assez souvent un nucléoïde central (*Pl. XVI - Fig. 59*). Les vacuoles et les corps correspondent à *Coxiella burneti*.

Nous n'avons pas trouvé d'inclusions de type chlamydien comme nous en avions observées en microscopie optique. Cela tient au faible pourcentage de celles-ci par rapport aux précédentes : 1 pour 200 environ.

II.4.6. CONCLUSION.

La microscopie électronique nous permet :

a- de différencier parmi les souches d'origine aviaire deux germes totalement différents (Planche XVII).

- l'un caractérisé par son polymorphisme et de petits bâtonnets d'allure rickettsienne de structure identique durant tout le

développement intravacuolaire de l'agent : souches Roumaine et Richard. Ce sont les caractères de l'espèce *Coxiella burneti (Pl. XVII - Fig. 60)*.

- l'autre caractérisée par la présence de trois types de corps arrondis de taille et de structure différentes : les corps élémentaires, éléments infectieux, les corps intermédiaires et les corps initiaux, formes de division : souches Loth d'ornithose et T 13 de psittacose. Ce sont les caractères de l'espèce *Chlamydia psittaci (Pl. XVII - Fig. 61)*.

b- de constater que la structure des agents d'origine aviaire et d'origine mammalienne, regroupés dans l'espèce Chlamydia psittaci, est comparable en dépit de quelques aspects secondaires (Pl. XVIII - Fig. 62 à 65).

c- de distinguer les inclusions caractérisant Chlamydia trachomatis de celles appartenant à Chlamydia psittaci (Planche XIX).

- par l'aspect général "rigide" et bien limité des inclusions de *Chlamydia trachomatis (Pl. XIX - Fig. 67)* s'opposant au caractère irrégulier et diffus des inclusions de *Chlamydia psittaci (Pl. XIX - Fig. 66)*.

- éventuellement par la mise en évidence de glycogène intravacuolaire chez les souches de *Chlamydia trachomatis* productrices de glycogène (*Planche XIV*) mais en notant que ce caractère n'est pas stable.

CHAPITRE III

ETUDE IMMUNOLOGIQUE

°°
°

Pour déterminer indirectement la nature des germes et rechercher les communautés antigéniques pouvant exister entre les souches, différentes techniques immunologiques sont à notre disposition. Nous en avons choisi deux : la réaction de fixation du complément qui permet une analyse antigénique se limitant au groupe et la réaction d'immunofluorescence qui permet d'atteindre le type.

III.1. RESULTATS OBTENUS AVEC LA REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT.

Nous ne développerons pas cette technique qui est utilisée journellement dans les laboratoires de sérologie. Elle est effectuée selon les normes internationales de l'U.S. Department of Health, Education and Welfare (*129*).

Un témoin antigène oeuf normal et trois antigènes de référence pour fixation du complément ont été utilisés :

- un antigène *Rickettsia prowazeki* : dilution 1/8 du 28-12-73
- un antigène *Coxiella burneti* : dilution 1/4 du 28-8-73

Ces deux antigènes nous ont été fournis par l'Institut de Virologie SASC de BRATISLAVA (Laboratoire de référence de l'O.M.S.)

- un antigène *Chlamydia psittaci* (ornithose) de l'Institut Pasteur de PARIS.

Les sérums immuns ont été fabriqués à partir des souches étudiées. Un schéma expérimental unique n'a pu être appliqué en raison des différences de réponse selon l'animal et la voie d'inoculation. Trois sérums de référence ont été ajoutés :

- sérum de bétail anti-*Coxiella burneti* fourni par l'Institut de Virologie SASC de BRATISLAVA (Laboratoire de référence de l'O.M.S.)
- sérum humain anti-ornithose (titre 1/320ème en fixation du complément) fourni par le centre O.M.S. DE COPENHAGUE.
- sérum anti-lymphogranulomatose vénérienne (LGV) MENDOZA fourni par le centre de référence de SAN FRANCISCO (Docteur SCHACHTER).

Les résultats recueillis ont été regroupés dans le tableau 3.

Il apparaît que les souches Roumaine et Richard appartiennent à l'espèce *Coxiella burneti*, les souches Loth, T 13 et Q 18 appartiennent au genre *Chlamydia*.

Il n'existe aucune réaction croisée entre d'une part *Rickettsia prowazeki* et *Coxiella burneti*, d'autre part entre *Coxiella burneti* et le genre *Chlamydia*.

La réaction de fixation du complément permet de mettre en évidence une relation antigénique de groupe entre l'agent de l'ornithose et ceux responsables de la psittacose, de l'avortement de la brebis, et de la lymphogranulomatose vénérienne.

TABLEAU 3

- IDENTIFICATION DES GERMES PAR LA REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT -

SERUMS \ ANTIGENES	OEUF NORMAL	*RICKETTSIA PROWAZEKI*	*COXIELLA BURNETI*	*CHLAMYDIA PSITTACI*
Anti-*Coxiella burneti*	-	-	+ + +	-
Anti-ornithose	-	-	-	+ + +
Anti-LGV	-	-	-	+ + +
Anti-souche Roumaine	-	-	+ + +	-
Anti-souche Richard	-	N T	+ +	-
Anti-Loth	-	-	-	+ + +
Anti-T 13	-	N T	-	+ +
Anti-Q 18	-	-	-	+ +
Anti-D 41°				
Anti-MRC 4°				
Anti-avortement de vache	-	N T	-	-

N T : Non Testé
- : Négatif
+, ++, +++ : Positif
° : Sérum anti-complémentaire

BUS LILLE

III.2. RESULTATS OBTENUS AVEC LA TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE.

En *1970, WANG* et *GRAYSTON (121)* ont mis au point une micro-méthode en immunofluorescence pour typer des souches de trachome et de lymphogranulomatose vénérienne. Cette technique s'est révélée particulièrement intéressante pour sa spécificité de type.

III.2.1. ADAPTATION EXPERIMENTALE DE LA MICROMETHODE EN IMMUNOFLUORESCENCE.

III.2.1.1. PREPARATION ET CHOIX DES ANTIGENES.

a- A partir des sacs vitellins :

La suspension antigénique provient de sacs vitellins d'oeufs de poule embryonnés inoculés au 6ème jour, broyés à l'aide de billes de verre contenues dans des flacons stériles de 150 ml. Les sacs sont prélevés stérilement :

- soit à la mort de l'embryon
- soit après sacrifice des embryons encore vivants lorsque 50 % des embryons sont morts.

Le sac est pesé avant broyage et on effectue une dilution au 1/10ème dans du liquide de Hanks. Une centrifugation à 1000 tours/mn pendant 5 minutes détermine la superposition d'une couche lipidique, d'une couche de débris cellulaires et d'une couche intermédiaire qui contient les agents microbiens et constitue l'antigène.

La richesse de l'antigène est contrôlée selon la technique de *REEVE* et *TAVERNE* par une coloration au Giemsa au 1/10ème durant 1 heure après fixation à l'alcool méthylique pendant 15 minutes. On effectue ensuite un rinçage à l'alcool méthylique à 70 % puis à l'eau distillée. La lecture est effectuée au fond noir : les *Chlamydiae* apparaissent vert brillant. Le champ microscopique doit être pratiquement couvert de particules pour que le sac vitellin soit retenu *(98)*. L'antigène est alors réparti dans des petits tubes à raison de 0,4 ml par tube. Ceux-ci sont stockés à - 70° C et peuvent être conservés pendant une année.

b- A partir de sacs vitellins purifiés par une extraction à l'alcool-éther :

On place dans une burette à décanter 1 Volume de la suspension antigénique préparée selon les modalités décrites au paragraphe précédent et 2 Volumes d'un mélange alcool-éther (Alcool absolu = 1 Volume/Ether = 9 Volumes). L'ensemble est homogénéisé par agitation durant 5 minutes en chambre froide. Après 24 heures de décantation en chambre froide, on obtient la superposition de 4 couches. La première contient le mélange alcool-éther ; la seconde est une couche lipidique ; la troisième est une couche claire ; la dernière est dense et contient les corps microbiens.

c- A partir de cultures cellulaires :

Lorsque la culture cellulaire est infectée à plus de 90 % les cellules sont grattées, agitées avec des billes de verre puis centrifugées à 1000 tours/mn pendant 5 minutes. Le surnageant qui contient les corps microbiens est alors centrifugé durant 30 minutes à 10000 tours/mn.

d- Comparaison des méthodes de préparation :

Lorsque les antigènes sont préparés à partir des cultures cellulaires, la lecture des lames est difficile : gouttes moins bien délimitées, débris cellulaires fluorescents. Au contraire, la lecture est aisée avec les antigènes extraits par le mélange alcool-éther, mais les résultats sont moins spécifiques que ceux obtenus avec les antigènes oeufs non traités. En conséquence, l'antigène sac vitellin non traité donne les meilleurs résultats par :

- sa richesse en corps microbiens
- sa spécificité
- la facilité de lecture.

Néanmoins, c'est un antigène vivant qu'il convient de manipuler avec précaution.

e- Choix des antigènes :

Le choix des antigènes est fonction des souches étudiées et des communautés antigéniques qui peuvent exister entre certaines souches. Nous avons joint aux 7 souches étudiées, 2 souches de *Chlamydia trachomatis* : l'une d'origine oculaire T 44, l'autre d'origine génitale UW 3, ainsi qu'un témoin oeuf normal.

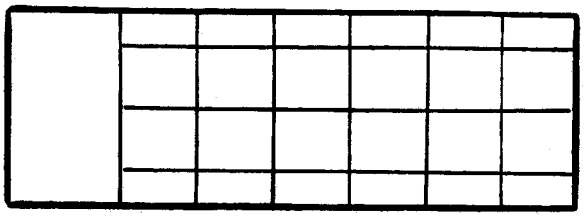
III.2.1.2. PREPARATION DE LA LAME.

Une lame fine de 25 x 75 mm dégraissée et rinçée à l'eau distillée est quadrillée à l'aide d'un graveur dans le sens longitudinal et dans le sens transversal. Un premier trait vertical dans le sens de la longueur situé à 15 mm du bord gauche de la lame délimite une zone dans laquelle est inscrit le numéro de la lame. Trois traits longitudinaux, respectivement à 4, 12,5 et 21 mm du bord supérieur, sont ensuite tracés. Puis on grave à nouveau 5 traits transversaux à 25, 35, 45, 55 et 65 mm du bord gauche de la lame de façon à ce qu'ils soient recouverts ensuite par une lamelle de 24 x 50 mm. Un modèle est placé sous la lame pour guider les différents tracés (*Schéma 2 - Fig. 1)*.

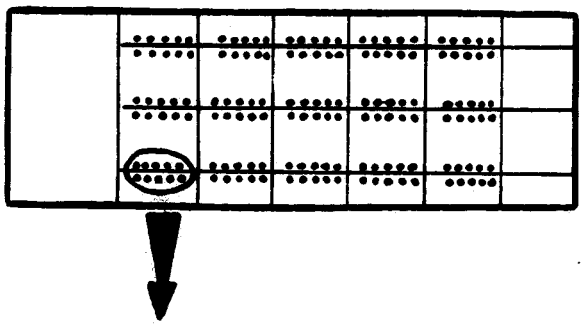
On dispose alors, dans chaque rectangle ainsi délimité et de part et d'autre de chaque ligne horizontale, jusqu'à 5 microgrouttes de suspensions antigéniques, préalablement agitées à l'aide de l'homogénéisateur "PRESS-TO-MIX-LENCO", avec une plume "Sergent Major" montée sur un porte-plume en bois. Pour chaque groupe, les antigènes doivent toujours être disposés dans le même ordre. Il est important qu'ils soient homogènes, relativement proches les uns des autres pour permettre une lecture facile et rapide. Il faut avoir bien soin d'éviter qu'ils ne se mêlent (*Schéma 2 - Fig. 2 et 3)*. Après séchage 30 minutes à la température du laboratoire, la lame est fixée 20 minutes dans l'acétone.

SCHEMA _2

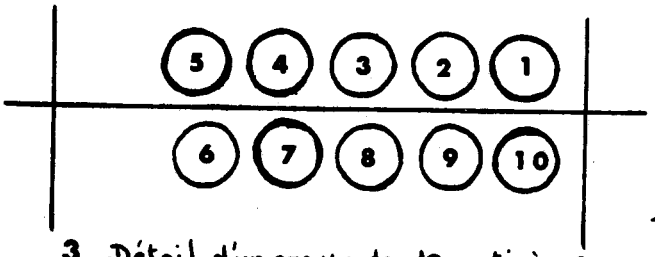
1_ Quadrillage de la lame fine.



2_ Dépot des antigènes.

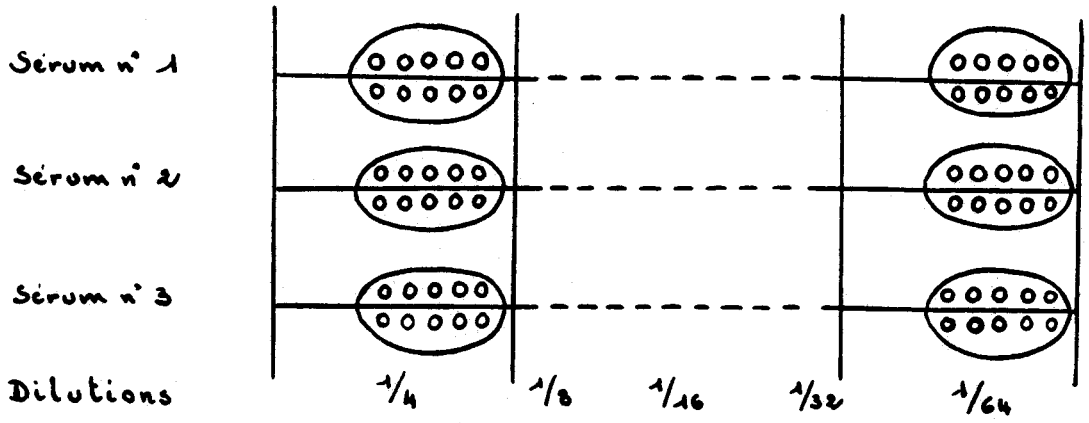


1. OAN 60h
2. T13
3. Q18
4. D41
5. T44



6. UW3
7. MRC4
8. Souche Roemaine
9. Souche Richard
10. Témoin oeuf.

3_ Détail d'un groupe de 10 antigènes



4_ Dépot des dilutions de sérum.

Microtechnique en Immunofluorescence

BUS LILLE

III.2.1.3. TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE.

Trois sérums de référence ou préparés expérimentalement chez l'animal sont titrés simultanément ; chacun d'eux correspond à une ligne horizontale. Des dilutions de sérum au 1/4ème, 1/8ème, 1/16ème, 1/32ème et 1/64ème (et au-delà dans une autre série si cela est nécessaire) sont réalisées à l'aide d'une solution tampon à pH = 7,2.

I goutte de chaque dilution de sérum est appliquée soigneusement sur un ensemble de 10 antigènes à l'aide d'une petite anse de platine (*Schéma 2 - Fig. 4*).

Les lames sont alors placées à l'étuve à 37° C, en atmosphère humide durant 30 minutes. Elles sont ensuite lavées dans la solution tampon pendant 15 minutes sous agitation magnétique puis séchées à l'air.

Dans un deuxième temps, le complexe antigène-anticorps est révélé au moyen d'une antiglobuline de l'Institut Pasteur ou de Nordic Pharmaceuticals and Diagnostics marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine qui provient du sérum d'un animal hyperimmunisé avec une globuline de l'espèce à laquelle appartient le sérum à titrer. Une solution de Bleu d'Evans au 1/10000ème est utilisée comme contre colorant. Les lames sont de nouveau placées à l'étuve à 37° C pendant 30 minutes. On lave et on sèche comme précédemment.

Les lames sont montées dans le tampon et recouvertes d'une lamelle 24 x 50 mm. La lecture est effectuée soit avec un microscope Wild équipé d'une lampe universelle avec tube quartz-iode et d'un brûleur à vapeur de mercure haute pression HBO 200, soit avec un microscope Leitz équipé d'une lampe HBO 200.

III.2.1.4. AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE LA MICROMETHODE.

Si la préparation des lames est longue et minutieuse, la microméthode permet par contre de titrer simultanément un sérum vis-à-vis d'une dizaine d'antigènes d'où une économie de sérum. Ceci est particulièrement appréciable lorsqu'on étudie la courbe d'apparition des anticorps chez un animal de petite taille comme la souris et que l'on ne dispose, pour chaque prélèvement, que d'une quantité minime de sang recueilli par voie rétro-orbitaire à l'aide d'une pipette effilée soigneusement recourbée.

Les quantités d'antigènes déposées sur la lame sont également minimes, aussi peut-on préparer un stock d'antigènes conservés à - 70°C dans de petits tubes Beckman.

Le nombre des antigènes constituant un groupe peut être supérieur à 10, mais il convient alors de réduire le nombre des groupes pour éviter le mélange des sérums.

Il est préférable d'utiliser des lames fraichement préparées, mais leur conservation durant un mois à - 20°C n'altère pas les antigènes.

La lecture est longue, mais relativement aisée lorsqu'on a repéré les antigènes au moyen du fond noir en se guidant avec les traits verticaux et horizontaux. La détermination du titre repose qur la recherche de la dilution limite c'est-à-dire de la dilution de sérum qui donne encore une réaction positive.

Comme la technique habituelle d'immunofluorescence indirecte, cette méthode exige une technique rigoureuse comportant des réactions témoins afin d'éliminer les fluorescences non spécifiques.

III.2.2. IDENTIFICATION DES GERMES.

La détermination s'effectue à l'aide des sérums de référence :

- anti-*Coxiella burneti* de BRATISLAVA
- et anti-*Chlamydia psittaci (ORN)* de COPENHAGUE

dilués au 1/10.

Les antigènes correspondant à chaque souche sont préparés sur oeufs selon des modalités décrites précédemment.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 4.

TABLEAU 4

- IDENTIFICATION DES GERMES PAR LA REACTION D'IMMUNOFLUORESCENCE -

SERUMS / ANTIGENES	ANTI *COXIELLA BURNETI*	ANTI *CHLAMYDIA PSITTACI*
Oeuf normal	-	-
Souche Roumaine	+ + +	-
Souche Richard	+	-
Souche Loth	-	+ + +
Souche T 13	-	+ + +
Souche Q 18	-	+ + +
Souche D 41	-	+ +
Souche MRC 4	-	+ +
Avortement de vache	+	+

BUS LILLE

Les résultats sont superposables à ceux obtenus par la réaction de fixation du complément. En outre, l'immunofluorescence met en évidence une relation antigénique de groupe entre l'agent de la conjonctivite à inclusions et ceux de l'ornithose, de la psittacose et de l'avortement de la brebis. Elle démontre que la souche d'avortement de la vache est effectivement un mélange de *Coxiella burneti* et de *Chlamydia psittaci*.

III.2.3. TENTATIVE DE TYPAGE DES SOUCHES DE CHLAMYDIA PSITTACI.

Depuis 1970, le typage des souches de *Chlamydia trachomatis* est réalisé dans les laboratoires spécialisés de SEATTLE, de SAN FRANCISCO et de LONDRES. Parallèlement à ces travaux, nous avons entrepris le typage des souches de *Chlamydia psittaci*, avec l'aide de l'OMS. La technique de choix est la microméthode en immunofluorescence indirecte qui se prête particulièrement bien à l'étude des parentés immunologiques pouvant exister entre divers antigènes ainsi qu'au typage des souches.

III.2.3.1. PREPARATION DES ANTIGENES POUR L'IMMUNISATION DES ANIMAUX.

Les antigènes peuvent être préparés soit à partir de sacs vitellins dilués au 1/100ème, soit à partir de cultures cellulaires. Nous utilisons alors le surnageant obtenu après la première centrifugation.

L'injection de sacs vitellins infectés aux animaux de laboratoire entraîne chez ces derniers la production d'anticorps anti-oeuf qui gênent la lecture en immunofluorescence. Les sérums doivent donc être absorbés avant d'être utilisés. Ces inconvénients disparaissent lorsqu'on utilise un antigène préparé sur cultures cellulaires.

III.2.3.2. ESSAIS D'OBTENTION DE SERUMS IMMUNS MONOSPECIFIQUES UTILISABLES POUR LE TYPAGE DES SOUCHES.

Le typage des souches de *Chlamydia trachomatis* étant réalisé par inoculation à la souris de 0,5 ml d'une suspension de sac vitellin infecté, dilué au 1/100ème, par voie intraveineuse à raison de deux injections à 7 jours d'intervalle et prélèvement au 11ème jour, nous nous sommes donc d'abord adressés à la souris blanche.

a- Résultats obtenus chez la souris :

Des lots de 5 souris de race "*Swiss*" âgées de 2 mois ont reçu par voie intraveineuse 0,5 ml d'une suspension antigénique préparée sur oeufs et diluée au 1/100ème, à J 0, J 7 et J 14.

Les prélèvements de sang ont eu lieu à J 4 et J 18.

Les souches Loth et Q 18 ont été utilisées.

Nous avons noté l'absence d'anticorps dans les sérums dilués au 1/4ème vis-à-vis des antigènes homologues.

Par voie intrapéritonéale, les souches Loth et T 13 entraînent la mort de la souris ; cette voie ne peut donc être utilisée.

Devant ces résultats négatifs, nous nous sommes adressés dans un second temps au lapin.

b- Résultats obtenus chez le lapin :

- *Avec la souche Q 18*

Les lapins ont reçu 3 injections de 5 ml d'une suspension antigénique préparée sur oeufs et diluée au 1/100ème, par voie intraveineuse à J 0, J 7 et J 14.

Les prélèvements sanguins ont été effectués à J 4 puis à J 15, J 16, J 17, J 18, J 19, J 20 et J 21.

Les réponses sont consignées dans le tableau 5 (à noter que les dilutions de sérum ont été effectuées à partir du 1/32ème).

TABLEAU 5

- TYPAGE DE LA SOUCHE Q 18 CHEZ LE LAPIN -

Ag	T 44	UW3	LOTH	T 13	Q 18	D 41	Souche Roumaine	Avt. de vache	TEMOIN Oeuf
J 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J 15	-	-	-	-	32	-	-	32	-
J 16	-	-	-	-	64	32	-	32	-
J 17	-	-	-	-	128	64	-	64	-
J 18	-	-	-	-	128	64	-	64	-
J 19	-	-	-	-	128	64	-	64	-
J 20	-	-	-	-	128	64	-	64	-
J 21	-	-	32	-	256	128	-	128	-

BUS LILLE

- *Avec les souches Loth et T 13*

Les réponses obtenues avec la souche Q 18 n'étant pas monospécifiques, nous avons essayé la voie intradermique avec les souches Loth et T 13 : une inoculation de 1 ml d'antigène oeuf dilué au 1/100ème.

Les lapins sont morts en une dizaine de jours sans que l'on n'ait recueilli de sang.

Le lapin ne constitue pas non plus l'animal de choix pour une telle immunisation puisque les souches d'origine aviaire entraîne sa mort. Toutefois, une réponse anticorps a été enregistrée avec la souche Q 18. Cette réponse prédominante vis-à-vis de l'antigène Q 18 se retrouve à des taux légèrement moindres pour un autre antigène d'avortement de la brebis (D 41) et pour la souche d'avortement de vache dont nous savons qu'elle est un mélange de *Chlamydiae* et de *Coxiella burneti*.

c- Résultats obtenus chez le rat blanc :

- *Avec la souche Loth*

Une injection unique de 0,5 ml d'antigène oeuf dilué au 1/100ème par voie intrapéritonéale à un lot de 5 rats entraîne la production d'anticorps anti-vitellus qui rendent la lecture impossible.

C'est la raison pour laquelle nous préférons l'injection d'antigènes préparés sur cultures cellulaires : 1 injection de 0,5 ml d'antigènes cellulaires par voie intrapéritonéale à un lot de 5 rats.

Les résultats sont regroupés dans le tableau 6.

TABLEAU 6

- TYPAGE DE LA SOUCHE LOTH CHEZ LE RAT -

Ag / Rat	LOTH	T 13	Q 18	UW3	TEMOIN	LOTH	T 13	Q 18	UW3	TEMOIN
	J 8					J 15				
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	J 23					J 35				
1	16	-	-	-	-	512	-	128	-	-
2	16	-	-	-	-	256	-	128	-	-
3	NT	NT	NT	NT	NT	512	-	128	-	-
4	NT	NT	NT	NT	NT	256	-	?	-	-
5	NT	NT	NT	NT	NT	64	-	?	-	-
	J 49					J 67				
1	256	-	32	-	-	256	-	32	-	-
2	512	-	32	-	-	256	-	32	-	-
3	256	-	128	-	-	PAS DE SERUM°				
4	256	-	64	-	-	128	-	32	-	-
5	256	-	32	-	-	PAS DE SERUM°				

(°) Les traumatismes causés par des ponctions rétro-orbitaires répétées rendent quelquefois impossibles de nouveaux prélèvements sanguins.

BUS LILLE

- *Avec la souche T 13*

* Inoculation de 1,5 ml d'antigène cellulaire par voie intrapéritonéale à un lot de 3 rats.

Les prélèvements ont été réalisés à J 16 et J 42. Les résultats sont rapportés dans le tableau 7.

TABLEAU 7

TYPAGE DE LA SOUCHE T 13 CHEZ LE RAT BLANC
APRES UNE INOCULATION INTRA-PERITONEALE

	J 16						J 30					
Ag / Rat	T 13	LOTH	Q 18	MRC4	UW3	TEMOIN	T 13	LOTH	Q 18	MRC4	UW3	TEMOIN
1	-	16	8	NT	-	-	32	64	32	32	-	-
2	-	32	16	NT	-	-	32	64	16	32	-	-
3	-	16	16	NT	-	-	64	32	32	16	-	-

BUS LILLE

• Réinoculation au 63ème jour avec 0,5 ml d'antigène cellulaire par voie intrapéritonéale.

Les prélèvements ont eu lieu 12 et 42 jours après la réinoculation (J' 12 et J' 42).

TABLEAU 8

TYPAGE DE LA SOUCHE T 13 CHEZ LE RAT BLANC

APRES REINOCULATION AU 63ème JOUR

	J' 12						J' 42					
Ag / Rat	T 13	LOTH	Q 18	MRC4	UW3	TEMOIN	T 13	LOTH	Q 18	MRC4	UW3	TEMOIN
1	PAS DE SERUM						PAS DE SERUM					
2	512	512	128	512	-	-	512	128	128	128	-	-
3	1024	1024	64	256	-	-	256	64	64	64	-	-

BUS

* Inoculation par voie intrapéritonéale de 1 ml d'un mélange à parties égales d'antigène cellulaire et d'adjuvant incomplet de Freund.

Les prélèvements ont été effectués à J 12 et J 42.

TABLEAU 9

TYPAGE DE LA SOUCHE T 13 CHEZ LE RAT

APRES INOCULATION PAR VOIE INTRAPERITONEALE AVEC ADJUVANT INCOMPLET DE FREUND

	J 12						J 42					
Rat \ Ag	T 13	LOTH	Q18	MRC4	UW3	TEMOIN	T 13	LOTH	Q18	MRC4	UW3	TEMOIN
4	128	128	128	128	-	-	128	64	32	64	-	-
5	32	16	32	16	-	-	128	32	64	16	-	-
6	64	64	32	64	-	-	512	256	64	128	-	-

BUS LILLE

* Inoculation par voie intradermique de 1 ml d'un mélange à parties égales d'antigène cellulaire et d'adjuvant incomplet de Freund.

Les prélèvements ont eu lieu à J 12 et J 42.

TABLEAU 10

TYPAGE DE LA SOUCHE T 13 CHEZ LE RAT

APRES INOCULATION INTRADERMIQUE AVEC ADJUVANT

	J 12						J 42					
Ag / Rat	T 13	LOTH	Q 18	MRC4	UW3	TEMOIN	T 13	LOTH	Q 18	MRC4	UW3	TEMOIN
7	64	64	64	64	-	-	64	32	32	32	-	-
8	1024	512	512	1024	-	-	128	64	64	64	-	-
9	64	32	16	64	-	-	16	-	8	-	-	-

BDS LILLE

* Inoculation de 0,5 ml d'antigène cellulaire par voie intraveineuse.

Les prélèvements ont été réalisés à J 12 et J 42.

TABLEAU 11

TYPAGE DE LA SOUCHE T 13 CHEZ LE RAT

APRES INJECTION INTRAVEINEUSE

	J 12						J 42					
Ag / Rat	T 13	LOTH	Q 18	MRC4	UW 3	TEMOIN	T 13	LOTH	Q 18	MRC4	UW 3	TEMOIN
10	128	64	32	64	-	-	256	64	64	4	-	-
11	128	128	64	128	-	-	128	64	16	64	-	-
12	256	256	256	512	-	-	64	16	16	32	-	-

BUS LILLE

III.2.3.3. CONCLUSION.

Le rat blanc semble être l'animal satisfaisant pour l'étude immunologique des souches de *Chlamydia psittaci.*

- par sa résistance à l'infection qui permet l'utilisation d'antigènes vivants.
- par sa production d'anticorps anti-*Chlamydia* à des taux élevés.

