

N° d'ordre : 515

50376
1981
HH

50376
1981
44

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Jean-François DUBREMETZ

LE ZOÏTE DES COCCIDIES : CYTOLOGIE, BIOCHIMIE, PHYSIOLOGIE ET INTERACTIONS AVEC LA CELLULE HÔTE



Présentée le 30 avril 1981 devant la Commission d'Examen

JURY	MM.		
	E. VIVIER		Université de Lille I
	J. KREMBEL		
	P. DE PUYTORAC		Université de Clermont-Ferrand
	H. MEHLHORN		Université de Düsseldorf
	J.F. RYLEY		Imperial Chemical Industries Ltd, Grande-Bretagne
	J. SCHREVEL		Université de Poitiers
	W. TRAGER		Rockefeller University, New-York

A Guillaume
Anne Caroline
Aude
et Clotilde

et à Marie Madeleine,
qui m'a supporté.

Cette thèse a été réalisée sous la direction du Professeur E. VIVIER, Université de Lille I.

Je remercie ceux qui, responsables de laboratoires, m'ont accordé leur confiance et laissé accéder aux installations qui leurs étaient confiées.

Je remercie ceux qui, détenteurs de la connaissance, ont eu la patience de me faire partager leur savoir ou leur savoir-faire.

Que tous ceux qui ont participé à la réalisation du travail rapporté dans ce mémoire trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et de mon amitié.

Que ceux enfin qui ont accepté la tâche de juger cette contribution soient assurés de ma gratitude.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	2
1 ; MATERIEL ET METHODES.....	5
1.1. MATERIELS BIOLOGIQUES.....	6
1.1.1. <u>MATERIELS UTILISES, RAPPEL DES CYCLES..</u>	6
1.1.1.1. Genre <i>Eimeria</i>	
1.1.1.2. Genre <i>Sarcocystis</i>	
1.1.1.3. Genre <i>Toxoplasma</i>	
1.1.1.4. Genre <i>Plasmodium</i>	
1.1.2. <u>OBTENTION ET ENTRETIEN DES PARASITES...</u>	9
1.1.2.1. <i>Eimeria</i>	
1.1.2.1.1. Obtention des oocystes	
1.1.2.1.2. Sporulation	
1.1.2.1.3. Purification des oocystes	
1.1.2.2. <i>Sarcocystis</i>	
1.1.2.3. <i>Toxoplasma</i>	
1.1.2.4. <i>Plasmodium</i>	
1.2. TECHNIQUES.....	12
1.2.1. <u>ISOLEMENT ET PURIFICATION DES ZOITES...</u>	12
1.2.1.1. Sporozoïtes d' <i>Eimeria</i>	
1.2.1.1.1. Stérilisation des oocystes	
1.2.1.1.2. Broyage des oocystes	
1.2.1.1.3. Excystation	
1.2.1.1.4. Purification sur fibres	
1.2.1.2. Mérozoïtes d' <i>Eimeria</i>	
1.2.1.3. Bradyzoïtes de <i>Sarcocystis tenella</i>	
1.2.1.4. Tachyzoïtes de <i>Toxoplasma</i>	
1.2.1.4.1. Isolement à partir de l'ascite	
1.2.1.4.2. Isolement à partir de cellules en culture	
1.2.2. <u>CULTURES CELLULAIRES.....</u>	16
1.2.2.1. Cellules utilisées	
1.2.2.2. Techniques de culture	
1.2.2.2.1. Entretien des cellules	
1.2.2.2.2. Cryopreservation	
1.2.2.2.3. Culture des Coccidies	

1.2.3.	<u>MICROSCOPIE PHOTONIQUE</u>	18
1.2.4.	<u>MICROSCOPIE ELECTRONIQUE</u>	18
1.2.4.1.	Techniques classiques de préparation	
1.2.4.1.1.	Fixation	
1.2.4.1.2.	Déshydratation et inclusion	
1.2.4.1.3.	Coupes	
1.2.4.1.4.	Cas particulier des cultures incluses <i>in situ</i>	
1.2.4.2.	Cryofracture	
1.2.4.3.	Observation, exploitation des résultats	
1.2.5.	<u>FRACTIONNEMENT CELLULAIRE</u>	20
1.2.5.1.	Homogénéisation	
1.2.5.2.	Ultracentrifugation et récupération des fractions	
1.2.6.	<u>ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE</u>	21
1.2.7.	<u>MARQUAGE RADIOACTIF</u>	22
1.2.7.1.	Iodination des protéines superficielles	
1.2.7.2.	Incorporation d'acides aminés radioactifs	
1.2.7.3.	Détection des protéines marquées après électrophorèse	
1.2.7.3.1.	Autoradiographie	
1.2.7.3.2.	Fluorographie	
2 :	<u>CYTOLOGIE ULTRASTRUCTURALE DES ZOITES DE COCCIDIES ; STRUCTURE, GENESE ET INTERACTION AVEC LA CELLULE HOTE</u>	24
2.1.	<u>CYTOLOGIE DES ZOITES DE COCCIDIES</u>	25
2.1.1.	<u>LA PAROI</u>	25
2.1.2.	<u>LE COMPLEXE APICAL</u>	26
2.1.2.1.	Le conoïde	
2.1.2.2.	Les microtubules sous pelliculaires	
2.1.2.3.	Les anneaux apicaux	
2.1.2.4.	La vésicule apicale	
2.1.2.5.	Les rhoptries	
2.1.2.6.	Les micronèmes	

2.1.3.	<u>LES ORGANITES ET INCLUSIONS CYTOPLASMIQUES ET LE NOYAU</u>	28
2.1.3.1.	Les mitochondries	
2.1.3.2.	L'appareil de Golgi	
2.1.3.3.	L'ergastoplasme	
2.1.3.4.	Les grains d'amylopectine	
2.1.3.5.	Les vésicules plurimembranaires	
2.1.3.6.	Les corps paranucléaires	
2.1.3.7.	Les granules denses	
2.1.3.8.	Le noyau	
2.2.	GENESE DES ZOITES.....	30
2.2.1.	<u>EIMERIA NECATRIX</u>	
2.2.2.	<u>EIMERIA BOVIS</u>	
2.2.3.	<u>DISCUSSION</u>	31
2.3.	INVASION DE LA CELLULE HOTE.....	34
2.3.1.	<u>ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE L'INVASION DE LA CELLULE HOTE PAR SARCOCYSTIS TENELLA ET TOXOPLASMA GONDII...</u>	34
2.3.1.1.	<i>Sarcocystis tenella</i>	
2.3.1.2.	<i>Toxoplasma gondii</i>	
2.3.2.	<u>DISCUSSION</u>	38
2.3.2.1.	Spécificité	
2.3.2.2.	Devenir du plasmalemme de la cellule hôte au cours de la pénétration	
2.3.2.3.	Invasion active ou phagocytose	
2.3.2.4.	Y a-t-il exocytose lors de la pénétration	
2.4.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	47
3 :	ARCHITECTURE MOLECULAIRE ET PHYSIOLOGIE DE LA PELLICULE DES ZOITES DE COCCIDIES.....	48
3.1.	ARCHITECTURE MOLECULAIRE DE LA PELLICULE.....	49