La réponse est tardive par voie intrapéritonéale. La voie intraveineuse donne de bons résultats dès le 12ème jour, mais pour des raisons pratiques nous ne la retiendrons pas. La voie intradermique avec adjuvant est également satisfaisante ; plus commode que la précédente, c'est elle que nous préférons.

La réponse anticorps prédomine pour l'antigène homologue mais on la retrouve pour d'autres souches de *Chlamydia psittaci* et également pour la souche MRC 4. Ceci semblerait prouver qu'une réponse monospécifique est plus ou moins rapidement suivie par l'apparition d'anticorps hétérospécifiques. La distinction immunologique entre *Chlamydia trachomatis* et *Chlamydia psittaci* n'est peut-être pas aussi nette que certains auteurs semblent le penser (*121*). D'ailleurs, des tests de protection croisée chez la souris avec la souche MRC 4 vis-à-vis de la souche virulente Loth de *Chlamydia psittaci* semblent donner des résultats satisfaisants (travaux en cours au laboratoire).

La réponse rapidement hétérospécifique obtenue avec les souches de *Chlamydia psittaci* ne nous permet pas de donner encore un schéma d'immunisation pour l'obtention d'anticorps monospécifiques. Cette difficulté

ne semble pas se rencontrer avec les souches de *Chlamydia trachomatis*. Ces résultats permettent de penser que la structure des éléments de *Chlamydia psittaci* est plus complexe que celle de *Chlamydia trachomatis*.

Les schémas d'immunisation concernant les souches de *Chlamydia psittaci* ainsi que les souches Roumaine, Richard, Avortement de vache et MRC 4 sont récapitulés dans le tableau 12.

TABLEAU 12

- OBTENTION DES SERUMS IMMUNS A PARTIR DES SOUCHES ETUDIEES -

SOUCHES	ANIMAL HOTE	VOIE D'ADMINISTRATION	DOSE	MODE D'ADMINISTRATION
Roumaine	souris	IV	0,2 ml d'antigène oeuf en 1/100	2 injections à 7 j d'intervalle
Q 18	lapin	IV	5 ml d'antigène oeuf au 1/100	3 injections à 7 j d'intervalle
Avortement de vache	lapin	ID	1 ml d'antigène oeuf au 1/100	1 injection
Richard	rat	IP	1 ml d'antigène oeuf au 1/10	1 injection
Loth	rat	IP	0,5 ml d'antigène cellulaire	1 injection
T 13	rat	IP	1,5 ml d'antigène cellulaire	Réinoculation tardive avec 0,5 ml
		IP et ID	1 ml d'antigène cellulaire + adjuvant incomplet de Freund V/V	1 injection
		IV	0,5 ml d'antigène cellulaire	1 injection
MRC 4	rat	IP	1 ml d'antigène cellulaire	1 injection

C H A P I T R E I V

D I S C U S S I O N

∘ ∘
∘

IV.1. DIFFERENCIATION DES RICKETTSIES ET DES CHLAMYDIAE.

Les rickettsioses se sont longtemps limitées au typhus épidémique. Elles se sont ensuite étendues aux autres fièvres typho-exanthématiques, aux fièvres boutonneuses et à la fièvre Q. Elles s'élargissent aujourd'hui encore à de multiples syndromes vasculaires, nerveux, viscéraux et obstétricaux selon les conceptions de *GIROUD (50, 51)*. Contrairement à ce que pensent beaucoup de cliniciens, les rickettsioses ne sont pas des maladies du passé. Elles s'enrichissent du fait des connaissances modernes et des conditions de transmission d'affections plus ou moins décapitées ou inapparentes transmises à l'homme par des animaux ou certains parasites et dont le diagnostic étiologique n'est affirmé que par des réactions sérologiques.

Quant aux affections causées par les membres du genre *Chlamydia* — communément appelées par certains "bedsonioses" — elles paraissent se développer avec la même ampleur. Elles groupent également de multiples zoono-anthroponoses qui atteignent les oiseaux, le bétail et l'homme. Sur le plan clinique, elles s'accompagnent ou non d'éruption et se localisent avec prédilection à l'appareil pulmonaire, aux muqueuses oculaires et génitales et aux séreuses articulaires (*49, 50, 51*).

Les rickettsioses, à l'exception de la fièvre Q, sont transmises par l'intermédiaire d'arthropodes. Les infections à *Chlamydiae*, par contre, ne le sont pas bien que l'on ait signalé la présence de *Chlamydiae* chez certains acariens (*52*) et chez la puce de la dinde (*72*).

Du point de vue anatomo-pathologique les rickettsies et les *Chlamydiae* présentent un tropisme angiopathique évident. L'endothélium capillaire est lésé et l'on retrouve une vascularite proliférative (*50*).

Le contexte épidémiologique peut, si l'on n'en prend garde, conduire à des erreurs d'identification du germe responsable d'une affection donnée. La tentation est grande, en effet, de poser un diagnostic de psittacose quand un oiseau de la famille des psittacidés est atteint d'une infection digestive aiguë avec diarrhée et mort rapide ou d'une infection pulmonaire d'évolution subaiguë et que le germe isolé chez cet oiseau malade possède les caractères d'une rickettsiale. De même on posera le diagnostic d'ornithose devant un pigeon malade. Cependant on devrait avoir présent à l'esprit que *Coxiella burneti* est également capable de provoquer une maladie chez l'oiseau. Les mêmes problèmes se posent devant un avortement chez les ovins et les bovins. Les *Chlamydiae* et les *Coxiella* peuvent être responsables de ce syndrome.

Il est donc évident que l'épidémiologie n'est pas un facteur suffisant d'identification. Sur quoi, en définitive, repose cette identification ? Tous les bactériologistes sont unanimes sur la valeur de l'isolement d'une souche à partir d'un produit pathologique. Dans le cas des *Rickettsiales* qui, comme les virus, nécessitent la culture de tissus, les interprétations d'un isolement devront se faire avec beaucoup de circonspection. Il faudra être sûr que l'isolement a été réalisé dans des conditions de stérilité en évitant toute contamination par des souches apparentées, conservées au laboratoire. Des passages continus sont indispensables pour affirmer la pureté de la souche isolée. Les isolements réalisés chez la souris doivent être systématiquement doublés par des

passages sur oeufs embryonnés pour enlever le doute d'une infection spontanée des rongeurs avec ces germes. L'oeuf embryonné dont les annexes embryonnaires sont sensibles à ces agents représente le milieu de culture stérile idéal. Mais il faut s'entourer de certaines précautions et s'assurer que l'alimentation des pondeuses ne contient pas d'antibiotiques susceptibles d'inhiber le développement des germes.

Si la coloration des frottis de membrane vitelline par le Macchiavello permet théoriquement de distinguer des espèces rickettsiennes Macchiavello positif qui gardent la fuchsine après différenciation par l'acide citrique comme *Rickettsia conori* et *Coxiella burneti* et des espèces rickettsiennes Macchiavello négatif recolorées par le bleu de méthylène comme *Rickettsia orientalis*, il existe tout un groupe intermédiaire d'espèces habituellement Macchiavello positif mais pouvant être Macchiavello négatif comprenant *Rickettsia prowazeki* et *Rickettsia mooseri*, ainsi que les agents de la psittacose *(102)*.Ces différences sont encore moins frappantes avec la coloration de Castaneda.

L'inoculation à l'oeuf, si elle constitue un excellent procédé d'isolement, est par contre insuffisante pour une identification précise car les affinités tinctoriales des rickettsies et des *Chlamydiae* ne sont pas suffisamment différenciées. D'autre part, il ne faut pas oublier que la lecture d'un frottis de membrane vitelline, même lavée, est toujours difficile et délicate d'interprétation à cause des petits globules de vitellus qui peuvent parfois prêter à confusion.

Il est donc nécessaire d'adjoindre des études sérologiques :

- l'antigène préparé en oeuf à partir de la souche inconnue sera identifié vis-à-vis de sérums de référence.

- l'anticorps préparé expérimentalement chez l'animal sera testé vis-à-vis d'antigènes de référence.

- le sérum prélevé chez le sujet interviendra également lors de cette dernière réaction et pourra apporter un élément complémentaire.

En France, c'est le plus souvent la micro-agglutination de *GIROUD* qui est utilisée pour le diagnostic des rickettsioses et des "néorickettsioses".

Les Anglo-Saxons préfèrent la réaction de fixation du complément. Bien que moins sensible et moins spécifique que la réaction précédente, elle a l'avantage d'utiliser un antigène chauffé qui se conserve mieux. Elle semble plus reproductible.

Enfin, la réaction d'immunofluorescence indirecte est une bonne méthode, mais la lecture est parfois difficile.

Ces tests indirects permettent de différencier les genres *Rickettsia, Coxiella* et *Chlamydia* qui antigéniquement sont complètement différents.

Ces quelques réflexions sur la valeur d'un isolement et de l'immun-sérum spécifique correspondant nous ont été suggérées par l'étude des trois souches suivantes :

- la souche Roumaine isolée à partir d'un perroquet mort avait été étiquetée "psittacose" non seulement parce qu'elle provenait d'un oiseau de la famille des psittacidés, mais encore parce qu'elle réagissait positivement avec un sérum anti-ornithose préparé sur coq.

En fait, lorsque pour la première fois nous avons passé cette souche sur cellules KB, nous avons été étonné de découvrir des différences marquées par rapport à la souche Loth d'ornithose que nous connaissions bien au laboratoire *(89)*, sans pour autant revenir sur l'identification de la souche *(36)*. Ces différences concernent l'aspect de la vacuole, la morphologie des corps qu'elle contient et leurs affinités tinctoriales au Giemsa, l'étude dynamique et la croissance du germe considéré. Dans un deuxième temps, l'examen au microscope électronique de cellules L infectées avec cet agent a révélé la présence de grandes vacuoles intracytoplasmiques contenant des corps allongés en forme de petits bâtonnets d'une taille variant de *0,450 µm* à *1,5 µm* de longueur sur *0,2 µm* à *0,4 µm* de largeur et l'absence de corps typiquement chlamydiens. Cet examen confirmait donc nos doutes quant à la notion chlamydienne de l'agent isolé. Enfin, l'adjonction de réactions sérologiques utilisant des antigènes et des sérums de référence fournis par le laboratoire O.M.S. de BRATISLAVA a établi de façon indiscutable l'identité de la souche qui appartient finalement à l'espèce *Coxiella burneti*. Cet exemple illustre concrètement les difficultés d'étude des Rickettsiales et les précautions dont on doit s'entourer.

- En ce qui concerne la souche Richard que nous avons nous mêmes isolée sur oeufs à partir d'une poulette, la clinique et le contexte épidémiologique étaient encore plus trompeurs. L'éleveuse avait en effet présenté quelque temps auparavant un syndrome pulmonaire fébrile. Aucun germe banal n'avait été isolé des crachats, mais la réaction de fixation du complément effectuée à deux reprises à 15 jours d'intervalle vis-à-vis de l'antigène ornithose de l'Institut Pasteur montrait un titre d'anticorps de 1/32ème. On pouvait donc penser que Madame R... s'était contaminée au contact de ses poules dont plusieurs présentaient de la diarrhée

et boitaient. Pourtant, la morphologie de l'agent isolé de l'oro-pharynx de poule, ses caractères en culture cellulaire et ses relations antigéniques avec des souches de référence font de lui une souche de *Coxiella burneti*. La recherche *à posteriori* d'anticorps anti-*Coxiella burneti* dans le sérum de Madame R... par la réaction de fixation du complément avec un antigène de l'Institut Pasteur s'est révélée négative. Il semble donc ne pas y avoir de rapport entre la maladie de Madame R... et le germe isolé chez sa poule.

- Quant à la souche d'Avortement de vache, notre attention a d'abord été attirée par l'incohérence des réactions sérologiques : il existait en effet, avec les sérums que nous avions préparés par injection intradermique chez le lapin, des réactions croisées entre *Coxiella burneti* et certaines souches de *Chlamydiae*. L'explication en a été fournie lorsqu'en culture cellulaire nous avons mis en évidence, dans des cellules voisines et parfois dans la même cellule, des vacuoles type *Coxiella burneti* et des inclusions type *Chlamydia*. Cette souche est donc en réalité un mélange. Les *Coxiella* et les *Chlamydia* pouvant être toutes deux responsables d'avortement chez les bovins, il est *à priori* difficile de savoir si les deux souches ont été effectivement isolées à partir du même produit pathologique ou au contraire si l'une a contaminé l'autre. Toutefois, en raison de la résistance extraordinaire de *Coxiella burneti* aux agents physiques et chimiques, de sa transmission remarquable par aérosols, de son caractère ubiquitaire, des précautions extraordinaires dont il faut s'entourer lorsqu'on manipule une telle souche au laboratoire, on peut émettre l'hypothèse que la souche initialement isolée appartenait au genre *Chlamydia* et qu'en raison de la manipulation parallèle d'une souche de *Coxiella*, il y a eu contamination de la première par la seconde.

et boitaient. Pourtant, la morphologie de l'agent isolé de l'oro-pharynx de poule, ses caractères en culture cellulaire et ses relations antigéniques avec des souches de référence font de lui une souche de *Coxiella burneti*. La recherche *à posteriori* d'anticorps anti-*Coxiella burneti* dans le sérum de Madame R... par la réaction de fixation du complément avec un antigène de l'Institut Pasteur s'est révélée négative. Il semble donc ne pas y avoir de rapport entre la maladie de Madame R... et le germe isolé chez sa poule.

- Quant à la souche d'Avortement de vache, notre attention a d'abord été attirée par l'incohérence des réactions sérologiques : il existait en effet, avec les sérums que nous avions préparés par injection intradermique chez le lapin, des réactions croisées entre *Coxiella burneti* et certaines souches de *Chlamydiae*. L'explication en a été fournie lorsqu'en culture cellulaire nous avons mis en évidence, dans des cellules voisines et parfois dans la même cellule, des vacuoles type *Coxiella burneti* et des inclusions type *Chlamydia*. Cette souche est donc en réalité un mélange. Les *Coxiella* et les *Chlamydia* pouvant être toutes deux responsables d'avortement chez les bovins, il est *à priori* difficile de savoir si les deux souches ont été effectivement isolées à partir du même produit pathologique ou au contraire si l'une a contaminé l'autre. Toutefois, en raison de la résistance extraordinaire de *Coxiella burneti* aux agents physiques et chimiques, de sa transmission remarquable par aérosols, de son caractère ubiquitaire, des précautions extraordinaires dont il faut s'entourer lorsqu'on manipule une telle souche au laboratoire, on peut émettre l'hypothèse que la souche initialement isolée appartenait au genre *Chlamydia* et qu'en raison de la manipulation parallèle d'une souche de *Coxiella*, il y a eu contamination de la première par la seconde.

A travers ces exemples il nous paraît donc indispensable d'adapter sur cellules les différents isolements réalisés sur oeufs embryonnés dans un premier temps. Encore faut-il pouvoir cultiver ces souches en cultures cellulaires, ce qui n'est pas toujours possible en particulier avec certaines souches de *Chlamydia trachomatis*. Néanmoins la culture sur cellules Mac Coy irradiées associée à la centrifugation *(25)* ou la culture sur cellules HeLa 229 traitées avec le DEAE Dextran *(64)* ont permis de réaliser des progrès certains dans ce domaine.

Les inclusions de type *Chlamydia* et les vacuoles de type *Coxiella* sont généralement si caractéristiques que cette étude morphologique en microscopie optique apporte indiscutablement plus d'éléments d'identification que ne peut le faire l'examen des frottis de membrane vitelline. Il existe bien sûr des aspects intermédiaires qui peuvent induire en erreur lorsque l'on ne travaille que sur l'un des types rickettsien ou chlamydien, mais l'examen attentif de l'ensemble de la lamelle permet de reconnaître les éléments caractéristiques de l'un ou l'autre type.

L'adjonction des réactions sérologiques permet alors d'établir de façon indiscutable la nature de l'agent.

L'étude du pouvoir pathogène expérimental, chez la souris notamment, n'a que peu de valeur étant donné les différences observées pour une même souche.

Enfin, dans tous ces cas, la microscopie électronique a confirmé nos présomptions et nous renforce dans l'idée que l'examen des souches en culture cellulaire au microscope optique est d'un intérêt majeur et une méthode d'identification fiable.

IV.2. GENRE COXIELLA.

Le genre *Coxiella* ne comporte qu'une seule espèce *Coxiella burneti*, agent de la fièvre Q ou maladie de *DERRICK* et *BURNET*. Plusieurs caractères permettent de différencier les genres *Rickettsia* et *Coxiella* *(91)*.

IV.2.1. CARACTERES DISTINCTIFS DES GENRES RICKETTSIA ET COXIELLA.

- Plus petite que les membres du genre *Rickettsia (0,2 à 0,4 µm* de large sur *1 µm* de long contre *0,3 à 0,5 µm* de large sur *2 à 4 µm* de long), *Coxiella burneti* se conduit aussi différemment par rapport aux autres rickettsies par sa coloration de Gram. Lorsque l'on utilise l'iode alcoolique comme mordant à la place de l'iode aqueux, *Coxiella burneti* se colore comme une bactérie à Gram positif alors que quatre espèces du genre *Rickettsia* sont Gram négatif *(48)*. D'autre part, toutes les espèces de *Rickettsia* pathogènes libèrent, comme les bactéries à Gram négatif, un antigène "soluble" ; *Coxiella burneti* ne le fait pas.

- A la différence des espèces du genre *Rickettsia*, *Coxiella burneti* est remarquablement résistante aux agents physiques et chimiques *(90)*.

- Si sa transmission par une variété de tiques est indiscutable, sa transmission directe et efficace d'animal à animal par aérosols *(90)* explique sa dissémination mondiale. Par ce caractère, elle se distingue des rickettsies vraies qui ne se transmettent que par l'intermédiaire d'arthropodes vecteurs : puces, poux ou tiques.

- Les espèces du genre *Rickettsia*, à l'exception de *Rickettsia akari* et de *Rickettsia australia*, causent une mort aiguë toxique chez la souris lorsque des suspensions suffisamment concentrées sont inoculées par voie intraveineuse. Cette observation est à la base du test de neutralisation de la toxine qui a eu une valeur dans la détermination des parentés antigéniques. *Coxiella burneti* ne produit pas cette réaction *(in 91)*.

- Dans les infections expérimentales d'embryons de poulet, *Coxiella burneti* résiste aux antibiotiques qui inhibent normalement la croissance des membres du genre *Rickettsia (90)*. Sa croissance peut être inhibée par les tétracyclines ; elle n'est que légèrement affectée par le chloramphénicol et l'érythromycine, deux antibiotiques actifs contre les rickettsies du groupe du typhus et du groupe de la fièvre pourprée.

- Du point de vue biochimique si la première source d'énergie paraît être le pyruvate pour *Coxiella burneti (92)*, le glutamate représente la source majeure d'énergie chez toutes espèces du genre *Rickettsia* qui ont été étudiées *(in 91, 124)*.

- Quant à la composition en bases de l'ADN de *Coxiella burneti (108)*, elle est très différente de celle de *Rickettsia prowazeki*. Le rapport A + T/G + C est de 1,33 pour *Coxiella burneti* et de 2,08 pour *Rickettsia prowazeki*. Une telle différence n'indique qu'un faible degré de parenté entre ces deux espèces *(in 91)*.

- Sur le plan immunologique, il n'existe aucune parenté antigénique entre les genres *Rickettsia* et *Coxiella (91)*. Les antigènes immunisant de *Coxiella burneti* sont extraordinairement résistants à la chaleur contrairement à ceux des autres rickettsies. D'autre part, *Coxiella burneti* est unique parmi les rickettsies par sa variation

de phase antigénique *(41)*. Dans la nature, on ne trouve que *Coxiella burneti* phase I ; au laboratoire par contre, les passages sur oeufs embryonnés produisent la phase II qui peut être reconvertie en phase I par passages ultérieurs chez les animaux de laboratoire. Des changements de comportement vis-à-vis des solvants organiques et des agents oxydants, de la réponse de la cellule-hôte accompagnent la conversion d'une phase à l'autre, mais aucune modification morphologique n'a été mise en évidence *(84)*.

IV.2.2. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DE COXIELLA BURNETI.

Dans leurs descriptions des rickettsies, *DAVIS et COX* en *1938*, *COX et BELL* en *1939* ont décrit la nature pléomorphique de *Coxiella burneti* qui passe ordinairement les filtres bactériologiques. En microscopie optique, ils observèrent de minuscules formes coccoïdes et granulaires ainsi que des formes bacillaires dans les cellules de cobayes infectés et en cultures cellulaires *(in 2)*.

L'étude en microscopie électronique de *Coxiella burneti* a déjà fait l'objet de nombreuses publications *(2, 21, 55, 84, 103, 110)*. Celles-ci ont montré l'existence :

- d'une paroi composée d'un feuillet sombre extérieur de 30 Å d'épaisseur, d'un feuillet clair de 25 Å d'épaisseur et d'un second feuillet sombre de 45 Å d'épaisseur *(84)*. *ANACKER* et coll. *(2)* ont individualisé un feuillet sombre supplémentaire. Cette paroi ressemble, du point de vue de la structure, à celle des bactéries à Gram négatif. Par ailleurs, du point de vue de la composition chimique, elle est lysée par le lysozyme *(1)* qui est connu pour agir sur l'acide muramique, constituant clé

du mucopeptide des parois des bactéries à Gram négatif. Un autre constituant des parois des bactéries à Gram négatif, l'acide diaminopimélique a été trouvé dans les parois de *Coxiella burneti* et d'autres rickettsies *(82)*. Malgré ces résultats, *Coxiella burneti* possède quelques unes des propriétés des bactéries à Gram positif. Nous en avons déjà vu une à propos de la coloration de Gram par l'utilisation d'iode alcoolique à la place d'iode aqueux. La seconde est l'inefficacité du lauryl sulfate de sodium chaud dans la purification et l'isolement de *Coxiella burneti* alors que le formamide chaud provoque une destruction complète des parois de cet agent *(91)*.

- d'une membrane protoplasmique ayant la structure typique de la "unit membrane" des bactéries.

- de particules de 70 à 200 Å de diamètre ressemblant à des ribosomes, dans une substance de fond de densité intermédiaire.

- d'un corps fibreux central constitué de fibrilles d'ADN. L'existence d'un corps dense central avec des fibrilles radiées connectées aux ribosomes a été démontrée par l'utilisation de la technique à l'indium.

ROSENBERG et KORDOVA (103), ont trouvé des "formes intermédiaires" étroitement associées aux rickettsies matures. Ces formes diffèrent par leur densité, leur taille et leur structure.

Récemment, deux types morphologiques distincts de *Coxiella burneti* en phase I ont été séparés en gradients de sucrose *(126)*:

- de petites cellules compactes et allongées avec des nucléoïdes très denses.

- des cellules plus grandes, plus rondes, plus pléomorphiques dont les filaments du nucléoïde sont dispersés.

Pour ces auteurs, les petites cellules allongées isolées dans la bande supérieure du gradient seraient des cellules "normales" alors que les grandes cellules trouvées dans la bande inférieure seraient des formes partiellement dégradées par la cellule-hôte. Toutes deux infectent l'embryon de poulet et le tuent. Elles sont par ailleurs indépendantes du phénomène de phase antigénique *(126)*.

NERMUT et coll. ont également trouvé deux types morphologiques distincts et considèrent les cellules rondes comme des formes dégénérées car leur perméabilité à l'acide phosphotungstique augmente. Ces formes dégénérées conserveraient toutefois leur activité biologique *(84)*.

Nos résultats ne permettent pas d'individualiser deux populations bactériennes. La comparaison des résultats obtenus est difficile car les techniques utilisées ne sont pas identiques. *ANACKER* et coll. par exemple, travaillent sur oeufs embryonnés et incluent leur matériel dans le Maraglas ou le méthacrylate *(2)* tandis que *WIEBE* et coll. *(126)* travaillent sur des pellets purifiés et emploient comme nous la double fixation et l'Epon. Nous avons de notre côté effectué toutes les opérations de fixation, de déshydratation et d'inclusion directement sur les lamelles de cultures cellulaires. Ces procédés techniques différents d'une équipe à l'autre expliquent probablement pour une grande part les divergences dans les observations.

A propos de la description de types morphologiques distincts, certains auteurs *(103, 126)* avancent l'hypothèse d'un cycle de développement chez *Coxiella burneti* comparable, mais non identique, à celui observé chez les *Chlamydiae*. Une telle hypothèse nous paraît actuellement difficilement soutenable. Du point de vue de la structure tout d'abord, nous n'avons pas trouvé d'analogie entre les différentes formes décrites pour *Coxiella* — qui ne sont que les témoins d'un grand polymorphisme — et les trois formes maintenant classiques des *Chlamydiae* observées dans les mêmes conditions de préparation, de fixation et d'inclusion que sont les corps élémentaires, les corps initiaux et les corps intermédiaires.

Une autre différence existe du point de vue de l'infectiosité : chez *Coxiella burneti* les grandes formes sont infectieuses *(126)* alors que celles des *Chlamydiae* ne le sont pas. Chez les *Chlamydiae* en effet, seuls les corps élémentaires sont infectieux *(45)*.

La division binaire paraît être un mode important, sinon le seul, de multiplication de *Coxiella burneti*.

IV.2.3. LA VACUOLE CHEZ LES RICKETTSIACEAE.

A l'exception de *Rocholimea quintana* qui peut cultiver sur milieu artificiel *(57, 83)*, les rickettsies partagent une caractéristique commune, celle d'être des parasites intracellulaires. Leur localisation est soit intracytoplasmique, soit plus rarement nucléaire comme c'est le cas pour *Rickettsia rickettsi (3, 20)*, chez *Rickettsia canada (19)* et chez des microorganismes de type rickettsien trouvés chez divers Homoptères *(70)*. Lorsque la localisation est intracytoplasmique, la plupart

des rickettsies étudiées sont libres dans le hyaloplasme *(3, 70, 127)* ; ce dernier présente souvent une zone de "répulsion" autour des micro-organismes ce qui représenterait un caractère rickettsien *(3)*. Toutefois, *Rickettsia sennetsu (3)* et *Coxiella burneti (21, 55)* sont contenues dans des vacuoles de même que certaines *Rickettsiella (29)* et Rickettsies de Lépidoptères *(37)*.

BURTON et coll. *(21)* ont montré que *Coxiella burneti* est initialement adsorbée à la surface des cellules L puis englobées par le cytoplasme de ces cellules et qu'une vacuole de phagocytose est formée à partir de la membrane plasmique de la cellule. Nous avons décrit la confluence de ces multiples petites vacuoles développées autour de chaque élément phagocyté aboutissant à la formation d'une vacuole de grande taille.

Dans un certain nombre de cas, nous avons observé, dans les vacuoles cytoplasmiques des cellules L, des organismes partiellement ou totalement digérés. *MAILLET (70)*, pense qu'il s'agit de vacuoles autolytiques, signe d'une certaine défense cellulaire contre l'intrusion d'organismes infectieux. De plus, il existe une réponse lysosomale des cellules L à la phagocytose de *Coxiella burneti* ; la phosphatase acide et la 5' nucléotidase sont présentes dans les vacuoles contenant *Coxiella burneti (21)*. Ainsi peuvent être expliquées les images de lipophanérose que nous avons observées dans de nombreux cas.

IV.3. GENRE CHLAMYDIA.

De multiples zoono-anthroponoses qui atteignent les oiseaux, le bétail et les hommes sont dues à des microorganismes dont les caractères — morphologie, cycle de développement, antigène de groupe — sont assez particuliers pour qu'ils soient réunis au sein de la famille des *Chlamydiaceae* dans le genre unique : *Chlamydia.*

IV.3.1. RECONNAISSANCE D'UN GENRE UNIQUE DANS LA FAMILLE DES CHLAMYDIACEAE.

Les premiers systèmes de classification proposés pour les *Chlamydiae* utilisaient les affinités tissulaires vis-à-vis de tel hôte ; elles étaient alors considérées comme des critères taxonomiques importants. Cette manière d'aborder le problème est compréhensible si l'on considère que l'on connaissait moins les organismes eux-mêmes que les préjudices qu'ils causaient à leurs hôtes.

MOSHKOVSKY en *1945* souligna la cellule-hôte d'origine et introduisit les termes "mesodermosis" pour la psittacose, la lymphogranulomatose vénérienne et un certain nombre d'autres maladies et "ectodermosis" pour le trachome et les conjonctivites *(in 94)*.

La classification de *RAKE* dans la 6ème édition du Bergey's Manual *(1948)* et dans la 7ème *(1957)* s'appuyait également sur l'affinité tissulaire par rapport à l'hôte de préférence :(tableau 13)

TABLEAU 13

- AFFINITE TISSULAIRE PAR RAPPORT A L'HOTE DE PREFERENCE -

MALADIE	ETIOLOGIE SPECIFIQUE
Trachome	*Chlamydia trachomatis*
Conjonctivite à inclusions	*Chlamydia oculogenitalis*
Lymphogranulomatose vénérienne	*Miyagawanella lymphogranulomatosis*
Psittacose	*Miyagawanella psittaci*
Psittacose chez les oiseaux autres que les Psittacidés	*Miyagawanella ornithosis*
Avortement enzootique des brebis	*Miyagawanella ovis*
Encéphalomyélite sporadique des bovidés	*Miyagawanella pecoris*
Entérite bovine	*Miyagawanella bovis*

La famille a ensuite comporté 4 genres lorsque *LEVADITI* et coll. ont suggéré d'utiliser, en plus du critère expérimental, un critère biologique tout d'abord pour la description des familles et des sous-familles, épidémiologique ensuite pour la séparation de quelques genres. Ainsi les agents associés au trachome appartenaient au genre *CHLAMYDIA*, ceux associés à la lymphogranulomatose vénérienne au genre *MIYAGAWANELLA* ; les agents de la psittacose des oiseaux et de l'homme appartenaient au genre *BEDSONIA* ; enfin, les agents responsables des maladies chez les herbivores domestiques faisaient partie du genre *RAKEIA (67)*.