3.1.1.	<u>CRYOFRACTURE</u>	49
3.1.1.1.	Le sporozoïte d' <i>Eimeria nieschulzi</i>	
3.1.1.2.	Le sporozoïte de <i>Plasmodium yoelii nigeriensis</i>	
3.1.1.3.	Schizogonie chez <i>Eimeria necatrix</i>	
3.1.1.4.	Apport de l'ombrage rotatif après cryofracture	
3.1.2.	<u>ANALYSE DES GHOSTS DE ZOITES DE SARCOCYSTIS</u>	53
3.2.	OBSERVATIONS SUR LA PHYSIOLOGIE DE LA PELLICULE DES ZOITES..	53
3.2.1.	<u>MOTILITE SUPERFICIELLE CHEZ LE SPOROZOITE D'EIMERIA NIESCHULZI</u>	54
3.2.1.1.	Mouvements des sporozoïtes : interaction avec un support	
3.2.1.2.	Interaction des sporozoïtes avec des éléments figurés (hématies)	
3.2.1.3.	Interaction des sporozoïtes avec une molécule chargée positivement : la ferritine cationisée	
3.2.2.	<u>DECLENCHEMENT DE LA MOTILITE DES ZOITES DE SARCOCYSTIS TENELLA PAR LA TRYPSINE</u>	57
3.2.2.1.	Activation enzymatique des zoïtes	
3.2.2.2.	Modifications membranaires lors de l'activation	
3.2.2.2.1.	Cryofracture	
3.2.2.2.2.	Electrophorèse, radioiodination superficielle	
3.3.	DISCUSSION.....	59
3.3.1.	<u>FORMATION DE CAPES</u>	59
3.3.1.1.	Charges superficielles des zoïtes	
3.3.1.2.	"Capping"	
3.3.1.3.	"Capping" d'Anticorps chez les Protozoaires parasites	
3.3.1.4.	"Capping" de polycations	
3.3.2.	<u>MOTILITE SUPERFICIELLE</u>	65
3.3.2.1.	Existence	
3.3.2.2.	Motilité superficielle et pénétration	
3.3.2.3.	Mécanisme possible	

4.:	FRACTIONNEMENT CELLULAIRE DES ZOITES ET ANALYSE DU CONTENU PROTEIQUE DES ORGANITES APICAUX.....	69
4.1.	FRACTIONNEMENT CELLULAIRE DES ZOITES.....	71
4.1.1.	<u>BRADYZOITES DE <i>SARCOCYSTIS TENELLA</i></u>	71
4.1.1.1.	Homogénéisation	
4.1.1.2.	Séparation des organites	
4.1.1.2.1.	Sédimentation différentielle	
4.1.1.2.2.	Purification des organites	
4.1.1.3.	Analyse morphologique des fractions subcellulaires	
4.1.1.3.1.	Les pellicules	
4.1.1.3.2.	Les granules denses	
4.1.1.3.3.	Les micronèmes	
4.1.2.	<u>SPOROZOITES D'<i>EIMERIA NIESCHULZI</i></u>	74
4.1.2.1.	Homogénéisation	
4.1.2.2.	Séparation des organites	
4.1.2.2.1.	Sédimentation différentielle	
4.1.2.2.2.	Purification des organites	
4.1.2.2.2.1.	Fractionnement du sédiment 100 000 g _{max} x min	
4.1.2.2.2.2.	Purification des rhoptries et des micronèmes à partir du sur- nageant 100 000 g _{max} x min	
4.1.2.3.	Analyse morphologique des fractions purifiées	
4.1.2.3.1.	Les pellicules	
4.1.2.3.2.	Les rhoptries	
4.1.2.3.3.	Les micronèmes	
4.1.3.	<u>MEROZOITES D'<i>EIMERIA</i></u>	78
4.1.3.1.	Mérozoïtes d' <i>Eimeria nieschulzi</i>	
4.1.3.2.	Mérozoïtes d' <i>Eimeria necatrix</i>	
4.1.4.	<u>TACHYZOITES DE <i>TOXOPLASMA</i></u>	79
4.2.	ANALYSE DU CONTENU PROTEIQUE DES FRACTIONS PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE SDS.....	80
4.2.1.	<u>ZOITES DE <i>SARCOCYSTIS</i></u>	80
4.2.1.1.	Les micronèmes	
4.2.1.2.	Les granules denses	
(4.2.1.3.	Les pellicules)	

4.2.2.	<u>ZOITES D'EIMERIA NIESCHULZI</u>	81
4.2.2.1.	Micronèmes	
4.2.2.2.	Rhoptries	
4.3.	DISCUSSION.....	82
4.3.1.	<u>FRACTIONNEMENT CELLULAIRE</u>	82
4.3.2.	<u>CARACTERISTIQUES DES ORGANITES</u>	84
4.3.2.1.	Micronèmes	
4.3.2.2.	Rhoptries	
4.3.2.3.	Granules denses	
4.3.2.4.	Ghosts	
4.3.3.	<u>PERSPECTIVES</u>	86
5 :	ESSAI DE MISE EN EVIDENCE D'UNE EXOCYTOSE ASSOCIEE A LA PENETRATION DES ZOITES DE TOXOPLASMA DANS LA CELLULE HOTE IN VITRO	88
5.1.	PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	90
5.2.	RESULTATS.....	91
5.2.1.	<u>INCORPORATION DE LEUCINE TRITIEE DANS LES PROTEINES DU TOXOPLASME</u>	91
5.2.1.1.	Aspect quantitatif	
5.2.1.2.	Aspect qualitatif	
5.2.2.	<u>INTERACTION AVEC LES CELLULES</u>	91
5.3.	DISCUSSION.....	92
5.3.1.	<u>MAROUAGE RADIOACTIF</u>	92
5.3.2.	<u>EXOCYTOSE</u>	93
	CONCLUSION.....	95
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	98

LEXIQUE, ABBREVIATIONS

Texte

- . Sporozoïte : zoïte issu de la sporulation
- . Mérozoïte, schizozoïte : zoïte issu de la schizogonie
- . Tachyzoïte : zoïte à multiplication rapide, répétée (FRENKEL, 1975)
- . Bradyzoïte : zoïte de kyste intratissulaire d'attente, à multiplication lente (FRENKEL, 1975)
- . g_{\max} x min : accélération au rayon maximum.

Planches

- A : amylopectine
- a : anneaux apicaux
- CH : cellule hôte
- Co : Conoïde
- ci : complexe membranaire interne
- D : granule dense
- er : ergastoplasme
- G : dictyosome
- M : mitochondrie
- m : micronèmes
- MVP : membrane de la vacuole parasitophore
- N : noyau
- P : plasmalemme
- pR : pédoncule de rhoptrie
- R : rhoptrie
- RB : corps réfringent
- t : microtubules sous pelliculaires
- v : vésicule
- va : vésicule apicale

INTRODUCTION

Il est au sein des Protozoaires un groupe d'organismes tous parasites et responsables de nombreuses affections humaines (Paludisme, Toxoplasmose) ou animales (Coccidiose, Sarcosporidiose, Piroplasmose, etc.), qui ont été rassemblés dans le sous embranchement des Sporozoaires. Leur cycle biologique est souvent complexe, pouvant faire alterner des phases de multiplication asexuée (par un processus de division multiple appelé schizogonie) et sexuée (par formation de gamètes et fécondation) (GRASSE, 1953). De ces multiplications sont issues de petites cellules généralement vermiformes dont le rôle est l'invasion d'un nouvel hôte ou la dissémination de l'infection à l'intérieur d'un organisme et qui sont désignées sous le terme général de *zoïtes* (précédé d'un préfixe précisant soit la position dans le cycle : sporozoïte, mérozoïte, soit le mode de formation : schizozoïte, endozoïte, soit encore une autre caractéristique : bradyzoïte, hypnozoïte etc...).

Le progrès des techniques d'investigation morphologique et en particulier l'introduction de la microscopie électronique a entraîné la mise en évidence de la complexité structurale des zoïtes et de l'unité remarquable de leur organisation à travers le groupe (revue par E. PORCHET et E. VIVIER, 1970). C'est ainsi qu'une série de différenciations cytologiques ont été décrites et retrouvées chez la plupart des zoïtes, organisées en un "complexe apical" (J. SENAUD, in N. D. LEVINE, 1970) suffisamment caractéristique pour que certains auteurs veuillent le faire figurer dans le nom du sous embranchement (*Apicomplexa*, N. D. LEVINE, 1970) à la place de la spore, forme de résistance moins universellement représentée au sein de ces Protozoaires.