Ces critères ne sont actuellement plus valables. Lorsque le syndrome clinique n'est pas accessible, *Chlamydia trachomatis*, dans le schéma de *RAKE*, ne peut être distingué au laboratoire ni de *Chlamydia oculogenitalis* ni de *Miyagawanella lymphogranulomatosis*. Si un agent est isolé de l'appareil génital d'une personne présentant une maladie inapparente, il ne peut être attribué avec certitude à une espèce du schéma de *RAKE*, *DUNLOP* et coll. *(32)* ont montré que l'isolement de *Chlamydiae* à partir de l'appareil urogénital ou du rectum et de la conjonctive de sujets présentant une urétrite clinique, une ophtalmie néonatale ou un trachome, étaient microbiologiquement semblables. Dans de tels cas, il est difficile de différencier un agent TRIC d'un agent de la LGV. D'autres exemples illustrent l'inopportunité d'attribuer une désignation d'espèce à une souche présumée être la seule cause d'une maladie particulière. A ce sujet, *SCHACHTER (106)* a rapporté l'isolement d'un organisme pathologiquement, chimiquement et morphologiquement caractéristique des souches normalement obtenues chez les psittacidés, à partir d'un individu porteur de lymphogranulomatose vénérienne. Le sujet avec sa lymphogranulomatose vénérienne clinique était-il infecté par *Miyagawanella lymphogranulomatosis* ou par *Miyagawanella psittaci ?* *PAGE (94)* rapporte également qu'un agent chlamydien impliqué dans un cas d'entérite bovine et dans un cas de psittacose était identique par ses caractères morphologiques et chimiques à une souche fréquemment retrouvée chez les pigeons. Cette souche était cependant totalement différente d'une autre souche qui avait causé des avortements chez les bovins. Est-ce *Miyagawanella psittaci*, *Miyagawanella ornithosis*, *Miyagawanella bovis ou Miyagawanella pecoris* qui infecte les bovins et l'homme ? Par ailleurs, l'homme infecté par la souche bovine souffrait-il de psittacose, d'ornithose ou de "mammalose" ?

Les critères suivants : morphologie, cycle de développement et antigène de groupe commun ont une valeur taxonomique plus grande que les critères précédents et ont été utilisés pour unifier ces microorganismes en un seul genre *Chlamydia (93)*.

IV.3.2. LIMITES DU GENRE CHLAMYDIA. JONES, RAKE et STEARNS (1945).

a- Morphologie, structure et mode de reproduction :

Les organismes constituant le genre *Chlamydia* sont des bactéries immobiles ne prenant pas la coloration de Gram, mais facilement mis en évidence par les colorants basophiles.

Parasites intracellulaires obligatoires, ils se développent selon un cycle complexe, à l'intérieur du cytoplasme de la cellule-hôte. Cette évolution aboutit à la formation d'une véritable "colonie bactérienne": l'inclusion.

Les études ultrastructurales effectuées sur les agents de la méningopneumonie (*38, 45*), de la lymphogranulomatose vénérienne (*7, 34*), du trachome (*8, 56, 75, 76, 77*), de la conjonctivite à inclusions (*35*), de la psittacose (*56, 60*), de l'ornithose (*3, 66, 96*) et de l'avortement de la brebis montrent une grande ressemblance. Au stade final du développement, dans les vacuoles intracytoplasmiques s'observe une population hétérogène comprenant trois types de particules :

- les *corps élémentaires* dont la taille varie de *0,250 à 0,350 µm* de diamètre, limités par un complexe pentalaminaire constitué d'une paroi et d'une membrane cytoplasmique. Ils présentent un nucléoïde dense aux

électrons, excentré, un réseau fibrillaire plus ou moins large et une zone bordante granuleuse constituée par des ribonucléoprotéines. Ils sont généralement sphériques ou de contours plus irréguliers comme nous en avons observés de même que *ERLANDSON* et *ALLEN (38)* pour l'agent de la méningo-pneumonie et *LEPINAY (66)* pour l'agent de l'ornithose avec la fixation de *RYTER* et *KELLENBERGER*.

- les *corps initiaux*, sphériques également, pouvant atteindre *1 µm* de diamètre, limités par deux systèmes membranaires : paroi et membrane cytoplasmique, ne possédant pas de nucléoïde, mais une zone centrale riche en fibrilles et une zone périphérique riche en ribosomes.

- les *corps intermédiaires* de *0,450 à 0,6 µm* environ, limités par une paroi et une membrane plasmique et présentant un nucléoïde central.

Parfois peuvent se rencontrer des corps géants et des formes miniatures issues des corps initiaux par bourgeonnement (*114*).

Au début de l'infection les corps élémentaires pénètrent dans les cellules par phagocytose (*45*). Progressivement ils se transforment en corps initiaux qui se divisent par constriction médiane du cytoplasme. La division continue tandis que les cellules filles diminuent progressivement de taille et acquièrent un nucléoïde pour devenir des corps intermédiaires puis des corps élémentaires, seuls éléments infectieux. Les vacuoles qui constituent les inclusions ou "plaques" vont en fin de cycle libérer leur contenu dans le milieu extérieur, les corps élémentaires pouvant réinfecter d'autres cellules. Certains auteurs avaient suggéré un mode de reproduction différent par formation des corps initiaux à partir d'un précurseur amorphe, la matrice (*112*). Celle-ci est due en fait à des artéfacts et il n'existe pas chez les *Chlamydiaceae* de phase d'éclipse de type viral. Le temps requis pour un cycle complet varie avec les souches et le système hôte-

parasite de 48 à 72 h. L'aspect de l'inclusion qui est soit rigide et compacte soit diffuse dans tout le cytoplasme de la cellule-hôte permet de séparer les organismes en deux groupes.

Nous avons montré que les agents d'origine mammalienne sont comparables par leur structure et leur cycle de développement aux agents d'origine aviaire. Ils sont morphologiquement différents de ceux constituant l'espèce *Néorickettsia helmintheca* : les études récentes de *FRANCK* et coll. (*42, 43*) montrent en effet des corps sphériques dont la structure ressemble à celle des autres rickettsies.

b- Composition chimique et métabolisme :

Les parois de ces microorganismes ont une composition comparable à celle des bactéries à Gram négatif. Par ailleurs, les deux acides nucléiques sont présents à tous les stades du développement ; leur répartition dans les divers corps au cours du cycle de développement n'est pas la même : la quantité d'ARN est plus importante que celle d'ADN dans le corps initial à l'inverse de ce qui se passe pour le corps élémentaire (*113*).

Les *Chlamydiaceae* catabolisent le glucose, mais ce catabolisme n'est pas générateur d'énergie. Le besoin en ATP exogène est une dépendance totale de l'agent vis-à-vis de la cellule-hôte. Ce caractère n'existe jamais à ce degré ni chez les bactéries ni même chez les rickettsies (*79, 80*).

Cette notion de parasitisme obligatoire se manifeste dans la cellule-hôte par une consommation accrue de glucose et une augmentation de la respiration cellulaire (*4, 5*). Le transfert de métabolites à haut rendement énergétique de la cellule-hôte au microorganisme pose le problème de la perméabilité à ces molécules. Le corps initial, particule de synthèse, limité par deux "unit membranes" fines et fragiles, semble posséder de telles propriétés.

Un autre métabolisme, celui du glycogène, n'est pas encore élucidé. Certaines souches de *Chlamydiaceae* entraînent une déviation du métabolisme du glycogène (*39*) et une accumulation de ce dernier à l'intérieur de l'inclusion. Cette particularité a permis de distinguer deux groupes :

- le groupe A comportant les agents qui synthétisent le glycogène et dont l'inclusion est colorée par l'iode et le PAS.
- le groupe B rassemblant les agents iode négatif.

c- Structure antigénique :

De nombreux auteurs ont démontré l'existence d'au moins deux antigènes (*11, 14*). Tous les membres du groupe possèdent un antigène de groupe, thermostable, soluble dans l'éther, extraît par le désoxycholate et la trypsine. Il est résistant aux nucléases et aux protéinases, mais il est détruit par l'iodure de potassium et la lécithinase A (*12, 17, 104*) ce qui suggère une nature lipo-polysaccharidique (*31*). Son existence est démontrée par l'utilisation de techniques sérologiques diverses : fixation du complément (*54, 88, 97*), immunofluorescence, inhibition de l'hémagglutination (*10*), diffusion sur gélose (*24, 100*). La mise en évidence d'un tel antigène contribue indéniablememt à la classification d'un germe dans le genre *Chlamydia*. Nous avons montré que les agents d'origine mammalienne possèdent cet antigène de groupe et ne présentent pas de réaction croisée avec *Coxiella burneti* et *Rickettsia prowazeki*.

Cet antigène de groupe masque les antigènes spécifiques d'espèce.

d- Place et avenir des "Néorickettsies" :

Les agents d'origine mammalienne regroupés par *GIROUD (49)* dans l'espèce *Néorickettsia mundi* et responsables d'affections communément appelées "néorickettsioses" possèdent de par leur structure, leur cycle de développement et leur équipement antigénique, les caractères qui définissent le genre *Chlamydia*. Déjà, en *1968*, *ARMSTRONG (6)* avait écrit l'identité suivante : *PLT — BEDSONIAE — CHLAMYDIAE — NEORICKETTSIAE*. On ne doit donc plus parler des néorickettsies et des néorickettsioses telles qu'elles ont été définies par *GIROUD*, mais de *Chlamydiae*.

IV.3.3. RECONNAISSANCE DE DEUX ESPECES CHLAMYDIA TRACHOMATIS ET CHLAMYDIA PSITTACI DANS LE GENRE CHLAMYDIA.

GORDON et QUAN (53) ont divisé 27 souches en deux groupes A et B sur la base de deux caractères :

- morphologique par l'aspect compact ou diffus de l'inclusion ;
- biochimique par la présence ou l'absence de glycogène dans l'inclusion.

Généralement, les inclusions compactes sont caractéristiques des organismes les moins virulents alors que les inclusions diffuses seraient caractéristiques des organismes les plus virulents (*86*). D'après ces auteurs, les inclusions compactes contiennent toujours du glycogène (sous-groupe A) et les inclusions diffuses en sont toujours dépourvues (sous-groupe B). Le sous-groupe A ne contient que des souches mammaliennes ; le sous-groupe B contient à la fois des souches d'origine mammalienne et aviaire.

Ces résultats sont corroborés par ceux de *LIN* et *MOULDER (69)* qui ont étudié la sensibilité de 11 souches vis-à-vis de la sulfadiazine et de la D-cyclosérine ainsi que la réversibilité de l'inhibition de la D-cyclosérine par la D-alanine (*81*). Les 4 isolements du sous-groupe A testés sont sensibles à la sulfadiazine, très sensibles à la D-cyclosérine et l'inhibition produite par une mole de D-cyclosérine est réversible par deux moles de D-alanine. Les agents du sous-groupe B sont par contre typiquement résistants à la sulfadiazine, beaucoup moins sensibles à la D-cyclosérine et l'inhibition produite par une mole de D-cyclosérine est réversible par seulement 0,02 mole de D-alanine. Toutes ces propriétés sont rapportées dans le tableau 14.

Sur la base des critères énoncés par *GORDON* et *QUAN* puis complétés par *LIN* et *MOULDER, PAGE* en *1968 (94)* a proposé la reconnaissance de 2 espèces dans le genre *Chlamydia (JONES, RAKE et STEARN - 1945)* :

- *Chlamydia trachomatis (BUSACCA) RAKE-1957* qui est l'espèce type antérieurement établie

et

- *Chlamydia psittaci (LILLIE)*

a- Chlamydia trachomatis (BUSACCA) RAKE :

Ont été regroupées dans cette nouvelle espèce les espèces suivantes :

- *Chlamydia trachomatis*
- *Chlamydia oculogenitalis*
- *Miyagawanella lymphogranulomatosis.*

TABLEAU 14

- PROPRIETES DES SOUS-GROUPES A ET B DE *GORDON* ET *QUAN* -

	AGENTS	NATURE DE L'INCLUSION		SENSIBILITE A LA SULFADIAZINE	SENSIBILITE A LA D-CYCLOSERINE	EFFET DE LA D-ALANINE ANTAGONISTE DE LA D-CYCLOSERINE
		MORPHOLOGIE	PRESENCE DE GLYCOGENE			
A	Lymphogranulomatose vénérienne	Compacte	+	+	+ + +	+
	Conjonctivite à Inclusions	Compacte	+	+	+ + +	+
	Pneumonie de la souris	Compacte	+	+	+ + +	+
	Pneumonie du hamster	Comapcte	+	+	+ + +	+
B	Méningopneumonie	Diffuse	0	0	+	+ + +
	Pneumonie des félins	Diffuse	0	0	+	+ + +
	Conjonctivite du cobaye	Diffuse	0	0	+	+ + +
	Ornithose du pigeon	Diffuse	0	0	+	+ + +
	Psittacose GB 1	Diffuse	0	+	+	+ + +
	Chèvre	Diffuse	0	0	+ + +	+
	Encéphalomyélite bovine	Diffuse	0	0	+ +	+ +

BUS LILLE

Ce sont des organismes sphériques, immobiles, de *0,3 à 0,9 µm* de diamètre, ayant un cycle de multiplication obligatoirement intracellulaire. Durant les deux ou trois premiers jours de développement, les organismes forment des colonies intracytoplasmiques "rigides", "compactes" ; elles contiennent des corps à tous les stades de développement. Lorsque la cellule-hôte est lésée, les corps infectieux sont libérés et vont infecter d'autres cellules. Des colonies secondaires peuvent se former. Pendant une période limitée, du glycogène s'accumule dans l'inclusion en quantité suffisante pour être visible en microscopie optique après fixation des cellules-hôtes infectées dans l'alcool méthylique et coloration avec une solution d'iode à 5 % dans l'iodure de potassium. Les agents sont Gram négatif et sont facilement colorés par le Giemsa. En cultures cellulaires, on peut les observer après coloration en utilisant le fond noir.

Leur multiplication dans le sac vitellin d'embryon de poulet est inhibée au moins au 1/100ème avec 1 mg de sulfadiazine ; elle est également inhibée par les tétracyclines.

Les organismes possèdent un complexe lipo-protéino-polysaccharidique qui est antigéniquement similaire chez toutes les souches des deux espèces du genre *Chlamydia*. Cet antigène de groupe est stable à 100° C et réagit avec les anticorps synthétisés vis-à-vis de n'importe quelle souche, en fixation du complément. Cependant, des sérotypes variés peuvent être distingués en immunofluorescence, ils sont basés sur la spécificité antigénique des composants de la paroi. Actuellement on distingue 10 sérotypes TRIC : A, B, Ba, C, D, E, F, G, H et I ainsi que 3 sérotypes LGV : I, II et III (*121, 122*).

Ces agents sont parasites des cellules de vertébrés et peuvent se transmettre entre vertébrés, en particulier entre hommes par des exudats oculaires ou urogénitaux. Chez l'homme, les organismes peuvent se localiser à un ou plusieurs tissus ou organes : conjonctive, cornée, membrane synoviale, urètre, ganglions lymphatiques, méninges ou cerveau. Les souches de *Chlamydia trachomatis* sont habituellement responsables chez l'homme de maladies ou de syndromes variés : trachome, conjonctivite à inclusions, lymphogranulomatose vénérienne, urétrite, arthrite, syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter ; chez l'animal, elles sont à l'origine de pneumonie chez la souris et le hamster et sont probablement transmises par voie respiratoire.

Les souches peuvent être isolées en sacs vitellins d'embryons de poulet incubés à 35-37° C. Des passages aveugles sont souvent nécessaires. Certaines souches ne cultivent qu'à une température de 35° C plus ou moins 1° C. Elles peuvent être propagées en cultures de cellules de vertébrés : les souches d'origine uro-génitale, en particulier, peuvent être actuellement assez facilement isolées par l'utilisation conjointe de cellules Mac Coy irradiées ou de cellules HeLa 229 traitées avec le Dextran et la centrifugation. Les souches associées aux maladies oculaires de l'homme peuvent être propagées dans les poumons de souris et de cobayes par inoculation intra-nasale ou dans le cerveau de souriceaux après inoculation intracérébrale. Chez le singe, elles causent des affections oculaires.

b- Chlamydia psittaci (LILLIE)

Cette espèce regroupe les anciennes espèces classées par *RAKE* dans le genre *Miyagawanella* (7ème édition du Bergey's Manual 1957) : *Miyagawanella psittaci, Miyagawanella ornithosis, Miyagawanella pneumoniae, Miyagawanella felis, Miyagawanella opossumi, Miyagawanella bovis, Miyagawanella ovis et Miyagawanella pecoris.*

Ce sont des organismes sphériques et immobiles de *0,3 à 1 µm* de diamètre ressemblant à ceux de *Chlamydia trachomatis*. Durant les premiers jours du développement intracellulaire, ils forment des vacuoles intracytoplasmiques, lâches ce qui donne aux organismes l'apparence d'être distribués dans tous le cytoplasme de la cellule-hôte. Ils diffèrent ainsi de *Chlamydia trachomatis*, mais leur mode de multiplication est le même. Il n'existe pas d'accumulation de glycogène dans la vacuole décelable par la coloration à l'iode. La multiplication dans le sac vitellin d'embryon de poulet est inhibée par les tétracyclines, mais non par la sulfadiazine.

Les organismes possèdent un complexe lipo-protéino-polysaccharidique qui est antigéniquement similaire à celui mis en évidence chez toutes les souches du genre *Chlamydia*. Cet antigène est utilisé pour détecter dans un sérum les anticorps fixant le complément.

Parasites des tissus des vertébrés, ils peuvent être transmis entre vertébrés par inhalation de poussières excrémentielles d'oiseaux ou de mammifères infectés, rarement par piqûres d'arthropodes et par passage transovarien au foetus chez les mammifères. Ils produisent généralement une infection généralisée qui succède à une atteinte initiale respiratoire, digestive ou génitale, sans localisation lymphatique évidente.

La lésion de l'endothélium vasculaire entraîne une dissémination des agents dans tout l'organisme et des exudats fibrineux inflammatoires à la surface de nombreux organes. La pneumonie s'accompagne de péricardite, péritonite, splénomégalie, hépatomégalie et ascite, autres signes d'infection généralisée.

Ces agents ont été trouvés chez une centaine d'oiseaux sauvages et domestiques, chez la plupart des animaux domestiques et chez de nombreux mammifères sauvages. Quelques unes des maladies causées par les nombreuses souches de *Chlamydia psittaci* ont été décrites comme la psittacose, l'ornithose, la méningopneumonie, la pneumonie des ovins, des bovins, des porcins, des caprins et de l'homme, l'encéphalomyélite bovine sporadique, l'arthrite des bovins, des ovins et des porcins, l'avortement épizootique des bovins, l'avortement enzootique des ovins, la conjonctivite du cobaye, la maladie épizootique mortelle des lièvres et des rats musqués. Beaucoup d'hôtes deviennent des porteurs sains perpétuant ainsi les agents dans la nature.

Les organismes sont isolés et cultivés dans le sac vitellin d'embryon de poulet incubé à 37-40° C. Beaucoup de souches provenant d'animaux ayant une température normalement élevée ont une croissance optimale à 39° C ou plus. La plupart des souches peuvent être cultivées au laboratoire dans les poumons, le cerveau, le péritoine de la souris et du cobaye ainsi qu'en cultures tissulaires de vertébrés.

c- Clé de détermination des espèces du genre Chlamydia (94) :

1- Inclusion intracytoplasmique "rigide" et "compacte" de 2 à 10 µm de diamètre.

- glycogène mis en évidence par la coloration à l'iode.
- croissance en oeufs inhibée par la sulfadiazine (1 mg par oeuf)

= *Chlamydia trachomatis (BUSACCA) RAKE*

2- Inclusion intracytoplasmique non rigide, de forme irrégulière, diffuse.

- absence de glycogène
- croissance dans l'oeuf non inhibée par la sulfadiazine.

= *Chlamydia psittaci (LILLIE) COMB nov.*

d- Discussion des critères adoptés :

Pour éviter toute ambiguité, il convient de redéfinir ou de préciser certaines des terminologies utilisées comme critères de classification qui peuvent prêter à confusion. Dans la terminologie de *GORDON* et *QUAN*, l'inclusion "compacte" est une vacuole rigide, bien délimitée, n'incluant pas la notion de répartition des corps à l'intérieur de l'inclusion. Or, dans la vacuole, les corps peuvent être soit dispersés, éparpillés réalisant ce que nous avons appelé le type "clairsemé", soit serrés les uns contre les autres donnant à l'inclusion un aspect granuleux et réalisant le type "condensé". Quant au terme "diffus" qui signifie "répandu dans plusieurs parties", il correspond bien au caractère expansif, lâche, des souches de *Chlamydia psittaci*.

Ainsi peut-on opposer les termes "clairsemé" et "condensé"
"rigide" et "irrégulier"
"compact" et "diffus"
les premiers définisant *Chlamydia trachomatis* et les seconds *Chlamydia psittaci*.

Nous avons déjà insisté sur la variabilité des critères morphologiques qui caractérisent les deux espèces (*35*). *TARIZZO* et *NABLI* (*116*) ont obtenu avec la souche EAE/A 1 d'avortement de brebis des inclusions typiques de *Chlamydia psittaci* en association avec des inclusions dont les caractères évoquaient *Chlamydia trachomatis*. Des auteurs russes *TERSKIKH* et *ZAIROV (in 115)* vont même jusqu'à suggérer une différenciation des souches basée sur des critères exactement opposés à ceux proposés par *GORDON* et *QUAN*. La souche de conjonctivite à inclusions MRC 4 nous a posé des problèmes plus graves encore car les deux types observés, inclusions "rigides", "clairsemées" produisant du glycogène et inclusions "diffuses", "condensées", sans glycogène, ne l'ont pas été dans la même culture cellulaire, mais successivement dans le temps. Les typages effectués au laboratoire du Professeur *B.R. JONES* par la microméthode en immunofluorescence ont été identiques pour les deux types d'inclusions. Il semble donc qu'une variation morphologique et métabolique soit survenue chez cette souche. Les passages en série en sacs vitellins ne sont peut-être pas étrangers à ces variations ; de même, les trypsinations répétées en cultures cellulaires sont peut-être responsables de l'augmentation du pouvoir pathogène pour la souris blanche. Il faudrait pouvoir les reproduire à partir de la souche initiale de type clairsemé, glycogène positif.

La même variabilité s'observe pour le glycogène dont la présence ou l'absence est liée à la souche infectante et non à la cellule-hôte *(53)*. Une analyse directe effectuée avec des molécules de glucose marquées au C 14 montre une augmentation du taux de synthèse du glycogène dans les cellules infectées avec *Chlamydia trachomatis* par rapport aux cellules témoins et aux cellules infectées avec *Chlamydia psittaci (39)*. Cependant, des résultats discordants concernant la présence du glycogène au cours de la multiplication des agents du trachome et de la conjonctivite à inclusions ont été publiés à plusieurs reprises. *BERNKOPF* et coll. *(18)* rapportent une coloration à l'iode négatif avec la souche TE 55 de trachome cultivée sur cellules FL, alors que *COLLIER (22)* a trouvé un résultat positif sur cellules HeLa avec la même souche. Des colorations positives ont été obtenues par *COLLIER* avec la souche TRIC/GB/ / MRC 4/ON "fast" mais *FURNESS* et *FRASER*, cités par *COLLIER (22)* ont eu plus tard des résultats négatifs. Ceux que nous avons personnellement obtenus avec la même souche semblent en partie fonction de l'inclusion. Aux inclusions de type "clairsemé" correspondaient en effet une coloration à l'iode positif alors que le passage au type "condensé" a entraîné la perte de cette coloration. L'adjonction de glucose au milieu de culture a été insuffisante pour faire réapparaître la coloration positive à l'iode.

Des faits semblables ont été observés avec l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne. La souche J.H. qui était positive (*87*) est actuellement négative (communication orale de *J. TREHARNE*). La souche 33 L isolée par *SCHACHTER* présente une coloration négative (*106*) de même que la souche *BEDSON* que nous avons étudiée antérieurement (*33, 34*).

Toutes les souches de *Chlamydia psittaci* ont jusqu'à maintenant présenté une coloration négative à l'iode et au PAS. Toutefois, l'application en microscopie électronique de la technique de *SELIGMAN* modifiée par *THIERY (118)* à des coupes de cellules HeLa infectées par *Chlamydia psittaci* (souche Loth d'ornithose) a montré l'existence de petites quantités de granules de glycogène à l'intérieur de la vacuole (*66*). Avec cette même technique, nous avons montré avec la souche MRC 4 de *Chlamydia trachomatis* que les inclusions de type "rigide" et "clairsemé" iode positif contiennent de nombreuses rosettes de glycogène alors que les inclusions de type "condensé" et iode négatif en contiennent peu. Ceci nous amène à penser que la coloration à l'iode est liée à la quantité de glycogène présente dans la vacuole et qu'en dessous d'un certain seuil la coloration est négative. En cela, l'étude cytochimique en microscopie électronique est plus sensible et nuance les observations de microscopie optique.

Certains auteurs ont insisté sur le fait que la coloration positive n'apparaît qu'à un stade tardif du cycle de développement — lorsque les corps initiaux se sont transformés en corps élémentaires — et disparaît à la 72ème heure (*53*). Nous avons trouvé des inclusions iode positif dès la 18ème heure ce qui rejoint les observations de *ORFILA (87)* et de *TARIZZO (116)* avec la souche JH de lymphogranulomatose vénérienne. Nous avons d'autre part démontré, en microscopie électronique, que des inclusions constituées uniquement de corps initiaux pouvaient contenir du glycogène en grande quantité (*35*).

Il reste évidemment à s'interroger sur la valeur de ce critère majeur de la classification de *PAGE*. L'erreur lorsqu'elle existe, est toujours par défaut, jamais par excès. On peut se demander si cela ne tient pas à la coloration elle-même puisque les temps de contact de l'iode sur

la préparation varient selon les auteurs : 2 minutes selon la technique de *GILKES* et *SOWA (47)*, 5 minutes selon *TARIZZO* et *NABLI (116)*, 10 à 15 minutes pour *GORDON* et *QUAN (53)*. D'après nos résultats un temps de contact de 2 minutes est suffisant pour révéler les vacuoles iodophiles : le facteur temps ne semble donc pas intervenir. Selon les auteurs, la préparation cellulaire est soit humide (*35*) soit séchée (*47*) voire même fixée par l'alcool méthylique (*26, 53*) avant que ne soit effectuée la coloration. Mais là encore, il n'existe aucune corrélation avec la présence ou l'absence de glycogène chez les souches de *Chlamydia trachomatis*.

De toute évidence, les critères discutés ci-dessus sont insuffisants pour classer les souches dans l'une des deux espèces du genre *Chlamydia*. Les critères apportés par *LIN* et *MOULDER (69)* concernant la sensibilité des souches vis-à-vis de la sulfadiazine et de la D-cyclosérine sont-ils plus stables ? Si *Chlamydia trachomatis* est homogène quant à la sensibilité aux antibiotiques, *Chlamydia psittaci*, par contre, est hétérogène. Trois souches sur les 11 étudiées par *LIN* et *MOULDER* diffèrent du modèle classique par au moins un caractère. Deux mutations concernant ces caractères ont été observées au laboratoire : d'une part l'acquisition de la résistance aux sulfamides par la souche 6 BC de psittacose et l'agent de la pneumonie de la souris (*in 79*) et d'autre part le changement de sensibilité vis-à-vis de la D-cyclosérine et de la D-alanine d'une souche de pneumonie de la souris résistante à la chlortétracycline (*in 79*). Ces caractères sont donc peut-être encore moins stables que les précédents.

Ces considérations concernant la définition des espèces du genre *Chlamydia* basée sur des critères présentant des variabilités nous amènent à réfléchir sur la notion d'espèce bactérienne.

IV.4. LA NOTION D'ESPECE EN BACTERIOLOGIE.

IV.4.1. DEFINITION.

"L'espèce est l'ensemble des êtres vivants nés les uns des autres ou de parents communs et de ceux qui leur ressemblent autant qu'ils se ressemblent entre eux". Les deux caractères : ressemblance et interfécondité sont tous deux insuffisants, mais dans l'ensemble, cette définition de *CUVIER* est suffisante.