Le déroulement d'un cycle de Sporozoaire, comme celui de nombreux Protistes implique une succession de phases de différenciation qui sont autant d'illustrations des moyens développés par les êtres unicellulaires pour survivre et se multiplier. L'intérêt de ce groupe est renforcé par le parasitisme obligatoire de ses représentants qui offre la possibilité d'étudier une interaction intime entre deux organismes.

Outre cet aspect fondamental, le parasitisme vient donner un caractère indispensable aux investigations concernant ces Protozoaires : l'homme et les animaux domestiques sont en effet les hôtes de nombreux Sporozoaires

pouvant entraîner des affections graves dont la plus importante est le paludisme qui affecte plus de deux cents millions d'hommes et est responsable d'au moins un million de décès chaque année.

Le champ d'investigations ainsi ouvert est immense car, si les informations descriptives (cycles, cytologie photonique et électronique) accumulées depuis plus d'un siècle sont abondantes, nos connaissances des mécanismes biologiques intervenant chez ces Protozoaires sont encore bien limitées. Leur caractère parasitaire, encore lui, est la cause majeure de cette ignorance : ils sont pendant la majeure partie de leur cycle cachés au sein d'un hôte, difficilement accessibles tant à l'observation qu'à l'expérimentation. Cette caractéristique explique pourquoi les méthodes de développement *in vitro* des Sporozoaires, moyens privilégiés d'étude de la physiologie de ces organismes, suscitent un intérêt tout particulier.

Comme nous l'avons signalé plus haut, l'élément du cycle le plus stable phylogénétiquement est le zoïte, ou stade infectieux. C'est également un point clé du développement, puisque de lui dépend l'installation (ou l'extension) de la parasitose. C'est enfin, si l'on s'intéresse à la différenciation cellulaire, le but ultime de chaque phase du cycle, qu'elle soit sexuée ou non. Comprendre la genèse et la physiologie du zoïte des Sporozoaires revêt donc une importance capitale, tant au plan de la biologie fondamentale qu'à celui de la thérapeutique antiparasitaire.

L'objet de notre travail a été de participer à l'approfondissement de cette compréhension, en nous limitant à un groupe : les Coccidiomorphes, qui ont pour caractéristique essentielle d'être pour la plupart parasites intracellulaires, et au sein desquels se trouvent presque tous les agents des zoonoses ou maladies humaines dues aux Sporozoaires.

Nous avons contribué à l'étude de la cytologie ultrastructurale des zoïtes et de leur genèse et cet aspect sera développé dans un premier chapitre ; il sera suivi de l'analyse cytologique d'un événement capital de la biologie des zoïtes : l'invasion de la cellule hôte.

Dans les chapitres suivants, nous relaterons les résultats obtenus sur la structure et la fonction de deux composants principaux de ces parasites : pellicule et organites apicaux. Nous verrons que tous deux jouent probablement un rôle essentiel dans l'interaction zoïte cellule hôte et que la compréhension de ce phénomène passera nécessairement par l'explication de leurs propriétés respectives.

CHAPITRE 1



MATERIEL ET METHODES

1.1. MATERIELS BIOLOGIQUES

Nous avons utilisé au cours de notre travail plusieurs Coccidimorphes dont la plupart appartiennent aux Eimeridés. Nous en rappellerons brièvement le cycle afin de situer les phases et les stades qui ont été étudiés.

1.1.1. MATERIELS UTILISES, RAPPEL DES CYCLES

1.1.1.1. Genre Eimeria

Nous avons travaillé principalement sur trois espèces d'*Eimeria*

- *Eimeria necatrix* (JOHNSON, 1930) parasite du poulet
- *Eimeria nieschulzi* (DIEBEN, 1924) parasite du rat
- *Eimeria bovis* (ZÜBLIN, 1908) parasite du boeuf.

Les cycles de développement de ces organismes se déroulent dans les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale de l'hôte. Un nombre déterminé de générations schizogoniques est suivi par une phase sexuée qui prélude à la formation de l'oocyste, forme de résistance rejetée dans le milieu externe et à l'intérieur duquel se développent les sporozoïtes.