En bactériologie, la notion d'espèce est beaucoup moins évidente et est rendue difficile par des raisons très particulières dont les principales sont citées par *VERON (120)* :

"1- La petite taille de l'objet à classer et le petit nombre de caractères morphologiques facilement discernables ;

2- La nécessité d'étudier la plupart des caractères en particulier, les caractères biochimiques sur un clone et non sur un organisme isolé ;

3- Le rôle prépondérant des mutations qui ont tendance sous la pression sélective du milieu environnant, à modifier le génotype bactérien avec une vitesse sans aucun doute très supérieure à celle qui est observée chez les animaux supérieurs (qui se multiplient beaucoup moins vite que les bactéries)".

D'autre part, les espèces bactériennes sont en règle générale asexuelles et cette absence de sexualité pose des problèmes encore plus redoutables que les croisements éventuels entre espèces zoologiques ou botaniques appartenant au même genre, bien séparées par leur morphologie, leur écologie et de ce fait acceptées universellement comme espèces. La seule unité possible de classification est alors le clone.

Finalement, il n'existe encore aucune définition globale, entièrement satisfaisante de l'espèce bactérienne.

COWAN (in 120) estime que les bactéries peuvent être classées en genres et espèces, mais que ces dernières n'ont pas de caractères fixes et que la variation d'un caractère ne doit pas conduire à l'individualisation d'une nouvelle espèce.

La définition d'une espèce bactérienne repose, d'après les recommandations du 1er Congrès International de Microbiologie de *1930* et du Vème Congrès de Botanique International de la même année, sur un certain nombre de bases :

"1- Chaque sorte de bactérie distincte d'une autre est une espèce ;

2- Les caractères applicables à la différenciation des espèces doivent montrer une certaine constance quand ils sont étudiés dans une large série. De plus, ces caractères doivent montrer une corrélation avec d'autres caractéristiques constantes". (*99*).

IV.4.2. CRITERES UTILISABLES POUR DEFINIR L'ESPECE BACTERIENNE.

Dans la tentative de classification des espèces bactériennes la biochimie a eu dès le début une part importante : la gamme plus ou moins complète des enzymes se traduisant par les différents caractères fermentaires d'un germe, les caractères antigéniques avec la composition des antigènes polysaccharidiques, lipidiques et protéiques ont été largement utilisés pour la détermination des espèces bactériennes et sont désormais des tests classiques. L'étude cytochimique représente un aspect plus récent de la biochimie bactérienne, mais les données sont encore fragmentaires.

Il n'en est pas de même de l'étude de l'ADN et des nucléoprotéines lorsqu'on connaît l'activité transformante que l'ADN d'une souche bactérienne peut avoir sur les caractères héréditaires d'une souche voisine à qui elle imprime un ou plusieurs caractères nouveaux, empruntés à la souche donneuse d'ADN. Jusqu'à une date récente, les critères génétiques indispensables à la notion d'espèce ont fait totalement défaut en bactériologie. Dès lors, pour *SCHAEFFER (107)*, les systèmes de classification en vigueur ne peuvent prétendre être que "des instruments pratiques d'identification permettant de grouper les bactéries d'après leurs caractères écologiques, morphologiques, biochimiques, sérologiques et pathogènes" ; l'identification est généralement possible car les caractères sont groupés de façon relativement stables. Des phénomènes de transfert de matériel génétique de bactérie à bactérie existent entre individus porteurs du même nom : par exemple, entre divers sérotypes de *Salmonella*, entre diverses espèces d'*Hemophilus*, entre *Diplococcus pneumoniæ* et certains *Streptococcus*, mais également entre individus porteurs de noms différents : *Escherichia coli* peut en effet croiser avec *Shigella dysenteriae* et donner naissance à

une descendance dans laquelle les caractères parentaux sont recombinés. Ces faits prouvent que les "espèces" bactériennes ne sont pas des espèces au sens biologique du mot. La nomenclature bactérienne a prodigué des dénominations d'espèces là où seuls existent des races ou des types ; il faut donc convenir de l'imperfection des classifications en usage. A la lumière de ces données, analysons la validité des espèces du genre *Chlamydia*.

IV.4.3. LA NOTION D'ESPECE DANS LA FAMILLE DES CHLAMYDIACEAE

Le mérite de la classification actuelle des *Chlamydiaceae* est que les critères retenus sont ceux qui sont utilisés dans les laboratoires équipés pour isoler et étudier ces germes.

Nous avons vu la place de la sérologie dans la définition du genre *Chlamydia* du fait de l'existence d'un antigène de groupe commun à tous les membres du genre. Contribue-t-elle également à la détermination des espèces de ce genre du fait de la présence d'un antigène spécifique ?

Localisé probablement dans la paroi comme l'antigène de groupe (*44, 59*), l'antigène spécifique est thermolabile. Il est conservé après action de l'iodure de potassium qui détruit l'antigène de groupe. Les fluorocarbones, l'éther, le laurylsulfate de soude solubilisent l'antigène de groupe et conservent l'antigène spécifique. Le traitement par le désoxycholate et la trypsine (*58*) extrait la plupart de l'antigène de groupe et laisse subsister dans les parois l'antigène spécifique. Le terme "spécifique" qui caractérise ce deuxième antigène est ambigu car il recouvre en fait plusieurs entités. Peut-on parler de spécificité d'espèce, au sens biologique du terme ? Il semble que les souches de *Chlamydia trachomatis*

(trachome, conjonctivite à inclusions, lymphogranulomatose vénérienne) puissent être différenciées des souches de *Chlamydia psittaci* (psittacose, 6 BC, pneumonie des félins, méningopneumonie) par diverses techniques : immunofluorescence directe par traitement des antigènes par les fluorocarbones (*61*), réaction d'inhibition de l'hémagglutination (*119*), diffusion sur gélose par traitement des suspensions antigéniques par le désoxycholate et les ultra-sons (*24*).

Les techniques de neutralisation de la toxine (*15, 71*) d'immunofluorescence (*85, 121*) voire même de fixation du complément (*117, 128*) permettent de pousser plus loin l'analyse antigénique et de différencier, selon la terminologie de *NICHOLS* et *Mac COMB (85)*, des antigènes spécifiques d'une maladie, des antigènes spécifiques de l'hôte et des antigènes spécifiques de type.

WOOLRIDGE a ainsi montré que l'antigène préparé par l'action simultanée de la polymyxine et de la trypsine réagit uniquement avec le sérum de sujets atteints de trachome ; la réaction est négative avec les sérums de malades atteints de psittacose ou de lymphogranulomatose vénérienne (*128*). Ces résultats intéressants n'ont malheureusement pu être retrouvés dans d'autres laboratoires. L'utilisation d'une suspension de corps élémentaires purifiés selon la méthode de *COLLIER (23)* pour la réaction de fixation du complément a permis de différencier les antigènes spécifiques de la psittacose des antigènes spécifiques du trachome et de la conjonctivite à inclusions.

A côté de ces antigènes spécifiques d'une maladie, existe une spécificité parasitaire. *SCHACHTER (in 79)*, par un test d'absorption croisée en immunofluorescence, a trouvé pour 11 souches, 11 antigènes spécifiques différents, aucun n'étant totalement spécifique d'un seul micro-

organisme. Il a ainsi individualisé un antigène chez tous les isolements d'origine aviaire que l'on ne rencontre jamais chez ceux d'origine mammalienne. Un autre caractérise les souches d'origine psittacine ; il n'est jamais trouvé chez les autres souches d'origine aviaire. Deux antigènes n'apparaissent que dans les isolements de mammifères dont l'un d'eux uniquement dans les souches humaines. Des tests de "plaque réduction", appliqués à de nombreuses souches de *Chlamydia psittaci*, indiquent que les isolements effectués chez les dindes, les perruches, les pigeons et chez *Callorhinus ursinus* représentent des sérotypes différents (*9*, *73*).

La spécificité de type est, elle aussi, mise en évidence par différentes techniques. Le test de neutralisation de la toxine chez la souris (*16*) et la réaction d'immunofluorescence (*85*) ont permis de subdiviser les souches de trachome en 2 groupes 1 et 2. En utilisant des suspensions antigéniques traitées par les fluorocarbones, et la réaction de fixation du complément, *FRASER* et *BERMAN (44)* ont divisé 14 souches de *Chlamydia psittaci* en 7 groupes sérologiques. Des expériences d'immunité croisées pratiquées chez la souris avec 10 souches de *Chlamydia psittaci* isolées chez des oiseaux et des mammifères démontrent l'existence de 2 groupes antigéniques (*78*).

La mise au point récente de la microméthode en immunofluorescence a permis de typer les souches de *Chlamydia trachomatis*. Actuellement, on distingue 10 sérotypes TRIC : A, B, Ba, C, D, E, F, G, H et I et 3 sérotypes LGV : I, II et III (*122*). Le travail de typage des souches de *Chlamydia psittaci* que nous a confié l'O.M.S. n'est pas suffisamment avancé pour que nous en tirions des conclusions.

L'équipement antigénique des *Chlamydiae* apparaît donc particulièrement complexe. Ceci rend leur étude longue et ardue. Il est par ailleurs difficile d'établir une comparaison entre les résultats obtenus dans différents laboratoires du fait de la diversité des méthodes sérologiques utilisées, de la qualité des antigènes et de la préparation des sérums immuns. La sérologie spécifique ne peut donc être admise comme base de classification. La détermination précise du sérotype a toutefois un intérêt épidémiologique et permet une meilleure connaissance des relations existant entre les nombreuses souches du genre.

Nous avons vu l'importance grandissante des critères génétiques indispensables à la notion d'espèce. La classification des *Chlamydiaceae* repose -t-elle sur des bases génétiques ?

La détermination du pourcentage en guanine + cytosine du DNA montre une différence significative entre les souches de méningopneumonie et 6 BC de *Chlamydia psittaci* (39 %) et celles de *Chlamydia trachomatis* (42 %) (*62, 125*). Pour d'autres auteurs, il existe une similitude d'une part entre les agents de la méningopneumonie, de l'ornithose et la souche 33 L de lymphogranulomatose vénérienne et d'autre part entre les souches de trachome et de conjonctivite à inclusions. Par contre les souches de pneumonie des ovins, d'avortement de brebis et la souche JH de lymphogranulomatose vénérienne occupent une position intermédiaire et ne peuvent être rattachées à aucun des deux groupes. Ces résultats suggèrent que l'on trouvera probablement un spectre continu du pourcentage des bases G + C de 40 à 44 % lorsqu'un plus grand nombre de souches de *Chlamydiae* aura été étudié (*46 b*).

La valeur de ce pourcentage ne semble donc pas confirmer l'existence de deux espèces bien distinctes. Par contre, la réassociation des brins de DNA à 67° C dans 0,6 M Na est de 95-97 % entre différentes souches de *Chlamydia psittaci* (*46 a, 62*) ou entre diverses souches de *Chlamydia trachomatis* (*62, 125*) et seulement de 10 % entre les souches de *Chlamydia psittaci* et celle de *Chlamydia trachomatis* (*62, 125*). Ces résultats indiquent d'une part le haut degré d'homologie entre les DNA des différentes souches d'une même espèce et d'autre part le peu de parenté entre les deux espèces dont le degré de réassociation entre elles est du même ordre que celui existant entre l'une des deux espèces et les *Neisseria*.

Un cas particulier est fourni par la souche de pneumonie de la souris qui appartient à l'espèce *Chlamydia trachomatis*. Si elle possède un G + C de 42 % et si la réassociation des brins de DNA avec une souche de *Chlamydia psittaci* est de 11 %, la réassociation n'est que de 63 % avec une souche de conjonctivite à inclusions dans des conditions semi-restrictives à 67° et seulement de 29 % à 75° C. Il existe donc une similitude dans les séquences polynucléotidiques des deux souches, mais un manque d'identité dans leurs génomes, une hétérogénéicité entre les souches humaines et murines de *Chlamydia trachomatis* (*125*).

L'étude des DNA semble ne pas être une méthode suffisamment sensible pour détecter les changements génétiques affectant la structure antigénique, les degrés de virulence pour l'homme et les animaux ou les autres modifications intéressant moins de 5 % du génome (*125*).

IV.5. NOTIONS ACTUELLES SUR LES RICKETTSIALES.

La famille des *Chlamydiaceae* qui depuis 1948 (6ème édition du Bergey's Manual) appartenait à l'ordre des *RICKETTSIALES*, est placée dans un nouvel ordre, celui des *CHLAMYDIALES (in 13, 111)*. L'argument principal à l'établissement de ce nouvel ordre est que le cycle de développement intracellulaire des *Chlamydiae* est unique non seulement parmi les organismes des autres familles de l'ordre des *Rickettsiales* miis également parmi tous les autres groupes de bactéries. D'autres caractères contribuent à la séparation des *Chlamydiae* et des *Rickettsies* :

- l'absence de cytochrome et la non production d'ATP par les *Chlamydiae* alors que les Rickettsies contiennent des cytochromes et sont capables de produire de l'ATP.

- le rôle important des arthropodes dans la perpétuation et la transmission de nombreuses espèces rickettsiennes alors qu'ils n'ont qu'un rôle très réduit sinon nul dans l'épizootiologie des *Chlamydiae*.

Notons que cette séparation pose le problème de la place du genre *Rickettsiella* dont l'espèce *Rickettsiella melolonthae* présente un cycle de multiplication comparable à celui des *Chlamydiae (30)*.

Les études de biologie moléculaire, en particulier le faible pourcentage de recombinaison des brins de DNA entre *Chlamydia trachomatis* et *Chlamydia psittaci* et les propriétés biologiques conduisent *BECKER (13)* à suggérer de combiner la classification de *PAGE (94)* et une partie de la classification antérieure (Bergey's 7ème édition *RAKE* 1957). La famille des *Chlamydiaceae* serait divisée en deux genres :

GENRE I : *CHLAMYDIA* avec deux espèces :

- *Chlamydia trachomatis*
- *Chlamydia oculogenitalis*

GENRE II : *MIYAGAWANELLA* (qui inclut l'agent de la psittacose et les souches voisines).

Les définitions des deux genres pourraient être celles suggérées par *PAGE (94)* pour définir les deux espèces du genre *Chlamydia*.

Le terme "*CHLAMYDIA*" serait d'autre part incorect du point de vue taxonomique et pourrait être remplacé par celui de "*HALPROVIA*", contraction de *HALBERSTAEDTER* et de *VON PROWAZECK* qui en 1907 ont été les premiers à décrire les inclusions trachomateuses.

Ainsi donc, l'ordre des *Rickettsiales* qui a absorbé plusieurs groupes d'organismes très divers, la plupart d'entre eux ne partageant qu'une seule caractéristique, celle de ne pouvoir être cultivés en dehors de cellules vivantes, risque d'être remanié, voire démantelé. Nous avons vu ce qu'il en est avec la famille des *Chlamydiaceae*, mais il en va de même avec les rickettsies pathogènes d'invertébrés, en particulier des bactéries d'allure rickettsienne dont une meilleure connaissance provoquera sans doute des modifications importantes de la classification. Enfin, le critère de parasitisme cellulaire obligatoire risque d'être en défaut à mesure que se préparent des milieux de culture de plus en plus complets. La création du genre *Rochalimea* pour *Rickettsia quintana* en est un exemple.

C O N C L U S I O N S G E N E R A L E S

°°
°

"Un microbiologiste doit bien se persuader de la différence fondamentale qui sépare classification et identification. Etablir une identification (ou un diagnostic), c'est rechercher l'existence éventuelle de similitudes entre une souche individuelle et un certain nombre de souches types, actuelles ou disparues, mais pré-établies" (*120*). L'identification repose sur l'étude des caractères morphologiques, des conditions de culture et des caractères de la croissance, des caractères biochimiques et antigéniques y compris de la toxinogénèse et de la pathogénicité, de la sensibilité aux agents physiques, chimiques et éventuellement aux bactériophages. Dans cette démarche on reste essentiellement pratique, non scientifique. "Nous décidons donc qu'une bactérie donnée est d'une "espèce" différente d'une autre bactérie morphologiquement semblable parce que la première utilise par exemple le lactose tandis que la seconde ne l'utilise pas. Ceci résulte, évidemment, d'un consentement mutuel, mais ne peut en aucun cas être considéré comme la base d'une classification fondamentalement scientifique" (*99*). De même, "avons nous le droit de considérer chaque sérotype de *Salmonella* comme une espèce définie si dans d'autres groupes comme chez les *Escherichia coli* nous considérons les sérotypes comme des variantes d'un type unique ?"(*65*).

"Au contraire, établir une classification, c'est au départ rechercher les similitudes existant naturellement entre toutes les souches individuelles vivant dans un milieu déterminé. Les souches individuelles les plus ressemblantes sont alors rassemblées dans le même groupe taxonomique ou taxon (taxospécies ou génospécies) dont le niveau taxonomique n'est d'aucune manière pré-établi. Ce n'est que secondairement, si besoin est, qu'on identifie les taxons obtenus à des nomenspécies connues" (*120*). L'espèce bactérienne rassemble les bactéries qui ont le plus d'affinité génétique c'est-à-dire les souches qui sont supposées descendre d'un ancêtre commun. Mais en raison des lois de l'évolution et du rôle de la sélection, des souches bactériennes appartenant à la même espèce peuvent différer par un certain nombre de caractères : on parle alors de variétés, de biotypes, de sérotypes, de lysotypes ... "Aucune confusion n'aurait pu se faire jour, si les auteurs des clés dichotomiques d'identification avaient parlé de groupes et de sous-groupes bactériens, en évitant de prononcer le nom d'espèce, dont il ne pouvaient justifier l'emploi" (*107*).

"Il est maintenant tout à fait impossible de construire une classification bactérienne scientifique en dehors de cette notion d'espèce biologique, et, en l'occurence, d'espèce bactérienne" (*120*). La méthode de taxonomie numérique constitue en cela "la classification objective de souches existant réellement dans un environnement donné, d'après leur ressemblance mutuelle" (*120*). L'application de cette méthode aux *Rickettsiales* serait sans doute précieuse pour résoudre les problèmes que posent dans cet ordre l'isolement sans cesse croisant de nouvelles souches.

1. ALLISON (A.C.), PERKINS (H.R.)
Presence of cell walls like those of bacteria in rickettsia.
Nature 1960, 188, 796-798.

2. ANACKER (A.L.), FUKUSHI (K.), PICKENS (E.G.), LACKMAN (D.B.)
Electron microscopic observations of the development of Coxiella burnetii in the chick yolk sac.
J. Bacteriol. 1964, 88, 4, 1130-1138.

3. ANDERSON (D.R.), HOPPS (H.E.), BARILE (M.F.), BERNHEIM (B.C.)
Comparison of the ultrastructure of several rickettsiae, ornithosis virus, and mycoplasma in tissue culture.
J. Bacteriol. 1965, 90, 5, 1387-1404.

4. ARCY GILL (S.d'), STEWART (R.B.)
Glucose requirements of L cells infected with Chlamydia psittaci.
Canad. J. Microbiol. Canada 1970, 16, 10, 997-1001.

5. ARCY GILL (S.d'), STEWART (R.B.)
Respiration of L cells infected with Chlamydia psittaci.
Canad. J. Microbiol. Canada 1970, 16, 11, 1033-1039.

6. ARMSTRONG (J.A.)
Relation of PLT organisms to the rickettsiae, with special reference to the structure and multiplication.
Acta Virol. 1968, 12, 15-17.

BUS LILLE

7. ARMSTRONG (J.A.), REED (S.)
Nature and origin of initial bodies in lymphogranuloma venereum.
Nature 1964, 201, 371-373.

8. ARMSTRONG (J.A.), VALENTINE (R.C.), FILDES (C.)
Structure and replication of the trachoma agent in cell cultures, as shown by electron microscopy.
J. Gen. Microbiol. 1963, 30, 59-73.

9. BANKS (J.), EDDIE (B.), SUNG (M.), SUGG (N.), SCHACHTER (J.), MEYER (K.F.)
Plaque reduction technique for demonstrating neutralizing antibodies for Chlamydia.
Infection and Immunity 1970, 2, 4, 443-447.

10. BARRON (A.L.), ZAKAY-RONES (Z.), BERNKOPF (H.)
Hemagglutination of chicken erythrocytes by the agent of psittacosis.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 1965, 119, 377-381.

11. BARWELL (C.F.)
Some observations on the antigenic structure of psittacosis and lymphogranulomavenereum viruses. I. Preparation and use in complement fixation tests of antisera from different sources.
Brit. J. Exp. Path. 1952, 33, 258-267.

12. BARWELL (C.F.)
Some observations of the antigenic structure of psittacosis and lymphogranuloma venereum viruses. II. Treatment of virus suspensions by various reagents and the specific activity of acid extracts.
Brit. J. Exp. Path. 1952, 33, 268-279.

13. BECKER (Y.)
The agent of trachoma.
Monographs in Virology, Ed. Melnick J.L., HOUSTON - Texas - 1974, 7.

14. BEDSON (S.P.)
Observations bearing on the antigenic composition of psittacosis virus.
J. Exptl. Pathol. 1936, 17, 109-121.

15. BELL (S.D.), SNYDER (J.C.), MURRAY (E.S.)
Immunization of mice against toxic doses of homologous elementary bodies of trachome.
Sciences, 1959, 130, 626-627.

16. BELL (S.D.), THEOBALD (B.)
Differentiation of trachoma strains on the basis of immunization against toxic death of mice.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1962, 98, 337-346.

17. BENEDICT (A.A.), O'BRIEN (E.)
Antigenic studies on the psittacosis lymphogranuloma venereum group of viruses. II. Characterisation of complement fixing antigens extracted with sodium lauryl sulfate.
J. Immunol. 1956, 76, 293-300.

18. BERNKOPF (M.), MASHIAH (P.), MAYTHAR (B.)
Cultivation of a strain of trachoma virus in the FL line of human amnion cells.
Bull. Res. Coun. Israel E. 1960, 8, 121-127.

19. BRINTON (L.P.), BURGDORFER (W.)
Fine structure of Rickettsia canada in tissues of Dermacentor andersoni stiles.
J. Bacteriol. 1971, 105, 3, 1149-1159.

20. BURGDORFER (W.), ANACKER (R.L.), BIRD (R.G.), BERTRAM (D.S.)
Intranuclear growth of Rickettsia rickettsii.
J. Bacteriol. 1968, 96, 4, 1515-1518.

21. BURTON (P.R.), KORDOVA (N.), PARETSKY (D.)
Electron microscopic studies of the Rickettsia Coxiella burnetii : entry, lysosomal response, and fate of rickettsial DNA in L-cells.
Canad. J. Microbiol. Canada 1971, 17, 2, 143-150.

22. COLLIER (L.H.)
Growth caracteristics of inclusion blennorrhea virus in cell cultures.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1962, 98, 42-49.

23. COLLIER (L.H.), SOWA (J.)
Isolation of trachoma virus in embryonated eggs.
Lancet 1958, 1, 993-996.

24. COLLINS (A.R.), BARRON (A.L.)
Demonstration of group and species-specific antigens of chlamydial agents by gel diffusion.
J. Infect. Dis. 1970, 121, 1-8.

25. DAROUGAR (S.), KINNISON (J.R.), JONES (B.R.)
Simplified irradiated Mac Coy cell culture for isolation of chlamydia.
in "Trachoma and related disorders caused by chlamydial agents"
Excerpta Medica 1971, 63-70.

26. DAROUGAR (S.), DWYER (R.), TREHARNE (J.D.), HARPER (I.A.), GARLAND (J.A.) JONES (B.R.)
A comparison of laboratory methods of diagnosis of chlamydial infection.
in "Trachoma and related disorders caused by chlamydial agents"
Excerpta Medica 1971, 445-460.

27. DEBRE (R.), CELERS (J.H.)
Clinique virologique.
Ed. Médicales Flammarion.

28. DEVAUCHELLE (G.)
Contribution à l'étude de la structure fine de quelques agents pathogènes dans les hémocytes du coléoptère Melolontha melolontha L.
Thèse de Doctorat ès-sciences Naturelles 11 mars 1972 - Université des Sciences et Techniques du Languedoc.

29. DEVAUCHELLE (G.), MEYNADIER (G.), VAGO (C.)
Etude ultrastructurale du cycle de multiplication de Rickettsiella melolonthae (Krug), Philip, dans les hémocytes de son hôte.
J. Ultrastructure Research 1972, 38, 134-148.

30. DEVAUCHELLE (G.), VAGO (C.), MEYNADIER (G.)
Ultrastructure comparée de Rickettsiella melolonthae (Rickettsiales Wolbachiae) et de l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne (Rickettsiales Chlamydiaceae).
C.R. Acad. Sci. 1971, 272, 23, 2972-2974.

31. DHIR (S.P.), KENNY (G.E.), GRAYSTON (J.T.)
Characterization of the group antigen of Chlamydia trachomatis.
Infection and Immunity 1971, 4, 6, 725-730.

32. DUNLOP (E.M.C.), HARPER (I.A.), AL-HUSSAINI (M.K.), GARLAND (J.A.), TREHARNE (J.D.), WRIGHT (D.J.M.), JONES (B.R.)
Relation of TRIC agent to nonspecific genital infection.
Brit. J. ven. Dis. 1966, 42, 77-87.

33. EB (F.)
Contribution à l'étude de l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne.
D.E.A. de Biologie Cellulaire 28 Octobre 1970 - LILLE -

34. EB (F.), DEVAUCHELLE (G.), ORFILA (J.)
Etude ultrastructurale de l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne (Rickettsiales Chlamydiaceae).
J. de Microscopie 1972, 13, 1, 47-56.

35. EB (F.), ORFILA (J.), DEVAUCHELLE (G.)
Etude de Chlamydia trachomatis. Polymorphisme de l'agent du trachome en cultures cellulaires.
Ann. Microbiol.(Institut Pasteur) 1973, 124 B, 41-71.

36. EB (F.), ORFILA (J.) en collaboration avec G. SORODOC
Etude du développement en culture cellulaire d'une rickettsiale isolée à partir d'un perroquet.
Rev. Roum. Virol. 1973, 10, 199-208.

37. ENTWISTLE (P.F.), ROBERSON (J.S.), JUNIPER (B.E.)
The ultrastructure of a rickettsia pathogenic to a saturnid moth.
J. Gen. Microbiol. 1968, 54, Part 1, 97-104.

38. ERLANDSON (R.A.), ALLEN (E.G.)
The ultrastructure of meningopneumonitis.
Virology 1964, 22, 410-418.

39. FAN (V.S.C.), JENKIN (H.M.)
Glycogen metabolism in chlamydia infected HeLa cells.
J. Bacteriol. 1970, 104, 608-609.

40. FERRON (A.)
Bactériologie à l'usage des étudiants en médecine.
Edit. CROUAN et ROQUES 1972.

41. FISET (P.), ORMSBEE (R.A.)
The antibody response to antigens of Coxiella burneti.
Zbl. Bakt. I. Abt. Ong. 1968, 206, 321-329.

42. FRANCK (D.W.), Mc GUIRE (T.C.), GORHAM (J.R.), FARRELL (R.K.)
Lymphoreticular lesions of canine neorickettsiosis.
J. Infect. Dis. 1974, 129, 163-171.

43. FRANCK (D.W.), Mc GUIRE (T.C.), GORHAM (J.R.), DAVIS (W.C.)
Cultivation of two species of canine monocytes.
J. Infect. Dis. 1974, 129, 257-262.

44. FRASER (C.E.O.), BERMAN (D.T.)
Type specific antigens in the psittacosis-lymphogranuloma venereum group of organisms.
J. Bacteriol. 1965, 89, 943-948.

45. FRIIS (R.)
Interaction of L cells and Chlamydia psittaci : entry of the parasite and host responses to its development.
J. Bacteriol. 1972, 110, 2, 706-721.

46a GERLOFF (R.K.), RITTER (D.B.), WATSON (R.O.)
DNA homology between the meningopneumonitis agent and related microorganisms.
J. Infect. Dis. 1966, 116, 197-202.

46b GERLOFF (R.K.), RITTER (D.B.), WATSON (R.O.)
Studies on thermal denaturation of DNA from various Chlamydiae.
J. Infect. Dis. 1970, 121, 65-69.

47. GILKES (M.J.), SMITH (C.H.), SOWA (J.)
Staining of the inclusion bodies of trachoma and inclusion conjunctivitis.
Revue Intern. Trachome, 1959, 36, 220-222.

48. GIMENEZ (D.F.)
Gram staining of Coxiella burnetii.
J. Bacteriol. 1965, 90, 834-835.

49. GIROUD (P.)
Des agents de la psittacose à ceux du trachome. Agents bedsoniens ou néorickettsiens.
Presse Médicale 1969, 77, 13, 475-478.

50. GIROUD (P.)
Syndromes cliniques non classiques provoqués par des rickettsies et des agents proches.
Med. et Mal. Infect. 1973, 3, 6, 241-245.

51. GIROUD (P.), CAPPONI (M.), DUMAS (N.)
Zoonoses rickettsiennes et néorickettsiennes exotiques.
Bull. Soc. Path. Exot.1969, 62, 295-303.

52. GIROUD (P.), JADIN (J.)
Premiers résultats concernant le virus des Bashi isolé dans la province du Kivu au Congo Belge.
Bull. Soc. Path. Exot. 1954, 47, 578-588.

53. GORDON (F.B.), QUAN (A.L.)
Occurence of glycogen in inclusions of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma agents.
J. Infect. Diseases 1965, 115, 186-196.

54. GRAYSTON (J.T.), WANG (S.P.), WOOLRIDGE (R.L.), YANG (Y.F.), JOHNSTON (P.B.)
Trachoma : studies of etiology, laboratory diagnosis and prevention.
J.A.M.A. 1960, 172, 1577-1586.

55. HANDLEY (J.), PARETSKY (D.), STUECKEMANN (J.)
Electron microscopic observations of Coxiella burnetii in the guinea pig.
J. Bacteriol. 1967, 94, 1, 263-267.

56. HIGASHI (N.)
Electron microscopic studies on the mode of reproduction of trachoma virus and psittacosis virus in cell cultures.
Experimental and Molecular Pathology, 1965, 4, 24-39.

57. ITO (S.), VINSON (J.W.)
Fine structure of Rickettsia quintana cultivated in vitro and in the louse.
J. Bacteriol. 1965, 89, 481-495.

58. JENKIN (H.M.)
Preparation and properties of cell walls of the agent of meningopneumonitis.
J. Bacteriol. 1960, 80, 639-647.

59. JENKIN (H.M.), ROSS (M.R.), MOULDER (J.W.)
Species specific antigens from the cell walls of the agent of meningopneumonitis and feline pneumonitis.
J. Immunol. 1961, 86, 123-127.

60. KAJIMA (M.), SHARON (N.), POLLARD (M.)
Electron microscopy of latent psittacosis virus in Mc Coy cells.
J. Bacteriol. 1964, 88, 3, 709-715.

61. KATZENELSON (E.), BERNKOPF (H.)
Serologic differentiation of trachoma strains and other agents of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group with the aid of direct fluorescent antibody method.
The J. of Immunology 1965, 94, 3, 467-474.

62. KINGSBURY (D.T.), WEISS (E.)
Lack of deoxyribonucleic acid homology between species of the genus Chlamydia.
J. Bacteriol. 1968, 96, 4, 1421-1423.

63. KRIEG (A.)
Rickettsiae and Rickettsiases.
in "Insect Pathology" E. STEINHAUS Edit. Academic Press 1963.

64. KUO (C.C.), WANG (S.P.), WENTWORTH (B.B.), GRAYSTON (J.T.)
Primary isolations of TRIC organisms in HeLa 229 cells treated with DEAE-Dextran.
J. Infect. Diseases 1972, 125, 6, 665-668.

65. LE MINOR (L.)
La notion d'espèce dans le groupe Salmonella.
Ann. Inst. Pasteur, 1958, 94, 207-212.

66. LEPINAY (A.)
Etude morphodynamique et ultrastructurale de Chlamydia psittaci souche ornithosis.
Thèse de Doctorat ès-sciences Naturelles 15 Décembre 1971 - Université de Paris VIème.

67. LEVADITI (J.C.), ROGER (F.), DESTOMBES (P.)
Tentative de classification des Chlamydiaceae (RAKE 1955) tenant compte de leurs affinités tissulaires et de leur épidémiologie.
Ann. Inst. Pasteur, 1964, 107, 5. 256-262.

68. LEWIS (V.J.), THACKER (W.L.), CACCIAPUOTI (A.F.)
Detection of Chlamydia psittaci by immunofluorescence.
Applied Microbiol. 1972, 24, 8, 12.

69. LIN (H.S.), MOULDER (J.W.)
Patterns of respons to sulfadiazine, D-cycloserine and D-alanine in members of the psittacosis group.
J. Infect. Diseases 1966, 116, 372-376.

70. MAILLET (P.L.)
Observations ultrastructurales et biologiques sur des microorganismes de type rickettsien trouvés chez divers Homoptères aucheno-rhynques.
Bull. Biol. 2ème trimestre 1971, 105, 2, 95-111.

71. MANIRE (G.P.), MEYER (K.F.)
The toxins of the psittacosis-lymphogranuloma group of agents. III. Differentiation of strains by the toxins neutralization test.
J. Infect. Diseases 1950, 86, 241-250.

72. MEYER (K.F.)
Some remarks concerning the ecology of bedsonia infections.
Separatum Experimentia 1960, XVI/6, 261-265.

73. MEYER (K.F.)
Demonstration of host species specific antigens in Chlamydia psittaci by the plaque reduction test in L-cell tissue cultures.
Archiv Für die gesamte Virusforschung 1970, 31, 1-2, 1-10.

74. MEYER (K.F.), EDDIE (B.)
Latent psittacosis infections in shell parakeets.
Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 1933, 30, 484-488.

75. MITSUI (Y.)
Electron microscopy of the trachoma agent.
Rev. int. Trachome 1971, 2-4, 9-23.

76. MITSUI (Y.), FUJIMOTO (M.), KAJIMA (M.)
Development and morphology of trachoma agent in the yolk sac cell as revealed by electron microscope.
Virology 1964, 23, 30-45.

77. MITSUI (Y.), KAJIMA (M.), NISHIMURA (A.), KONISHI (K.)
Morphology of trachoma agent in conjunctiva and chick embryo.
Annal of the N.Y. Acad. Sci. 1962, 98, 1, 131-144.

78. MITZEL (J.R.), WRIGHT (G.G.), SNACK (N.S.)
Cross immunity among strains of Chlamydia psittaci.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N.Y. 1970, 135/3, 944-946.

79. MOULDER (J.W.)
The relation of the psittacosis group (Chlamydiae) to bacteria and viruses.
Annual Rev. Microbiol. 1966, 20, 107-130.

80. MOULDER (J.W.), GRISSO (D.L.), BRUBAKER (R.R.)
Enzymes of glucose catabolism in a member of the psittacosis group.
J. Bacteriol. 1965, 89, 3, 810-812.

81. MOULDER (J.W.), NOVOSEL (D.L.), OFFICER (J.E.)
Inhibition of the growth of agents of the psittacosis group by D-cycloserine and its specific reversal by D-alanine.
J. Bacteriol. 1963, 85, 3, 707-711.

82. MYERS (W.F.), ORMSBEE (R.A.), OSTERMAN (J.V.), WISSEMAN (C.L.)
The presence of diaminopimelic acid in the rickettsiae.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N.Y. 1967, 125, 459-462.

83. MYERS (W.F.), OSTERMAN (J.V.), WISSEMAN (C.L.)
Nutritional studies of Rickettsia quintana : nature of the hematin requirement.
J. Bacteriol. 1972, 109, 89-95.

84. NERMUT (M.V.), SCHRAMEK (S.), BREZINA (R.)
Electron microscopy of Coxiella burneti phase I and II.
Acta Virol. 1968, 12, 446-452.

85. NICHOLS (R.L.), Mc COMB (D.E.)
Serologic strain differentiation in trachoma.
J. Exptl. Med. 1964, 120, 639-654.

86. OFFICER (J.E.), BROWN (A.)
Serial changes in virus and cells in cultures chronically infected with psittacosis virus.
Virology 1961, 14, 88-99.

87. ORFILA (J.)
Etude de l'action cytopathogène du virus de la lymphogranulomatose vénérienne en culture de tissus.
Annales de l'Institut Pasteur 1962, 102, 3, 241-245.

88. ORFILA (J.)
La réaction de fixation du complément dans le trachome.
Rev. Int. Trachome 1966, 1, 43-68.

89. ORFILA (J.), LEPINAY (A.)
Etude du cycle de développement de l'agent de l'ornithose dans les macrophages de souris.
Annales de l'Institut Pasteur 1967, 113, 19-27.

90. ORMSBEE (R.A.)
Q. fever rickettsia.
In "Viral and Rickettsial diseases of man" Horsfall F.L., Tamm I.
Edit. J.B. Lippincott Philadelphia 1965, 1144-1160.

91. ORMSBEE (R.A.)
Rickettsiae (as organisms)
Ann. Rev. Microbiol. 1969, 23, 275-292.

92. ORMSBEE (R.A.)
Metabolic activity in Coxiella burnetii.
J. Bacteriol. 1964, 88, 1205-1210.

93. PAGE (L.A.)
Revision of the family Chlamydiaceae Rake (Rickettsiales) : unification of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group of organisms in the genus Chlamydia Jones, Rake and Stearns 1945.
Intern. J. System. Bacteriol. 1966, 16, 223-252.

94. PAGE (L.A.)
Proposal for the recognition of two species in the genus Chlamydia Jones, Rake and Stearns.
Intern J. System. Bacteriol. 1968, 18, 51-66.

95. PHILIP (C.B.)
1957. In "Bergey's Manual of determinative bacteriology".
7 th Ed. Breed, R.S. Murray, E.G.D. et Smith N.R. Eds Williams et Wilkins, Baltimore.

96. PODOLYAN (V.Ya.), MILYUTIN (V.N.), GUDIMA (O.S.), LUKINA (R.N.)
Morphogenesis of ornithosis virus.
Voprosy Virusologii 1964, 9, 2, 208-212.

97. RAKE (G.), SHAFFER (M.F.), THYGESON (P.)
Relationship of agents of trachoma and inclusion conjunctivitis to those of lymphogranuloma psittacosis group.
Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 1942, 49, 545-547.

98. REEVE (P.), TAVERNE (J.)
A simple method for total particle counts of trachoma and inclusion blennorrhoea viruses.
Nature, London 1962, 195, 923-924.

99. RENOUX (G.)
La notion d'espèce dans le genre Brucella.
Ann. Institut Pasteur 1958, 94, 179-206.

100. RIERA (M.C.), BARRON (L.)
Reactions with hemagglutinin of psittacosis agent in gel diffusion.
Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med. 1970, 135, 594-597.

101. RISTIC (M.)
Anaplasmosis.
In "Infections blood diseases of man and Animals".
D. Weinman et M. Ristic. Eds Academic Press.

102. ROGER (F.), ROGER (A.)
Les affinités tinctoriales des rickettsies et des gros virus visibles (groupe lymphogranulomatose-psittacose). I. Sur le mécanisme de la différenciation avec la coloration de Macchiavello et sur quelques applications pratiques.
Ann. Institut Pasteur 1958, 94, 1, 126-128.

103a.ROSENBERG (M.), KORDOVA (N.)
Study of intracellular forms of Coxiella burneti in the electron microscope.
Acta Virologica 1960, 4, 52-55.

1C3b.ROSENBERG (M.), KORDOVA (N.)
Multiplication of Coxiella burneti in Detroit-6 cell cultures. An electron microscope study.
Acta Virologica 1962, 6, 176-180.

104. ROSS (M.R.), GOGOLAK (F.M.)
The antigenic structure of psittacosis and feline pneumonitis viruses. II. Chemical nature of the alkali soluble antigens.
Virology 1957, 3, 365-373.

105. ROTA (T.R.), NICHOLS (R.L.)
Infection of cell cultures by trachoma agent : enhancement DEAE-Dextran.
J. Infect. Diseases U.S.A. 1971, 124, 4, 419-421.

106. SCHACHTER (J.), MEYER (K.F.)
Lymphogranuloma venereum. II. Characterization of some recently isolated strains.
J. Bacteriol. 1969, 99, 3, 636-638.

107. SCHAEFFER (P.)
La notion d'espèce après les recherches récentes de génétique bactérienne.
Ann. Institut Pasteur 1958, 94, 2, 167-177.

108. SCHRAMEK (S.)
Isolation and characterization of deoxyribonucleic acid from Coxiella burneti.
Acta Virologica 1968, 12, 18-22.

109. SEIGNEURIN (J.M.)
Du typhus aux rickettsioses.
1968 Imprimerie Allier.

110. STOKER (M.G.P.), SMITH (K.M.), FISET (P.)
Internal structure of Rickettsia burnetii as shown by electron microscopy of thin sections.
J. Gen. Microbiol. 1956, 15, 632-635.

111. STORZ (J.), PAGE (L.A.)
Taxonomy of the Chlamydiae : reasons for classifying organisms of the genus Chlamydia, family Chlamydiaceae, in a separate order, Chlamydiales ord. nov.
International J. of Systematic Bacteriology 1971, 21, 4, 332.

112. TAJIMA (M.), NOMURA (Y.), KUBOTA (Y.)
Structure and development of viruses of the psittacosis-lymphogranuloma group observed in the electron microscope.
J. Bacteriol. 1957, 74, 5, 605-620.

113. TAMURA (A.), HIGASHI (N.)
Purification and chemical composition of meningopneumonitis virus.
Virology, 1963, 20, 596-604.

114. TANAMI (Y.), YAMADA (Y.)
Miniature cell formation in Chlamydia psittaci.
J. Bacteriol. 1973, 114, 408-412.

115. TARIZZO (M.L.), NABLI (B.)
Etudes sur le trachome. 10. Isolement d'une souche de virus du groupe PLT à partir d'un avorton de brebis et étude de ses rapports avec le virus du trachome.
Bull. Org. Mond. Santé 1966, 34, 683-692.

116. TARIZZO (M.L.), NABLI (B.)
Development and morphology of the agent of enzootic abortion of ewes and other bedsoniae in HeLa cells.
Ann. J. Ophthalm. 1967, 63, 1215-1225.

117. TERZIN (A.L.), VEDROS (N.A.), JOHNSTON (J.B.)
Serological studies on group and species specific antigens of trachoma and inclusion conjunctivitis (TRIC) agents.
J. Hyg. London, 1964, 62, 185-198.

118. THIERY (J.P.)
Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique.
J. Microscopie PARIS, 1967. 6, 987-1018.

119. VEDROS (N.A.)
Species specific antigens from trachoma and inclusion conjunctivitis (Chlamydial) agents.
J. Immunol. 1967, 99, 1183-1186.

120. VERON (M.)
Taxonomie numérique et classification des bactéries.
Bulletin Inst. Pasteur, 1969, 67, 12.

121. WANG (S.P.), GRAYSTON (J.T.)
Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test.
Amer. J. Ophthal. 1970, 70, 367-374.

122. WANG (S.P.), GRAYSTON (J.T.), GALE (J.L.)
Three new immunologic types of trachoma inclusion conjunctivitis organisms.
The J. of Immunology 1973, 110, 3, 873-879.

123. WEINMAN (D.)
Bartonellosis.
In "Infections blood diseases of man and animals".
D. Weinman et M. Ristic Eds. Academic Press.

124. WEISS (E.)
Growth and Physiology of rickettsiae.
Bact. Reviews 1973, 37, 259-283.

125. WEISS (E.), SCHRAMEK (S.), WILSON (N.N.), NEWMAN (L.W.)
Deoxyribonucleic acid heterogenicity between human and murine strains of Chlamydia trachomatis.
Infect. Immunity 1970, 2, 24-28.

126. WIEBE (M.E.), BURTON (P.R.), SHANKEL (D.M.)
Isolation and characterization of two cell types of Coxiella burneti phase I.
J. Bacteriol. 1972, 110, 368-377.

127. WISSIG (S.L.), CARO (L.G.), JACKSON (E.B.), SMADEL (J.E.)
Electron microscopic observations on intracellular rickettsiae.
Am. J. of Pathology 1956, 32, 1117-1134.

128. WOOLRIDGE (R.L.)
A complement fixation antigen for the serological diagnosis of trachoma.
The J. of the Formosan Med. Association 1960, 59, 6, 355-363.

129. A guide to the performance of the Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to micro test.
U.S. Department of Health, Education and Welfare.
Public Health Science 1 st Edition - July 1969.

LEGENDE DES PLANCHES

o o
o

N = Noyau
Cy = Cytoplasme
G = Golgi
M = Mitochondrie
f = Fibrilles
V = Vacuole

R = Rickettsie
c = Forme coccoïde
cb = Forme coccobacillaire
b = Forme bacillaire
Ci = Corps initial
Cm = Corps intermédiaire
Ce = Corps élémentaire
Cg = Corps géant
mc = Corps miniature
ve = formation vésiculaire

p = Paroi
m = membrane protoplasmique
n = nucléoïde

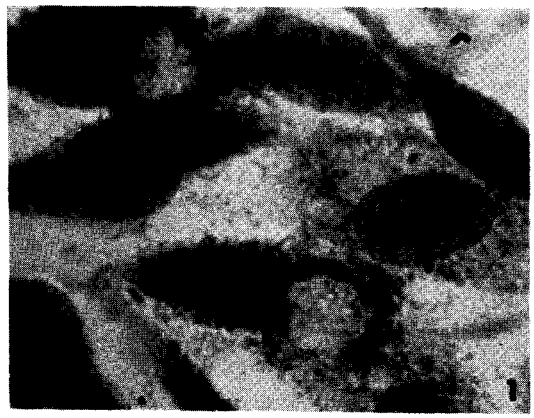
PLANCHE I

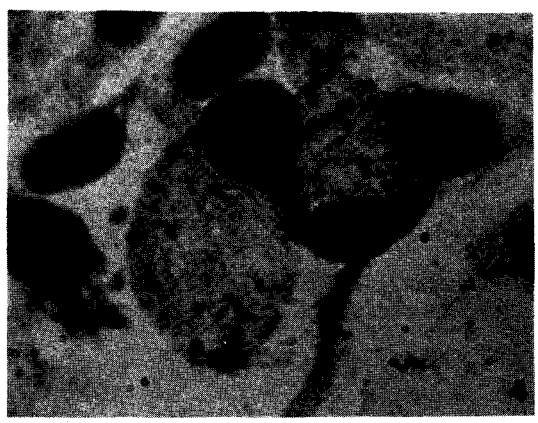
Fig. 1 à 4 : CELLULES L INFECTEES AVEC LA SOUCHE ROUMAINE (X 2400)

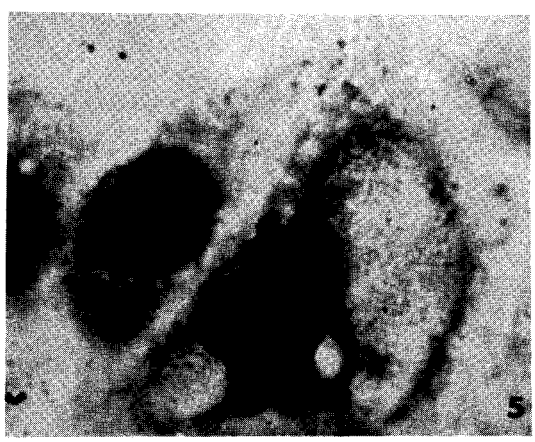
Prélèvements effectués respectivement aux 3ème, 4ème et 6ème jours.
Notez les volumineuses vacuoles intracytoplasmiques (Fig. 2 et 3) et la ballonisation des cellules (Fig. 4).

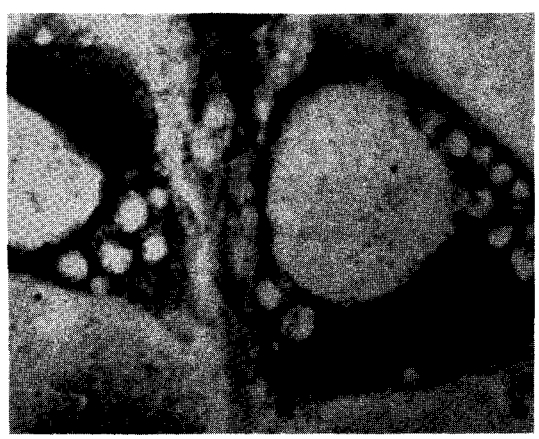
Fig. 5 à 8 : SOUCHE RICHARD CULTIVEE SUR CELLULES HELA 229 : 96ème heure de développement (X 2400)

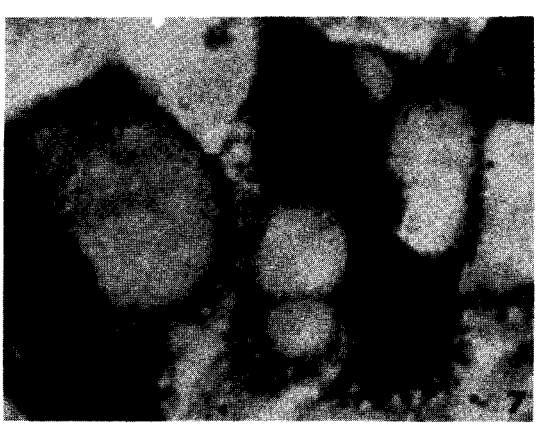
Le cytoplasme des cellules est occupé par de nombreuses vacuoles contenant des coccobacilles colorés en rose par le May-Grünwald-Giemsa. Aux stades ultimes les corps sont libérés dans le milieu ambiant (Fig. 8).

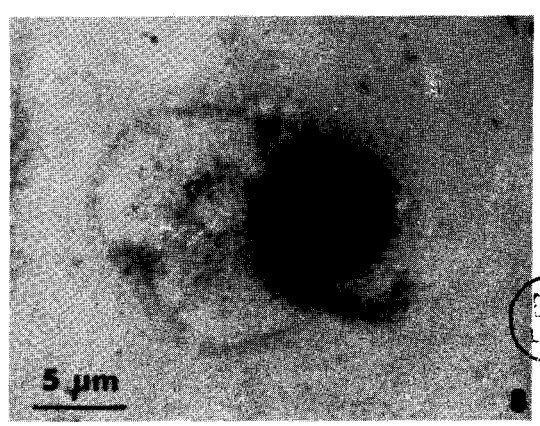












BUS LILLE

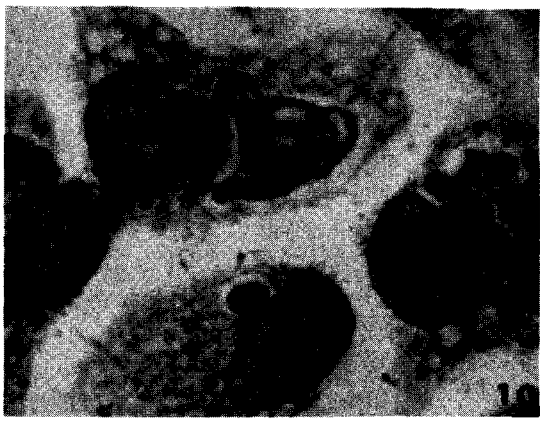
PLANCHE II

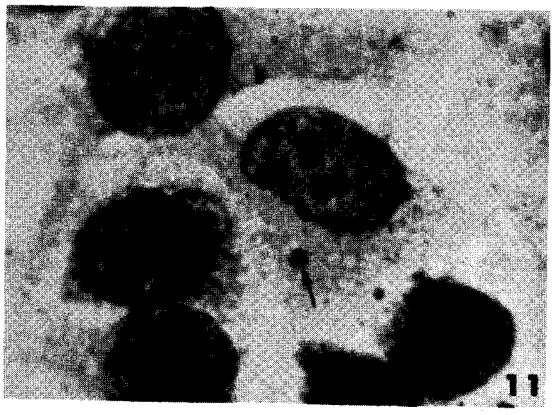
Fig. 9 et 10 : SOUCHE LOTH D'ORNITHOSE CULTIVEE SUR CELLULES HELA 229 (X 2400)

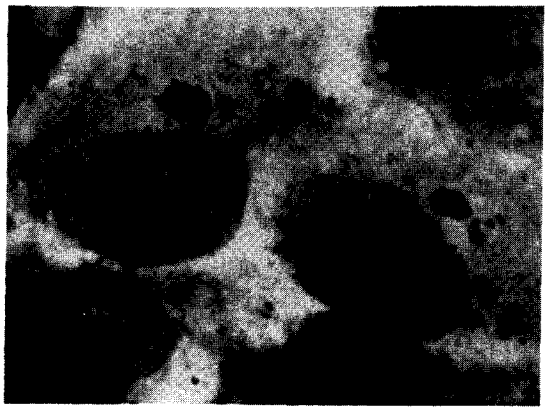
La souche est caractérisée à la 96ème heure par des inclusions compactes, diffuses et asynchrones (Fig. 10).
Le parasitisme n'entrave pas la multiplication cellulaire (Fig. 9).

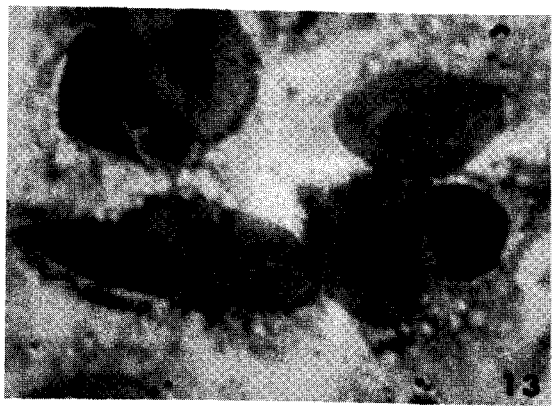
Fig. 11 à 16 : CELLULES HELA 229 INFECTEES AVEC LA SOUCHE T 13 DE PSITTACOSE

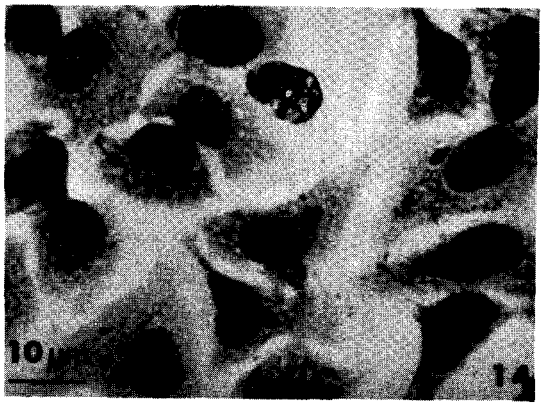
Le cycle de développement débute à la 24ème heure par l'apparition de morula (↑) (Fig. 11 - X 2400) et de petites inclusions intracytoplasmiques (Fig. 12 - X 2400) dans un nombre restreint de cellules.
Les inclusions ont augmenté de taille à la 48ème heure (Fig. 13 - X 2400).
A la 96ème heure, la culture cellulaire est fortement infectée (Fig. 14 - X 1000) ; au 6ème jour les cellules se vident de leurs corps (Fig. 15 - X 2400) ou éclatent (Fig. 16 - X 2400).

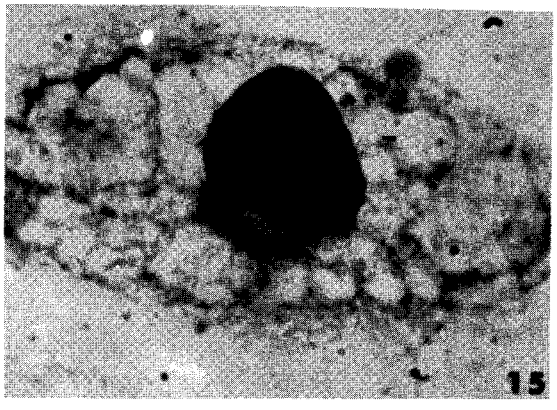


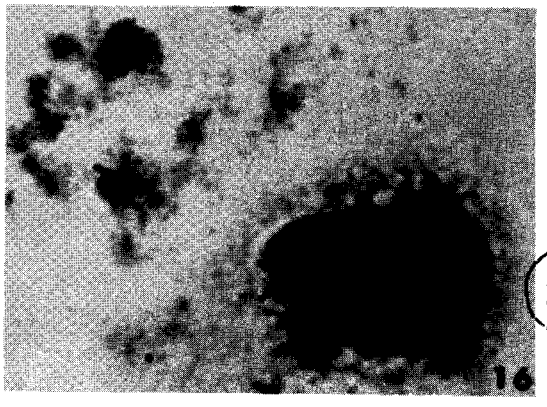












BUS
LIEGE

PLANCHE III

Fig. 17 à 22 : SOUCHE Q 18 D'AVORTEMENT DE BREBIS CULTIVEE SUR HELA 229

On retrouve, à la 36ème heure, la morula (↑) (Fig. 17 - X 2400), les inclusions compactes, petites à la 48ème heure (Fig. 18 - X 2400) puis diffuses entourées d'un halo clair à la 72ème heure (Fig. 20 - X 2400).

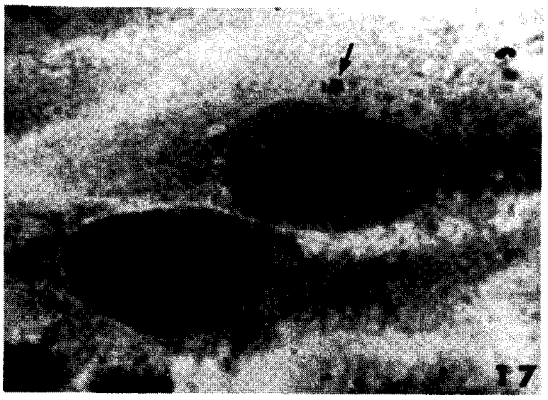
Notez les corps arrondis de grande taille (Fig. 21 - X 2400) et la lyse cellulaire (Fig. 22 - X 2400), au 6ème jour.

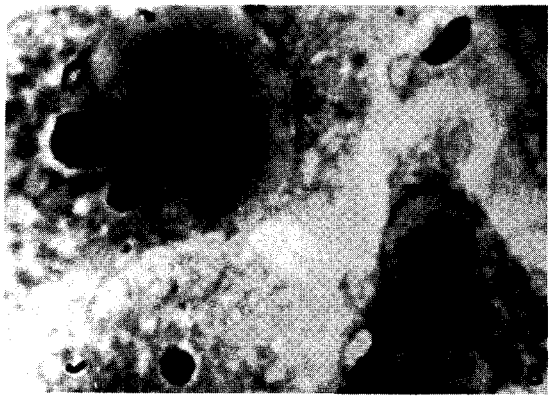
La Fig. 19 donne une vue d'ensemble de la culture cellulaire à la 72ème heure (X 1000).

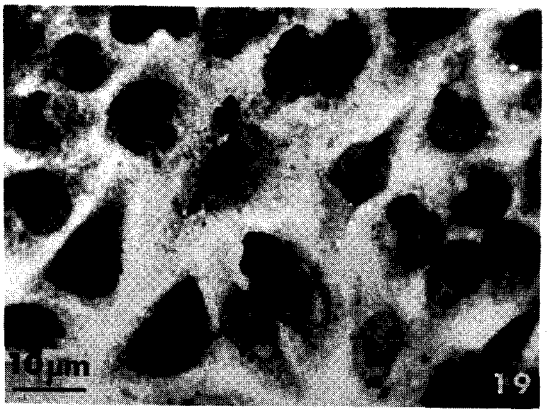
Fig. 23 à 24 : CELLULES HELA 229 INFECTEES AVEC LA SOUCHE D 41 D'AVORTEMENT DE BREBIS (X 2400)

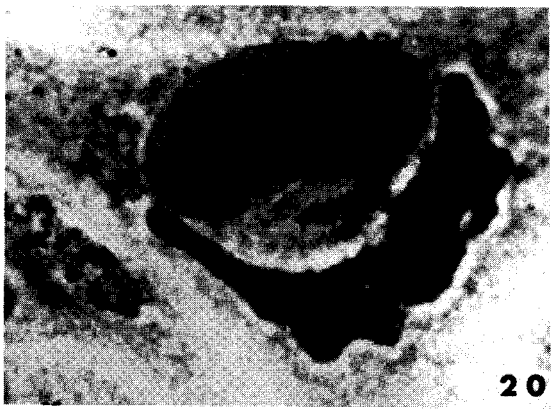
Le caractère diffus de l'inclusion est particulièrement marqué Fig. 23.

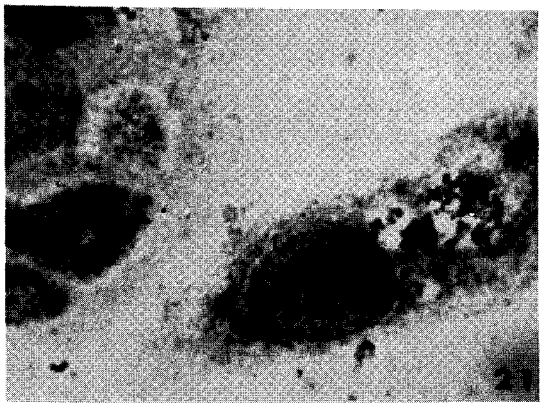
La ballonisation importante de la cellule avec noyau hémisphérique, rejeté à un pôle fait penser à une vacuole type Coxiella burneti (Fig. 24) ; mais les corps sont arrondis et colorés en bleu et en violet par le May-Grünwald-Giemsa.

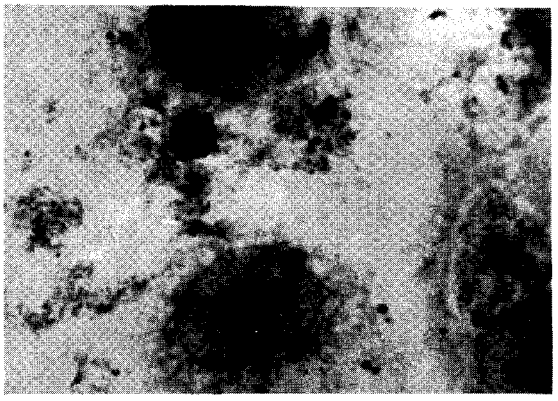


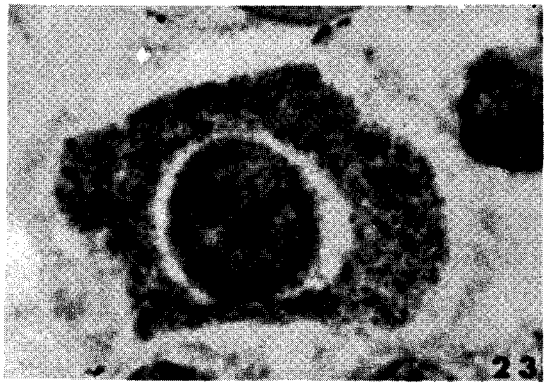


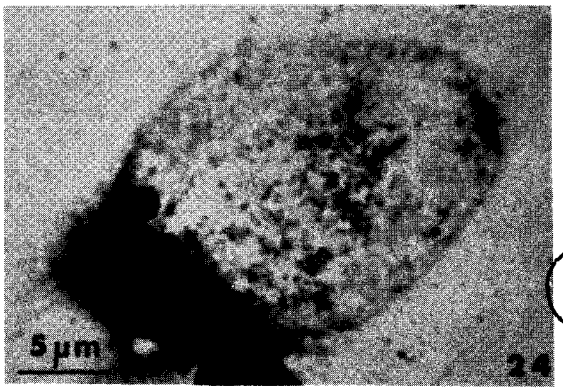












BUS LILLE

PLANCHE IV

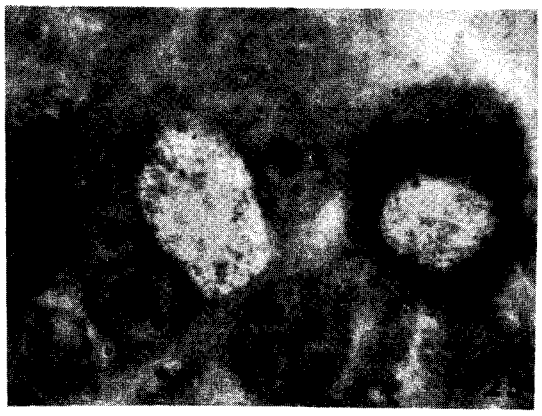
Fig. 25 à 28 : SOUCHE MRC 4 DE CONJONCTIVITE A INCLUSIONS

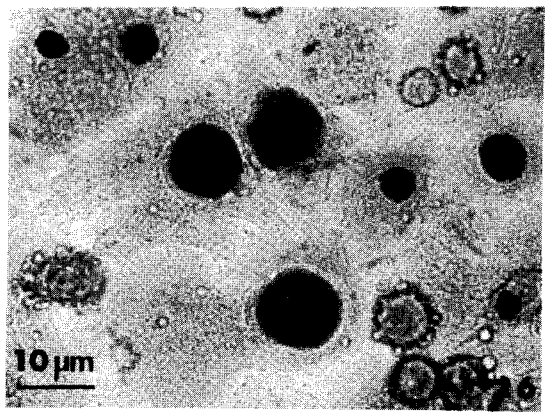
Lors des premiers passages sur cellules HeLa la souche était de type clairsemé (Fig. 25 - X 2400) et la coloration à l'iode positive (Fig. 26 - X 1000).

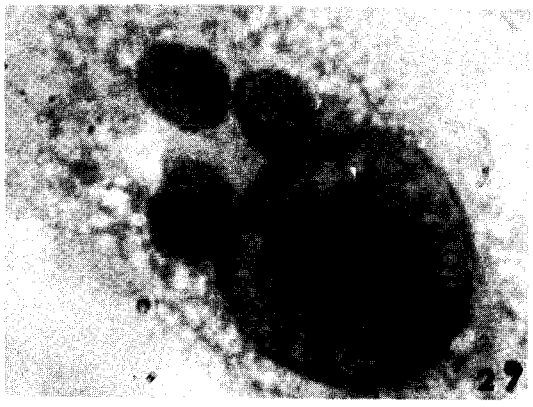
Ultérieurement, la souche cultivée sur cellules KB, est devenue de type condensé (Fig. 27 - X 2400) et la coloration à l'iode négative (Fig. 28 - X 2400).

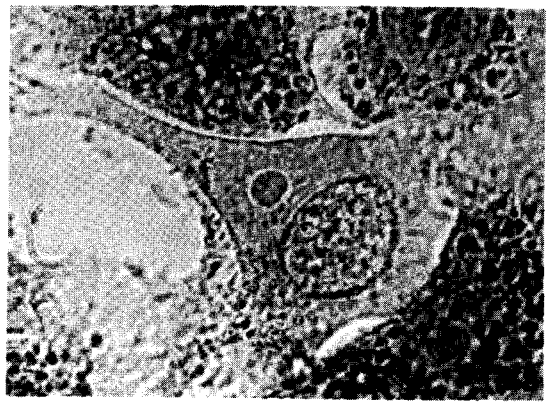
Fig. 29 à 32 : CELLULES HELA 229 INFECTEES PAR LA SOUCHE D'AVORTEMENT DE VACHE
(X 2400)

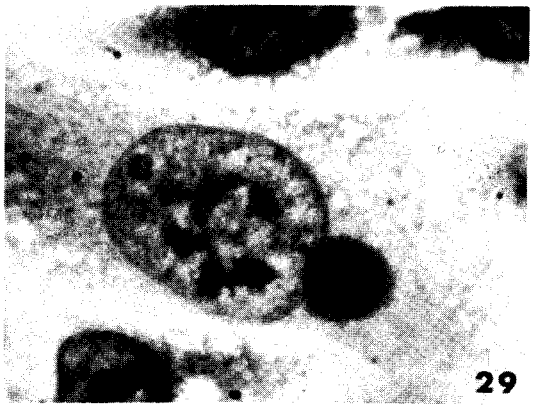
Cette souche se présente à la fois sous forme de vacuoles compactes (Fig. 29) et clairsemées (Fig. 30) type Coxiella burneti et d'inclusions type Chlamydia (Fig. 32). Dans la même cellule s'observent (Fig. 31) une morula chlamydienne (↑) et une vacuole type Coxiella (▲).

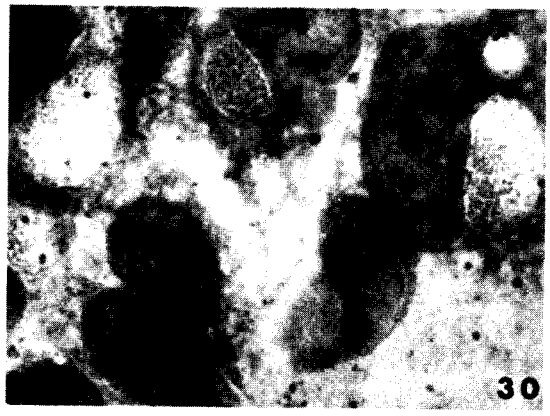


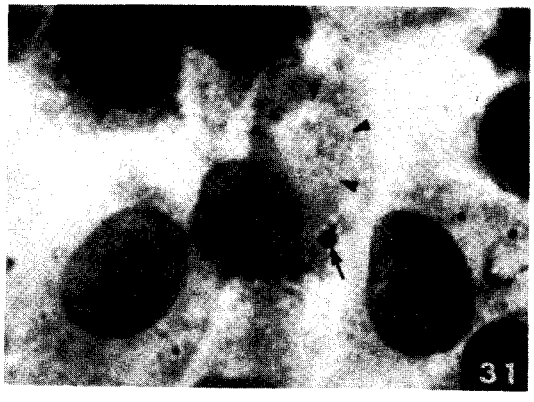

10 µm
26


27




29


30


31

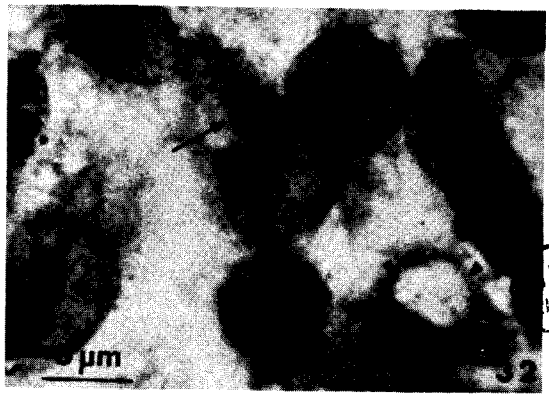
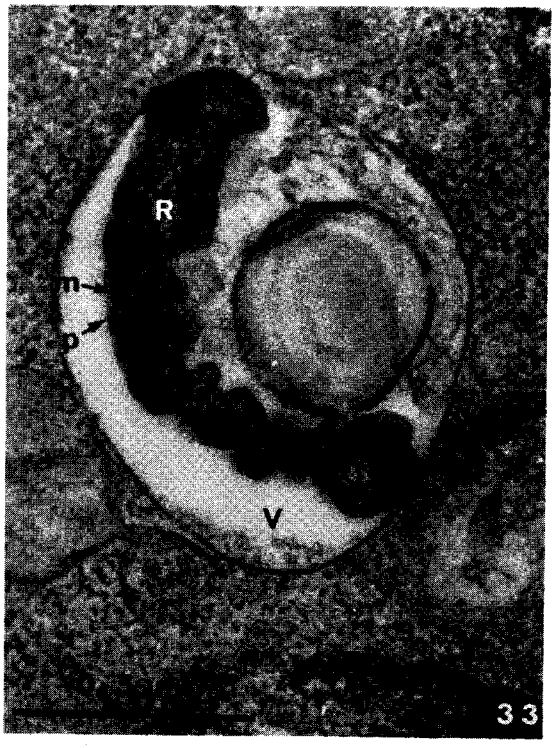

µm
32

PLANCHE V

SOUCHE ROUMAINE CULTIVEE SUR CELLULES L

Le corps d'allure rickettsienne (R) entouré d'une paroi (p) et d'une membrane sous-jacente (m) est contenu dans une vacuole de phagocytose (V) limitée par une membrane plasmique (▲) (Fig. 33 - X 63750). La confluence des vacuoles développées autour de chaque élément phagocyté (Fig. 34 - X 28750) aboutit à la formation d'une vacuole de grande taille (Fig. 35 - X 28750).


R
m
p
V
33

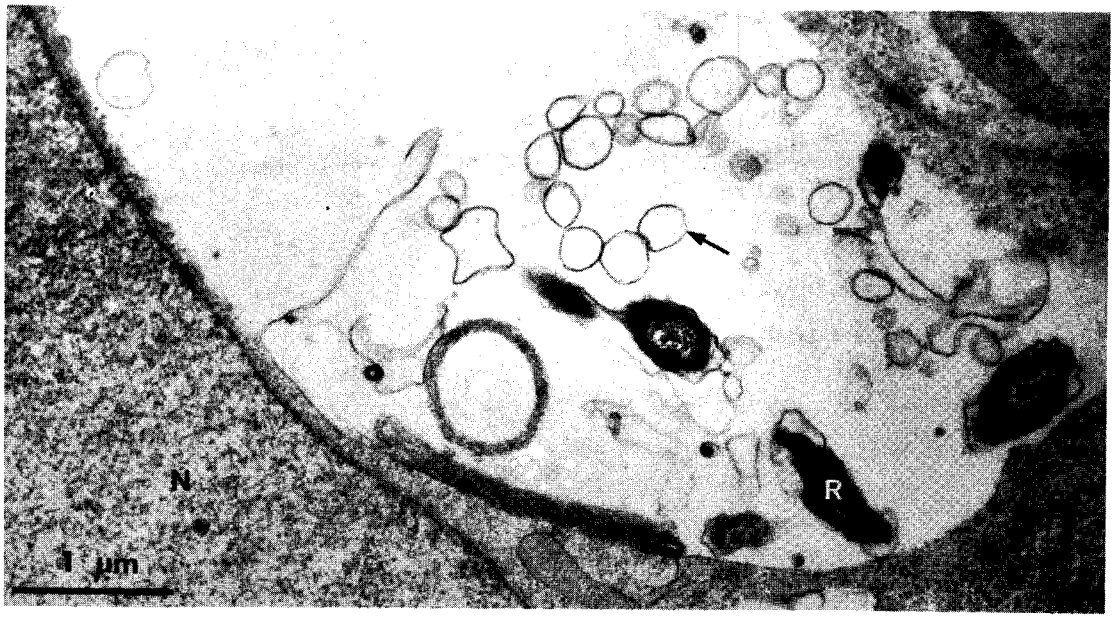
R

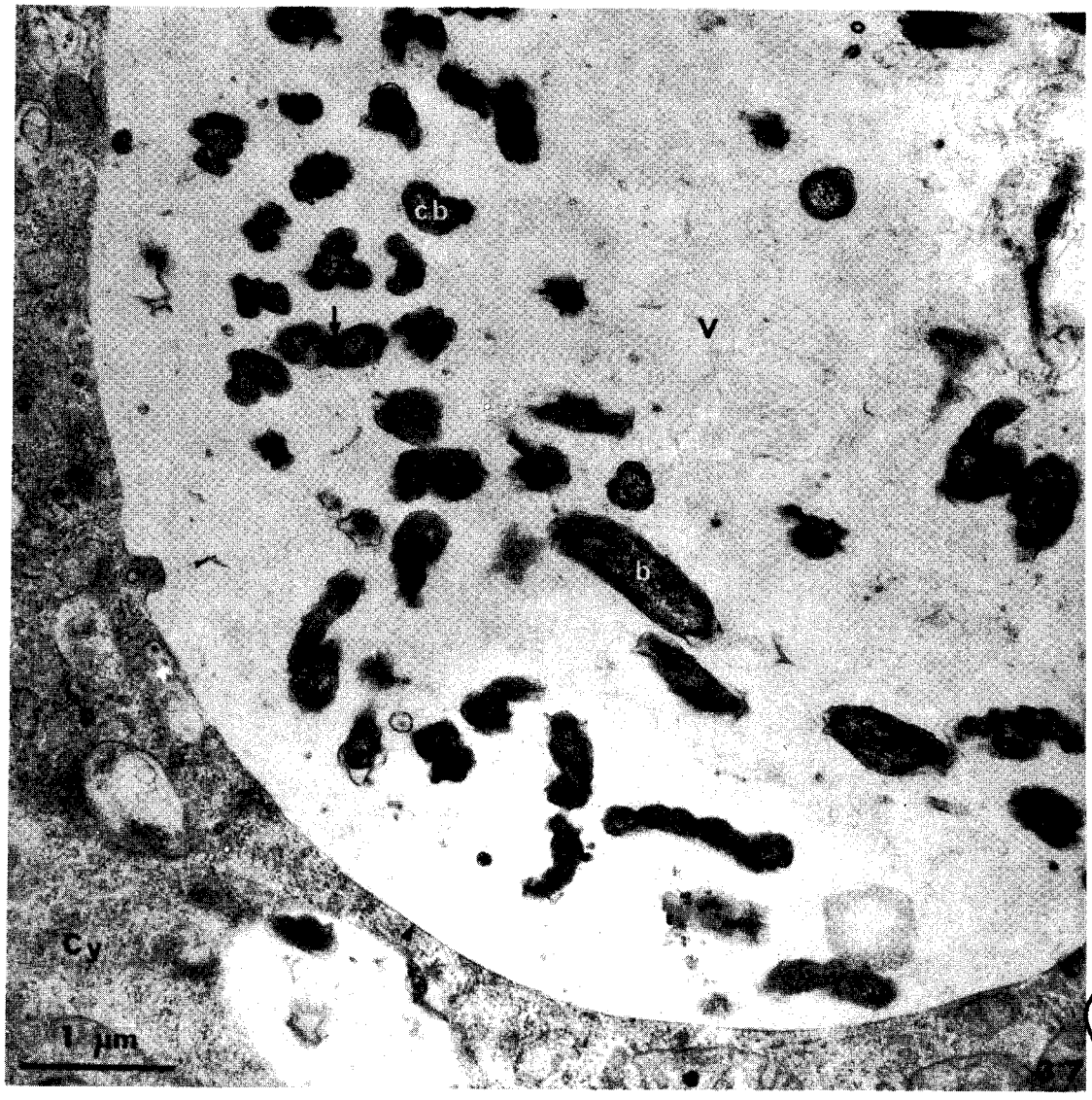
M
R
V
1 μm

PLANCHE VI

CELLULES L INFECTEES AVEC LA SOUCHE ROUMAINE

Vacuole volumineuse contenant peu de formes rickettsiennes (R) et des fantômes de paroi (↑) (Fig. 36 - X 21000). Le caractère polymorphique de Coxiella burneti avec des formes coccoïdes (c), coccobacillaires (cb) et bacillaires (b) apparaît parfaitement sur la Fig. 37 (X 21000). Certaines formes sont en division (↑).





BUS LILLE

PLANCHE VII

INFECTION DES CELLULES HELA 229 PAR LA SOUCHE RICHARD

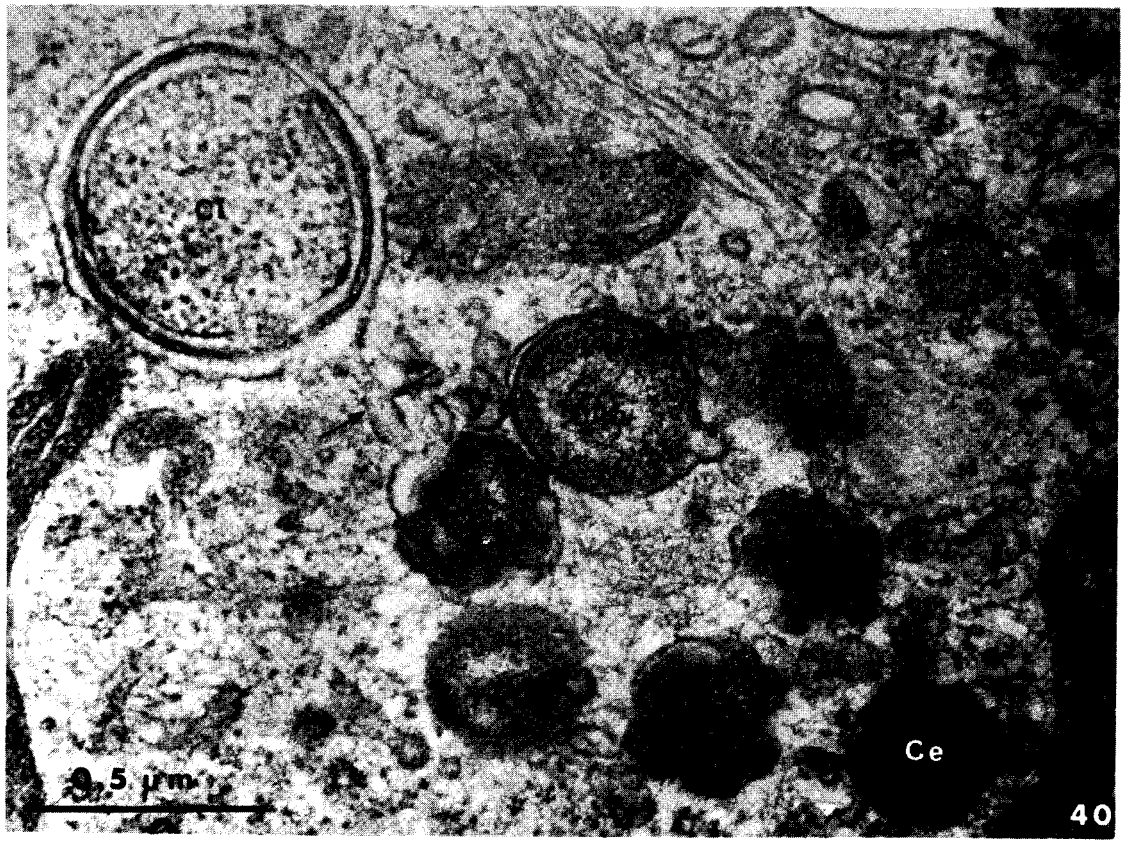
De nombreuses vacuoles de phagocytose (V) contenant un ou deux corps d'allure rickettsienne occupent le cytoplasme de la cellule-hôte (Fig. 38 - X 16500). A un stade plus tardif, les corps (R) sont dispersés au sein d'une vacuole de grande taille (Fig. 39 - X 21000).

BUS LILLE

PLANCHE VIII

SOUCHE LOTH D'ORNITHOSE CULTIVEE SUR CELLULES HELA 229

A un stade précoce, les membranes plasmiques entourant chaque corps phagocyté ont tendance à fusionner par l'intermédiaire de ponts (↑) (Fig. 40 - X 63750). L'inclusion ainsi formée est constituée en majeure partie de corps initiaux (Ci) ; elle est limitée par une membrane visible en certains endroits seulement (↓) ; elle contient en outre quelques corps intermédiaires (Cm) et élémentaires (Ce) ainsi que des formations vésiculaires (Fig. 41 - X 21000).


ct
Ce
0,5 µm
40

ve
Cm
Ce

PLANCHE IX

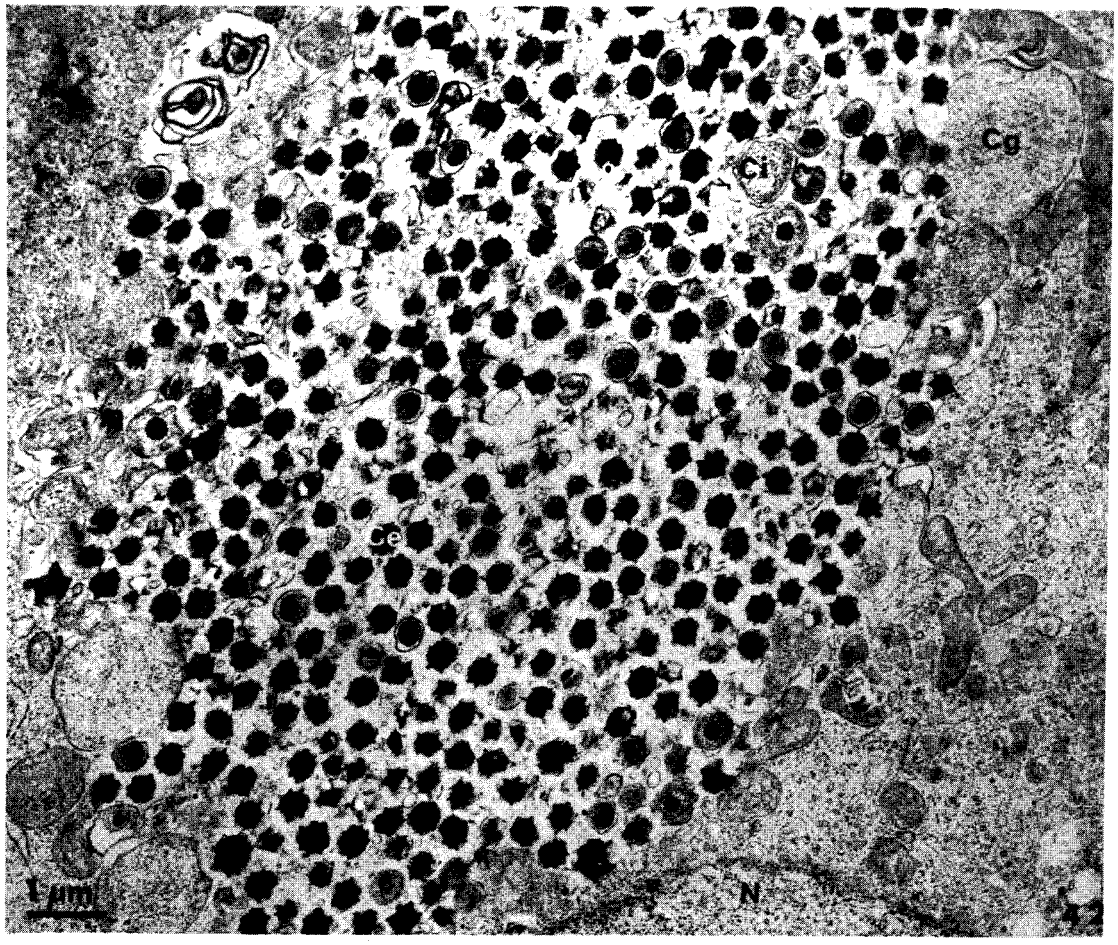
CELLULES HELA 229 INFECTEES PAR LA SOUCHE LOTH D'ORNITHOSE

A un stade tardif l'inclusion est constituée principalement de corps élémentaires (Ce) ; quelques corps initiaux (Ci), corps intermédiaires (Cm) et corps géants (Cg) sont également visibles (Fig. 42 - X 10500).

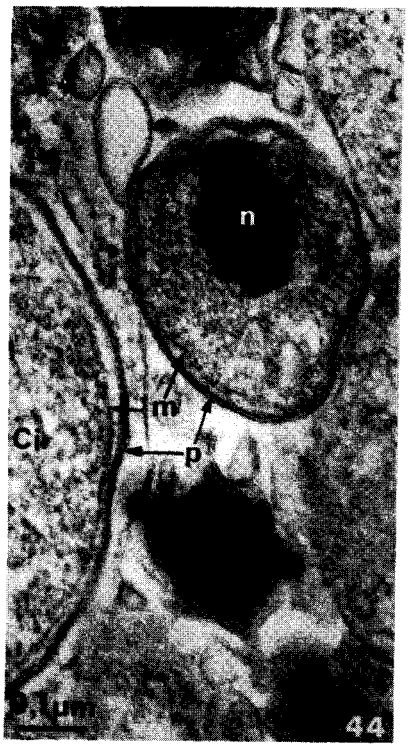
Fig. 43 : Corps initiaux (X 90000)

Fig. 44 : Corps intermédiaire avec nucléoïde central et deux enveloppes p et m (X 90000)

Fig. 45 : Corps élémentaires : une seule enveloppe est ici visible avec la double fixation (X 90000)


Cg
Ci
Ce
N
1 µm

43


n
m
Ci
p
0.1 µm
44

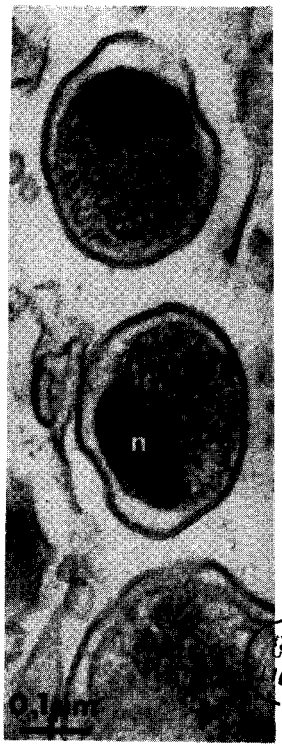

n
0.1 µm

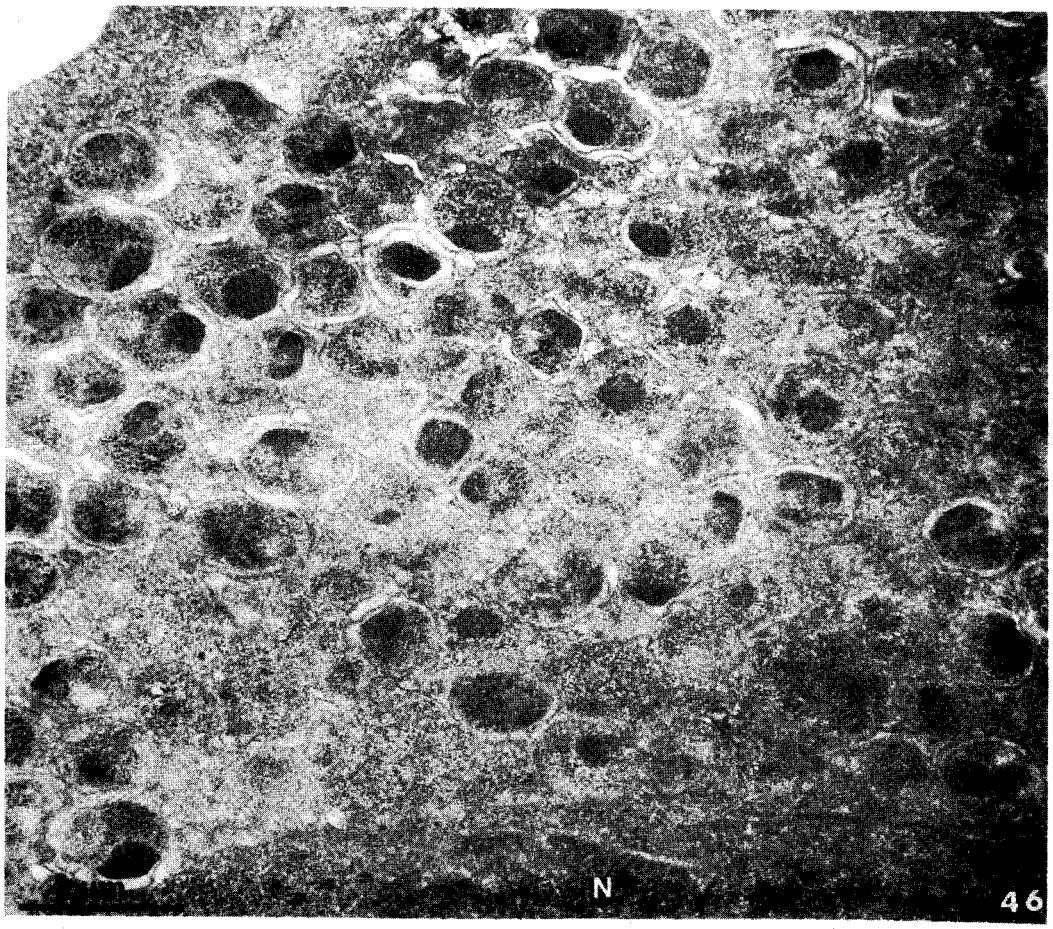
PLANCHE X

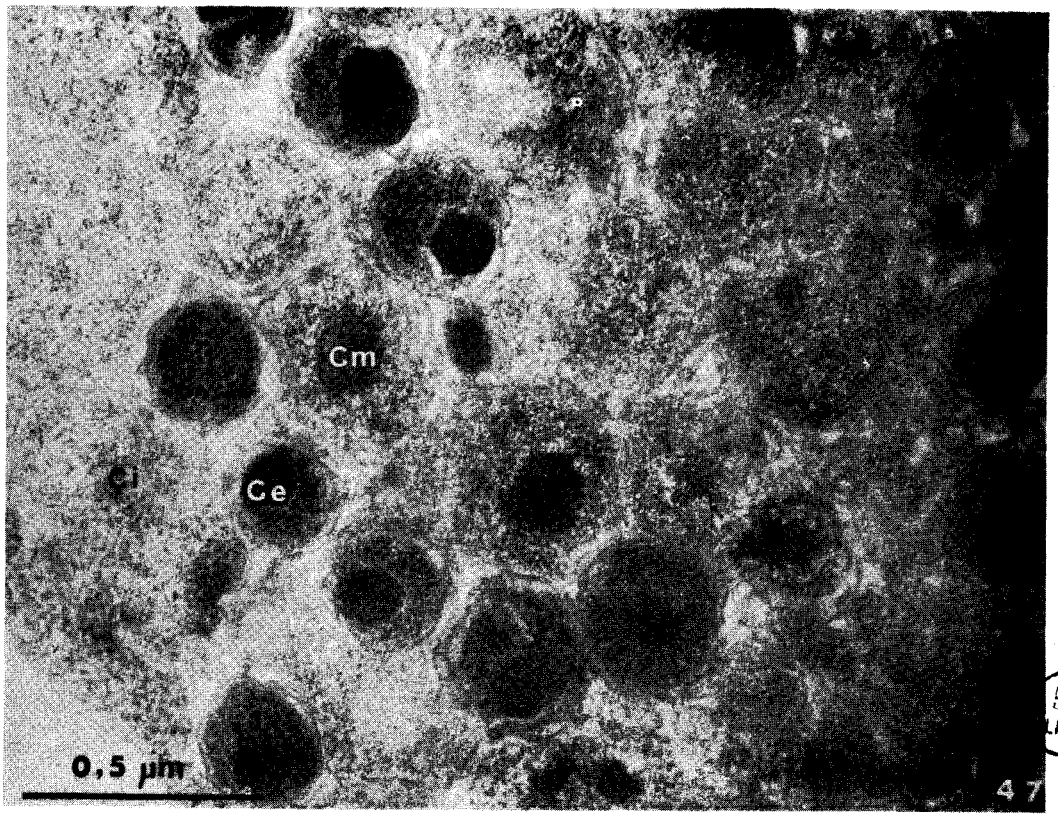
INFECTION DE CELLULES HELA 229 PAR LA SOUCHE T 13 DE PSITTACOSE

Les inclusions très compactes sont constituées de corps initiaux (Ci), de corps intermédiaires (Cm) et de corps élémentaires (Ce). Les corps serrés les uns contre les autres sont de contours irréguliers.

Fig. 46 - X 21000

Fig. 47 - X 63750



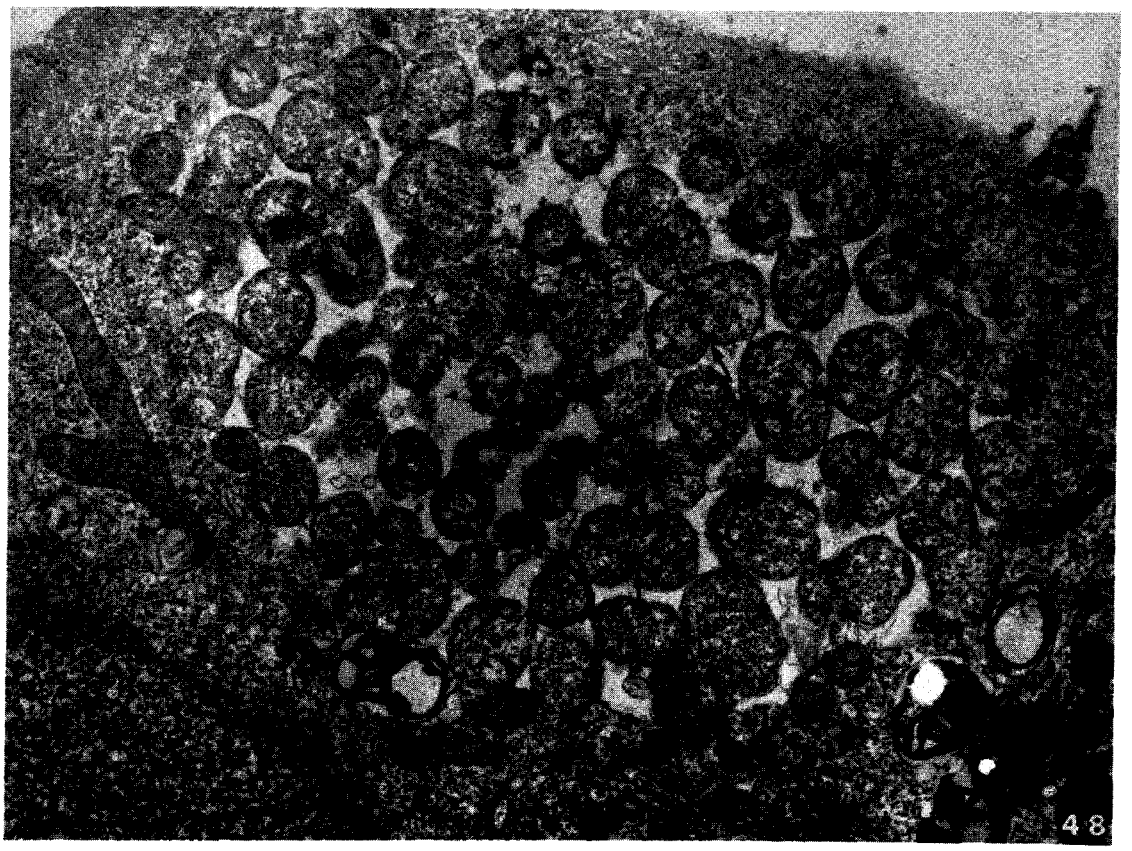


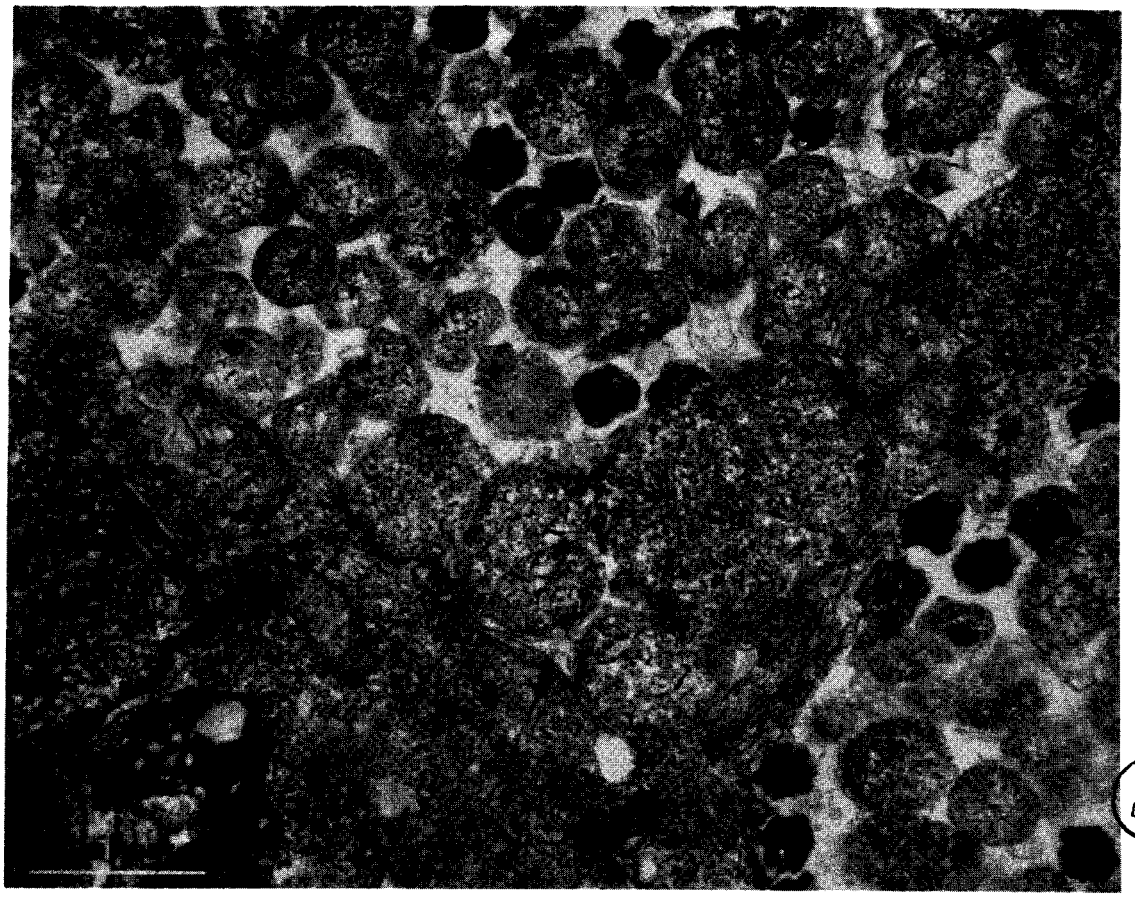
BUS
LILLE

PLANCHE XI

SOUCHE Q 18 D'AVORTEMENT DE LA BREBIS CULTIVEE SUR CELLULES HELA 229

Dans la région paranucléaire, l'inclusion est constituée de corps initiaux dont certains présentent un étranglement médian (↑) (Fig. 48 - X 16500). Plusieurs inclusions peuvent se développer au sein d'une même cellule. La membrane vacuolaire est visible en certains points (↑). Des fibrilles (f) sont présentes au voisinage des inclusions (Fig. 49 - X 23000).





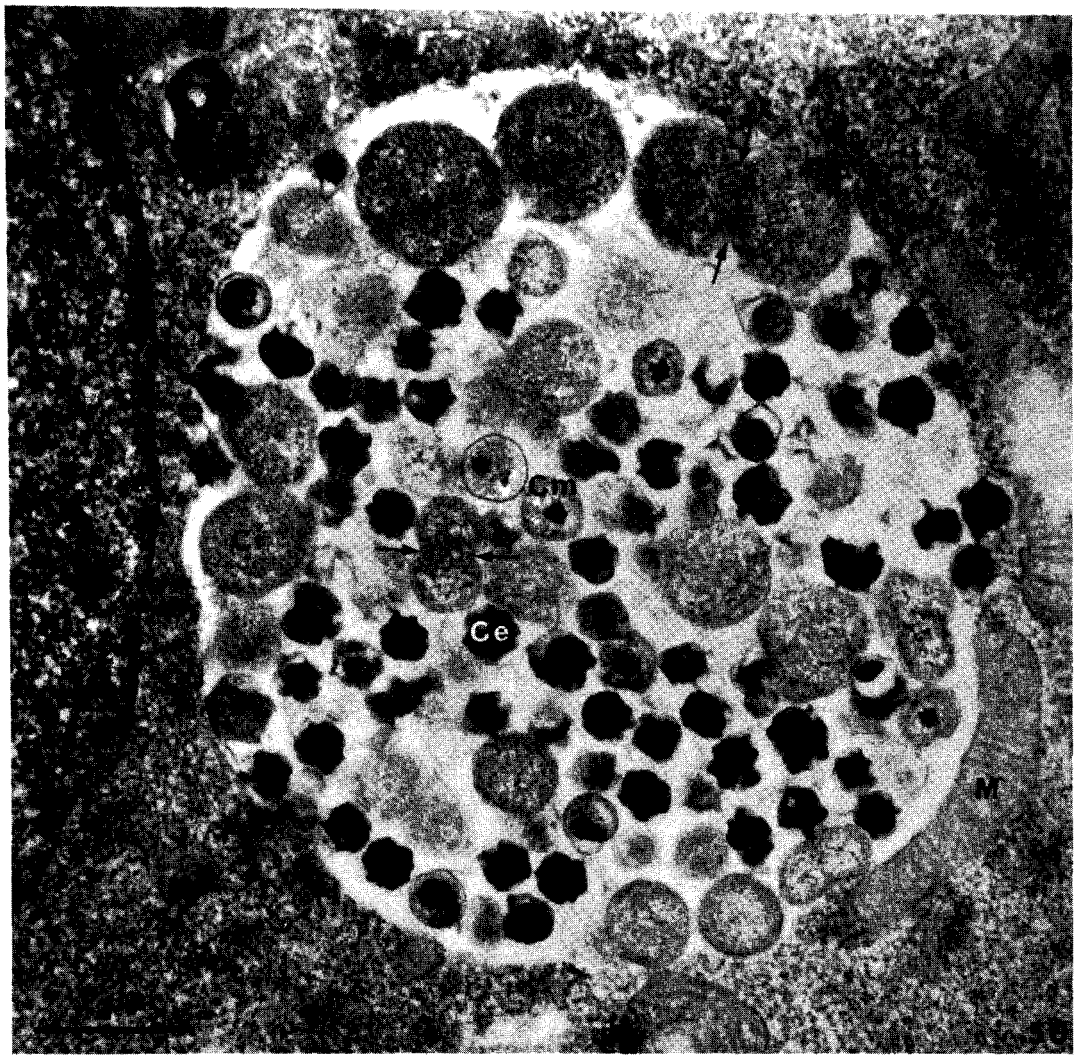
BMS LILLE

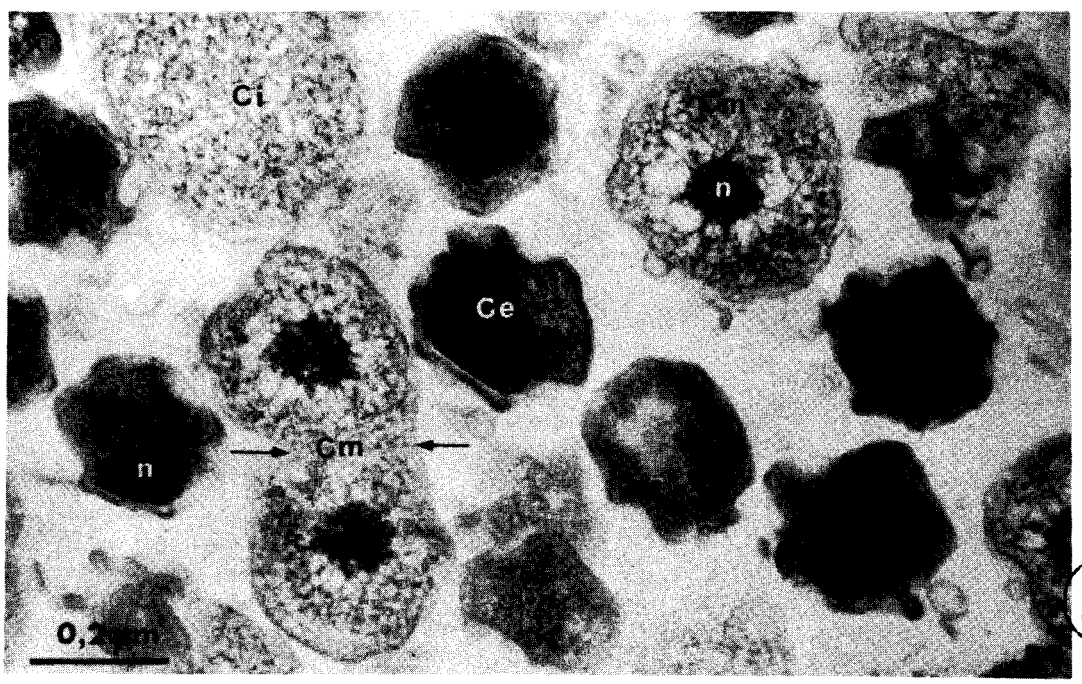
PLANCHE XII

CELLULES HELA 229 INFECTEES AVEC LA SOUCHE Q 18

A la 96ème heure, les vacuoles contiennent peu de corps initiaux (Ci), quelques corps intermédiaires (Cm) et beaucoup de corps élémentaires (Ce) qui seront à l'origine d'un nouveau cycle infectieux. On note une mitochondrie (M) au contact de l'inclusion (Fig. 50 - X 21000).

Fig. 51 : Corps initiaux (Ci), corps intermédiaires (Cm) capables de se diviser et corps élémentaires (Ce) de l'agent de l'avortement enzootique des brebis (X 90000).



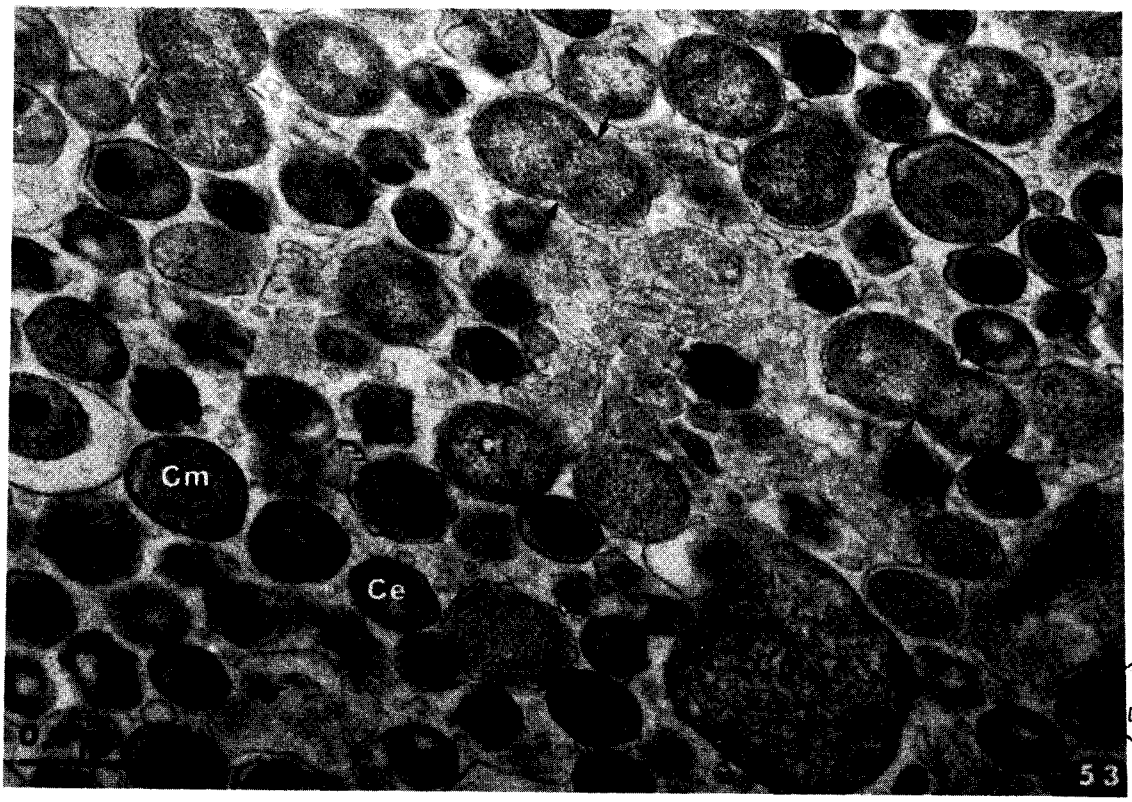


BUS LILLE

PLANCHE XIII

SOUCHE D 41 D'AVORTEMENT DE BREBIS SUR CELLULES HELA 229

L'inclusion intracytoplasmique (V) est située dans la région paranucléaire (Fig. 52 - X 16500). On y retrouve des corps initiaux (Ci) dont certains sont en division (↑), des corps intermédiaires (Cm), des corps élémentaires (Ce) et de rares corps géants (Cg) (Fig. 53 - X 28750).



BUS LILLE

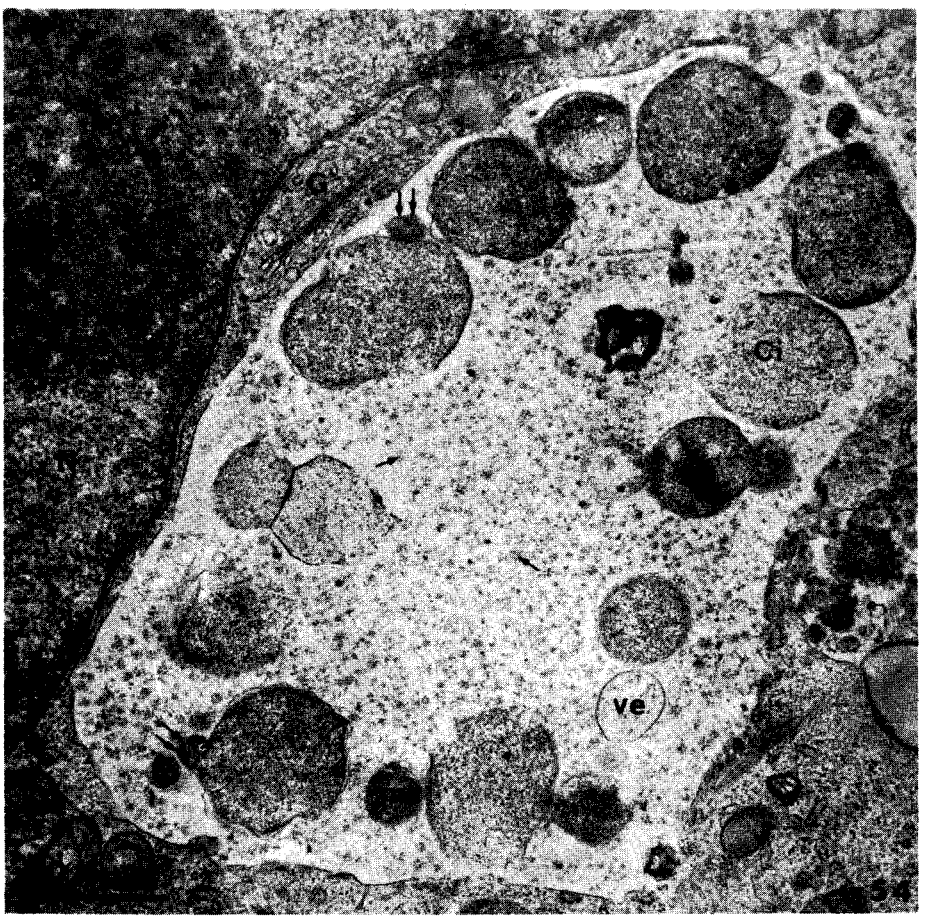
PLANCHE XIV

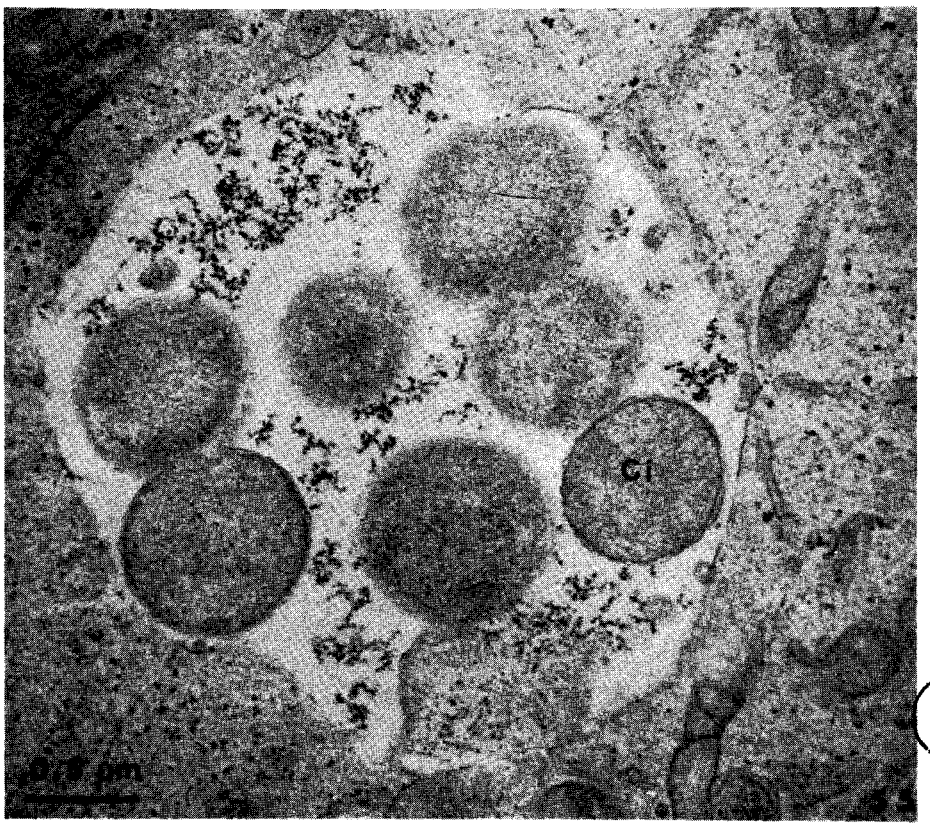
INFECTION DE CELLULES HELA PAR LA SOUCHE MRC 4 DE CONJONCTIVITE A INCLUSIONS

A la 24ème heure les inclusions de type épars, constituées de corps initiaux (Ci) et de "corps miniatures" (mc) contiennent des rosettes de glycogène (↑) et des formations vésiculaires (ve). Certains corps initiaux bourgeonnent (↑↑).

Fig. 54 : Coupe contrastée à l'acétate d'uranyle et au citrate de Plomb (X 3600)

Fig. 55 : Méthode de SELIGMAN modifiée par THIERY (X 30000).





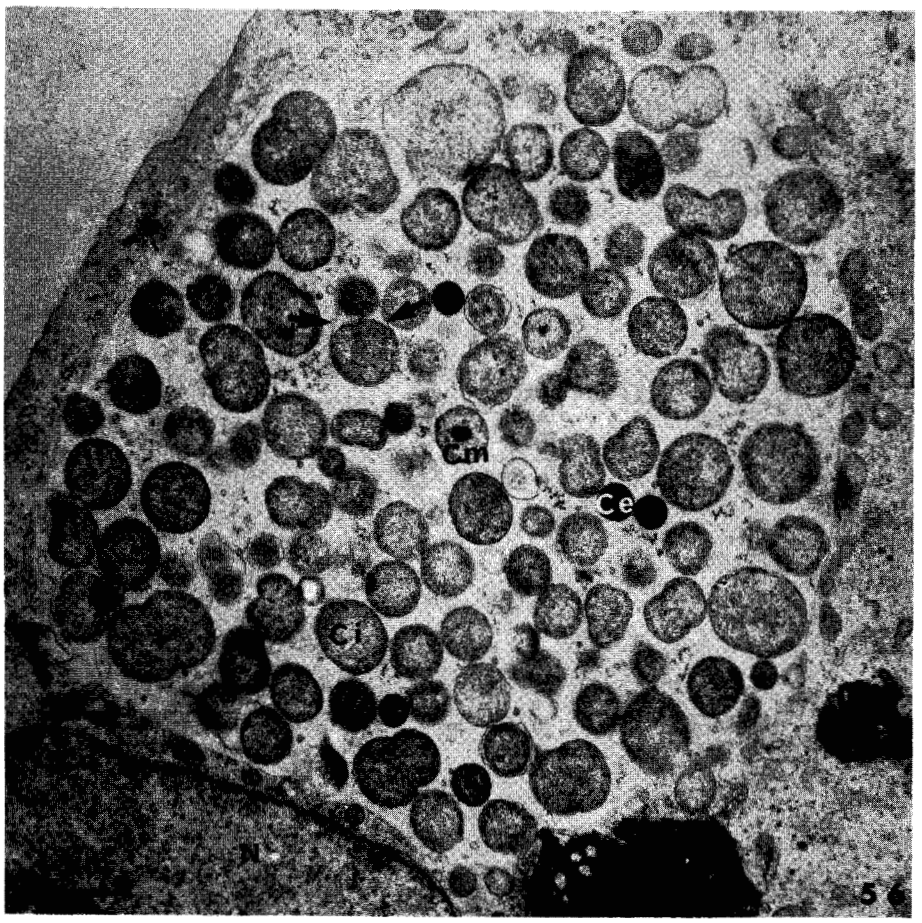
BUS LILLE

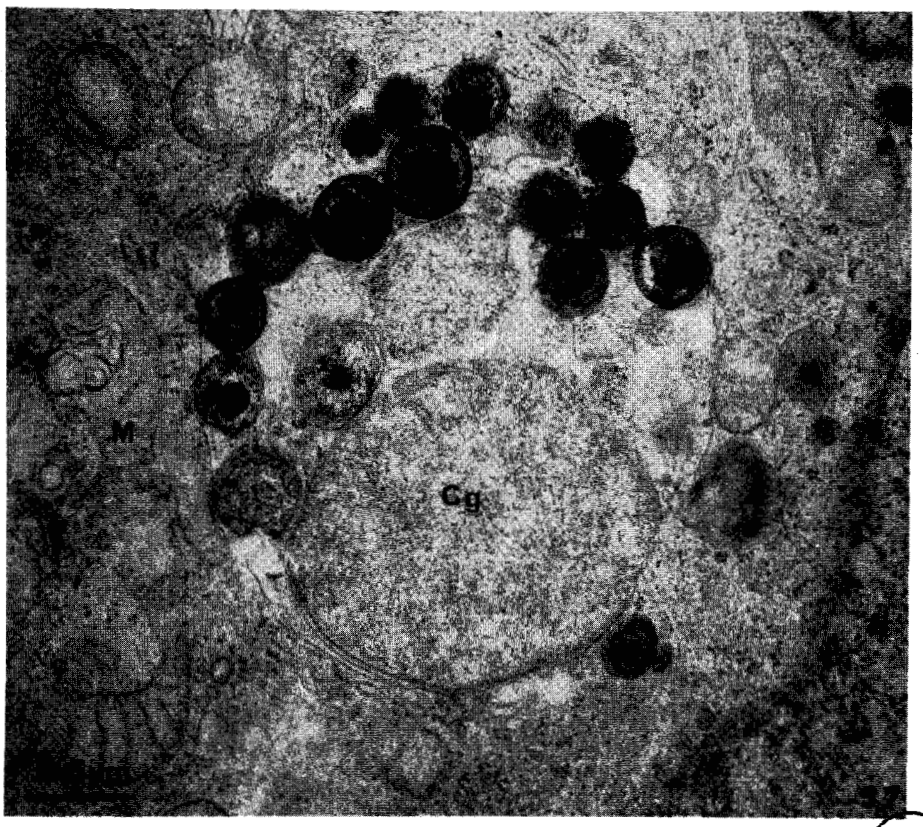
PLANCHE XV

SOUCHES MRC 4 DE CONJONCTIVITE A INCLUSIONS

- 48 heures après l'inoculation de celles KB, l'inclusion contient encore de nombreux corps initiaux (Ci). Peu de corps intermédiaires (Cm) et élémentaires (Ce) sont formés. Les "corps miniatures" (mc) semblent provenir du bourgeonnement des corps initiaux (↑) (Fig. 56 - X 13000).

- Sur cellules HeLa, l'inclusion contient des corps intermédiaires, quelques corps élémentaires plus petits et un corps géant (Cg) (Fig. 57 - X 26000).



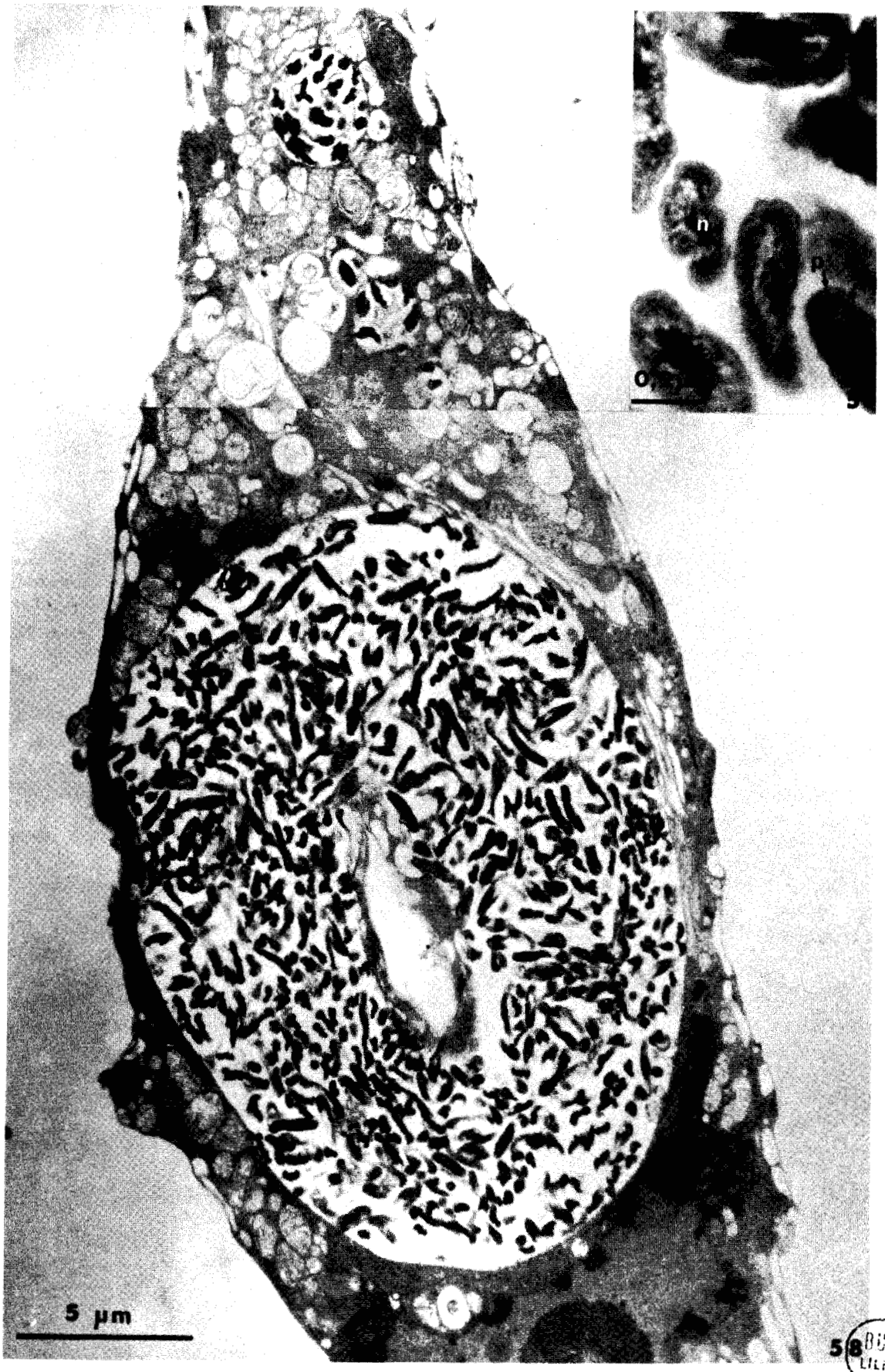


BUS
LILLE

PLANCHE XVI

SOUCHE D'AVORTEMENT DE VACHE SUR CELLULES HELA 229

Des vacuoles de taille très différente parasitent le cytoplasme de la cellule (Fig. 58 - X 6000). Les corps d'allure rickettsienne qu'elles contiennent, sont polymorphes, entourés par une paroi (p) et une membrane (m) et possèdent un nucléoïde (n) dense aux électrons (Fig. 59 - Fig. 63750).



58

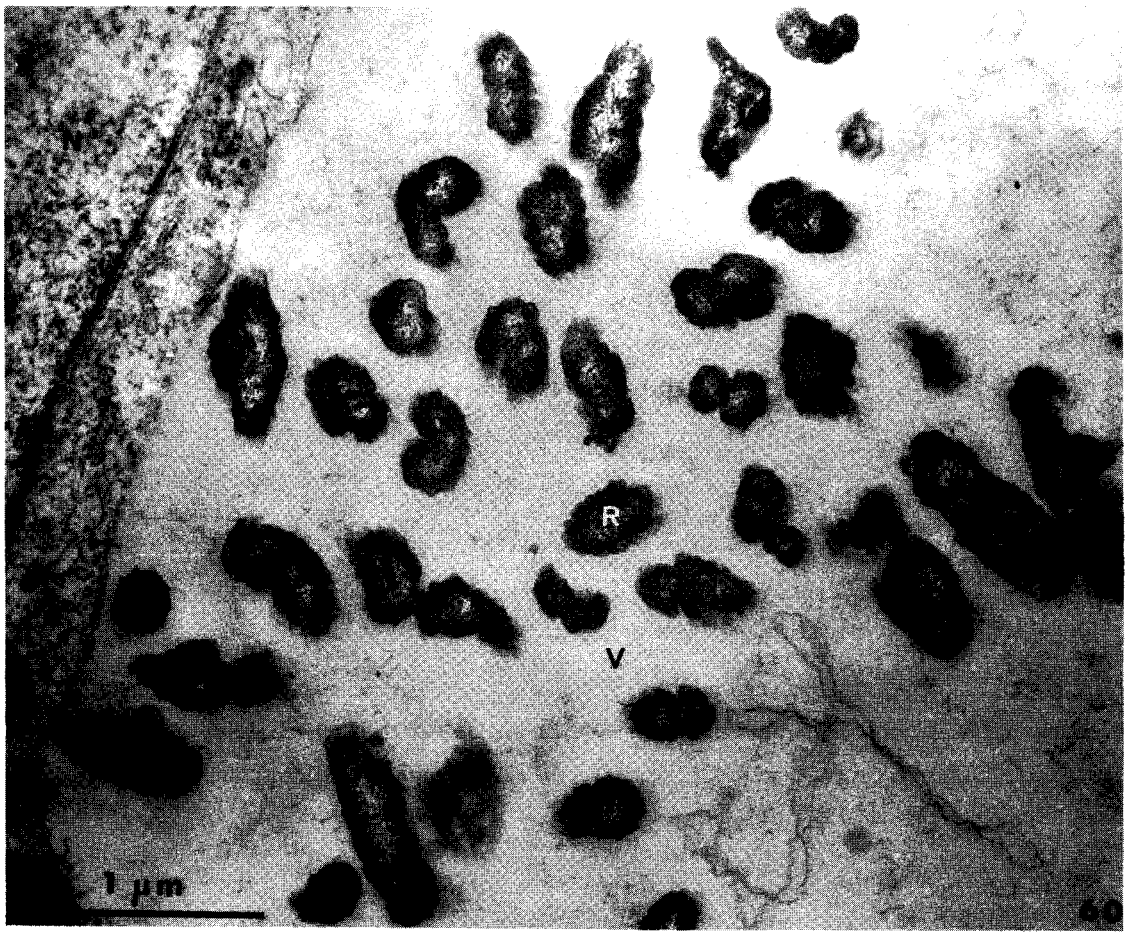
BUS LILLE

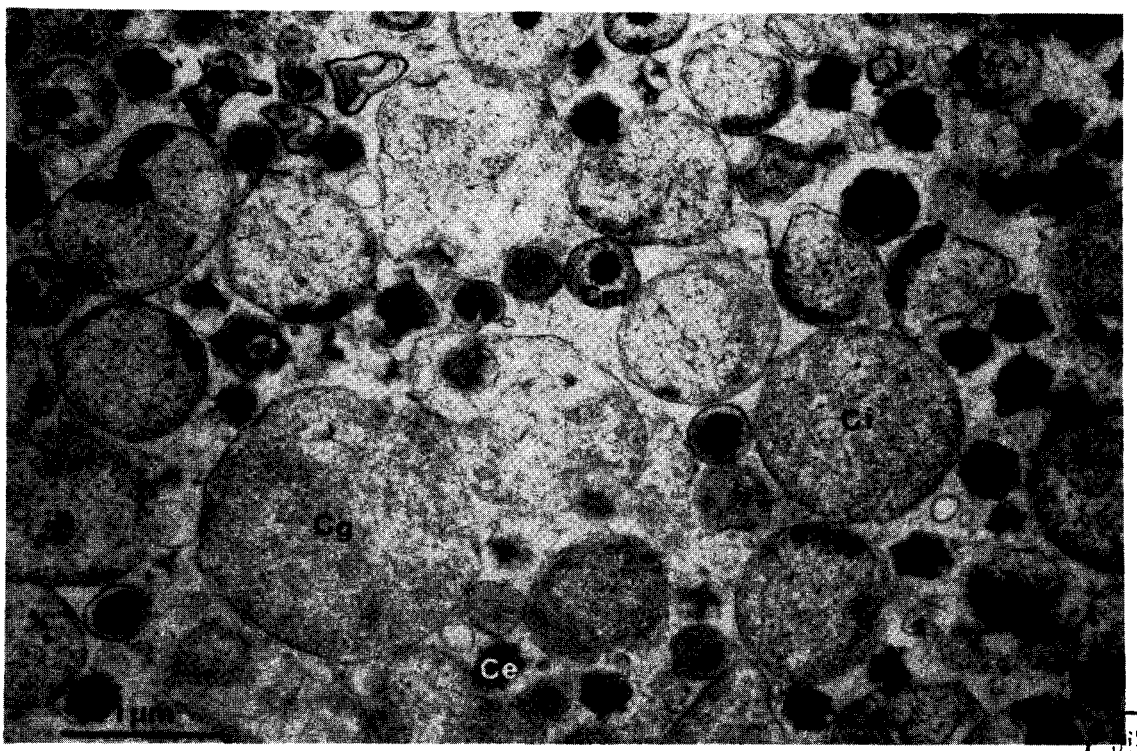
PLANCHE XVII

COMPARAISON DES AGENTS D'ORIGINE AVIAIRE

Fig. 60 : Souche Roumaine sur cellules L : type Coxiella burneti : notez les corps d'allure rickettsienne (R), polymorphiques mais tous de structure identique (X 28750).

Fig. 61 : Souche Loth d'ornithose sur cellules HeLa 229 : type Chlamydia psittaci : notez les 3 types de corps:initiaux (Ci) intermédiaires (Cm) et élémentaires (Ce) ainsi que les corps géants (Cg) (X 21000)





BUS LILLE

PLANCHE XVIII

COMPARAISON SUR CELLULES HELA 229 DES SOUCHES DE CHLAMYDIA PSITTACI D'ORIGINE AVIAIRE ET MAMMALIENNE

(X 43000)

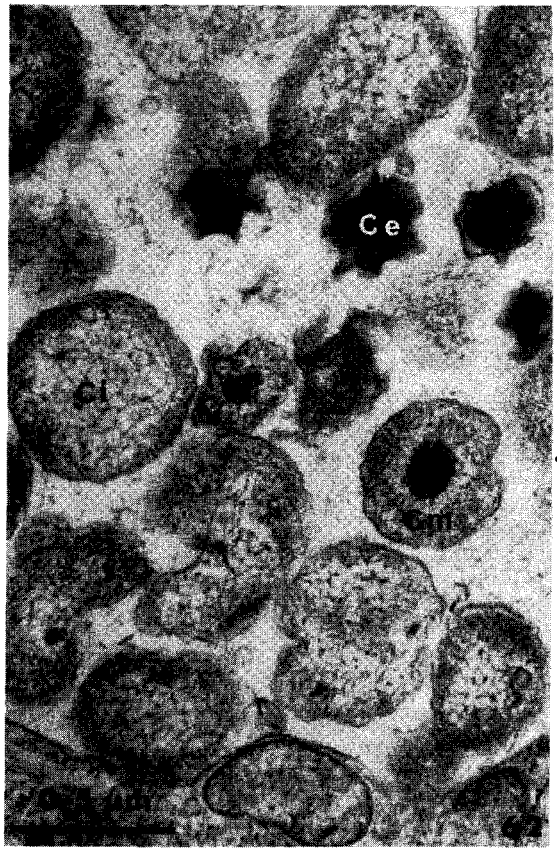
Notez chez toutes les souches la présence des 3 types de corps Ci, Cm et Ce.

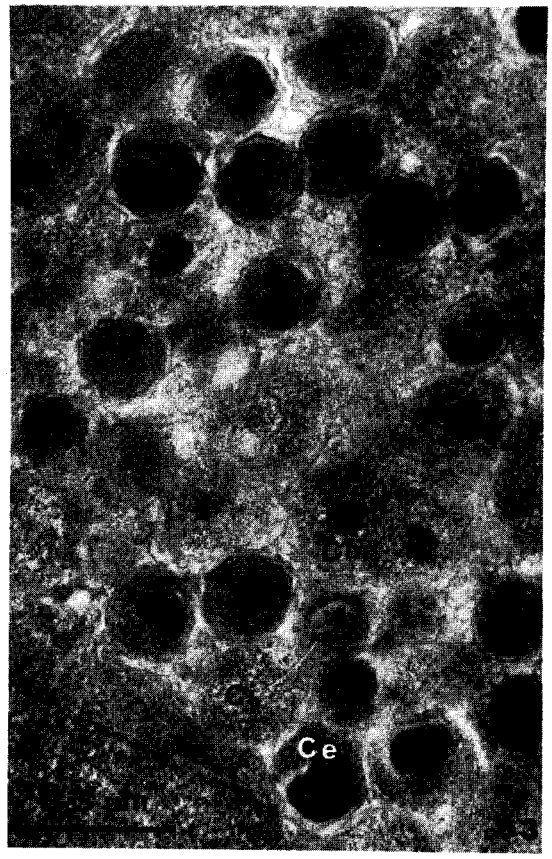
Fig. 62 : souche Loth d'ornithose

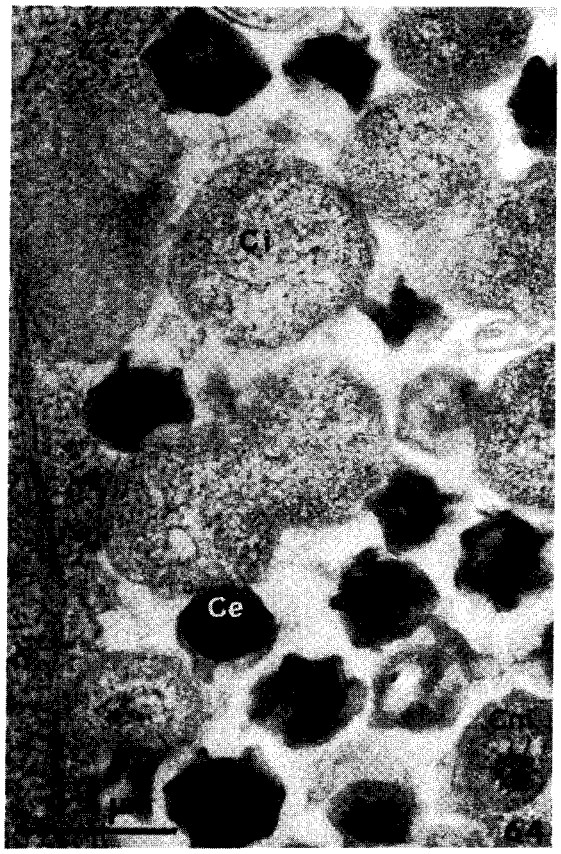
Fig. 63 : souche T 13 de psittacose

Fig. 64 : souche Q 18 d'avortement de brebis

Fig. 65 : souche D 41 d'avortement de brebis


Ce
Ci
Cm


Ce


Ci
Ce
Cm

Cm
Ce
Ci

PLANCHE XIX

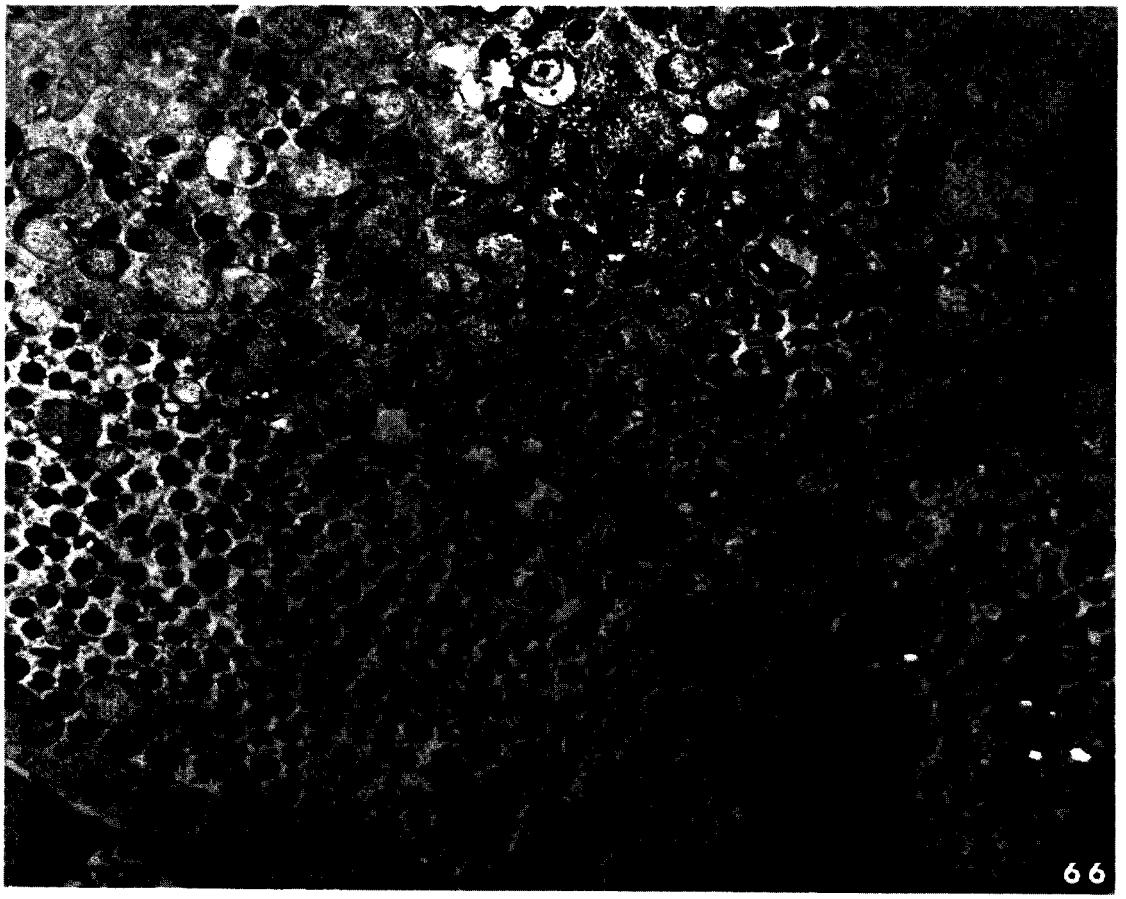
COMPARAISON DES SOUCHES DE CHLAMYDIA PSITTACI ET DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS

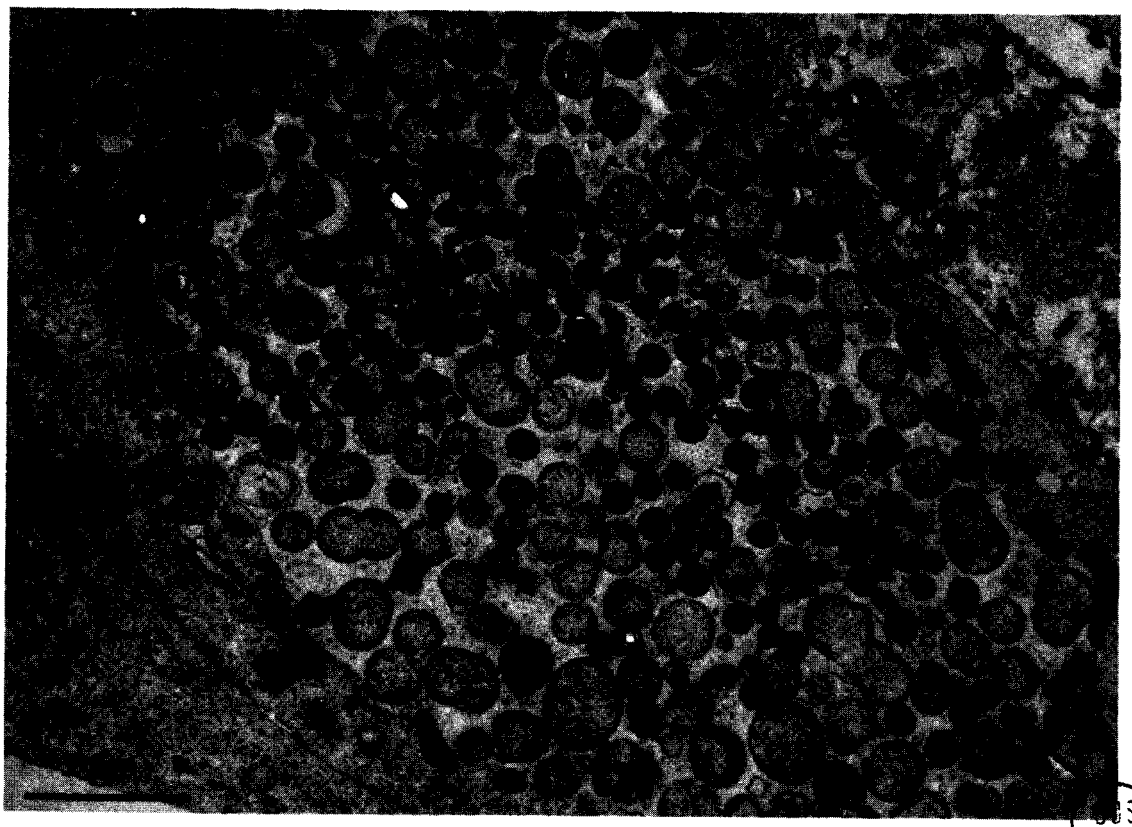
Fig. 66 : Souche Loth d'ornithose sur cellules HeLa 229.

Les inclusions sont diffuses et irrégulières (X 7400)

Fig. 67 : Souche MRC 4 de conjonctivite à inclusions sur cellules KB.

L'inclusion compacte est "rigide", bien limitée (X 10800)





LILLE