Les cycles respectifs de ces parasites sont schématisés pages 7 et 8. Nous avons utilisé : la seconde schizogonie d'*Eimeria necatrix* *in vivo*, la première schizogonie d'*Eimeria bovis* *in vitro*, les trois premières générations d'*Eimeria nieschulzi* *in vivo* (et les deux premières *in vitro*).

1.1.1.2. Genre Sarcocystis

Nous avons utilisé *Sarcocystis tenella* (MOULE, 1888). Le cycle des Sarcosporidies n'a été élucidé que très récemment (ROMMEL *et al.*, 1972) et cette découverte a quelque peu bouleversé la nomenclature de ce genre et du genre *Isospora* dont on s'est aperçu que certaines espèces n'étaient que des phases du cycle, plus complexe, de Sarcocystidés. C'est ainsi que pour l'espèce que nous avons étudié a été proposé le nom de *Sarcocystis ovifelis* (HEYDORN *et al.*, 1975), qui recouvre les anciennes espèces *Sarcocystis tenella* et *Isospora bigemina* (FRENKEL *et al.*, 1979). La proposition n'ayant pas encore été acceptée par les instances internationales compétentes, nous ne pourrons l'utiliser, mais seul ce vocable

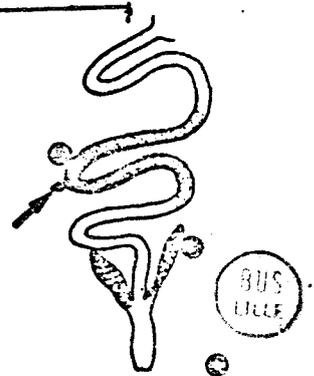
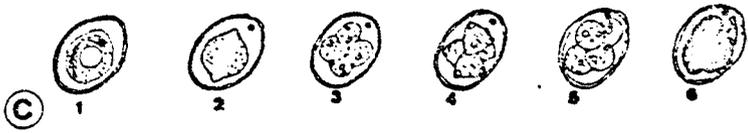
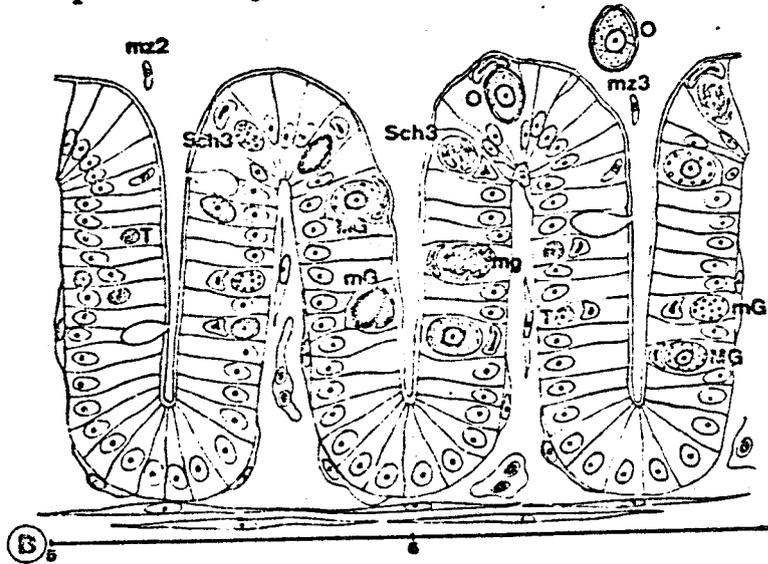
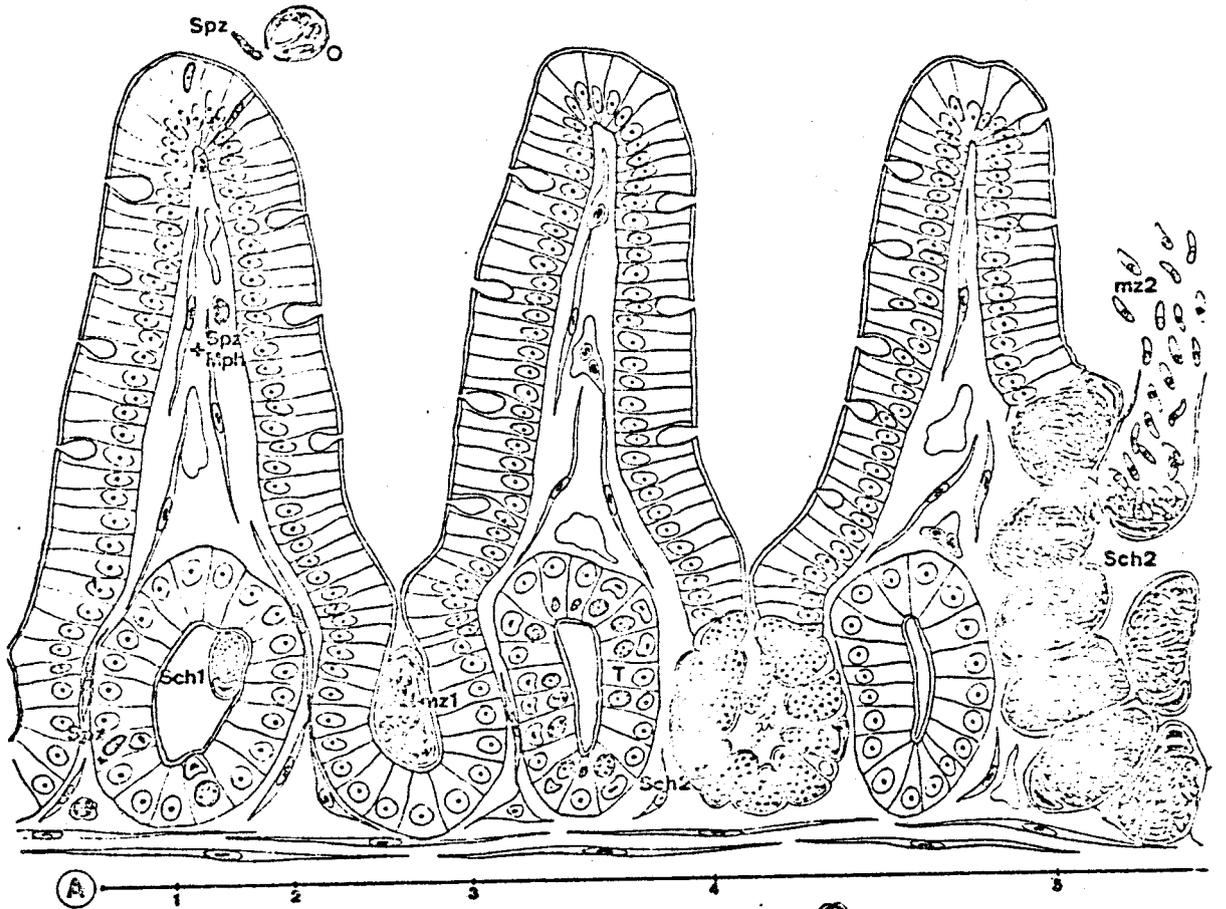
Cycle d'*Eimeria necatrix*

Spz : sporozoïte ; Sch 1, 2, 3 : schizonte 1, 2, 3 ; T : trophozoïte ;
mz 1, 2, 3 : mérozoïte 1, 2, 3 ; MG : microgamétocyte ; MG : macrogamète ;
O : oocyste.

A : schizogonie 1 et 2 (Jejunum)

B : schizogonie 3 et gamétogenèse (Coecum)

C : sporulation.



A, Cycle de *Sarcocystis tenella (ovifelis)* (modifié d'après
H. MEHLHORN et al, 1979)

B, Cycle d'*Eimeria nieschulzi* (d'après LEVINE et IVENS, 1965)

1 à 14 : schizogonies 1, 2, 3.

15 à 21 : gamétogenèse

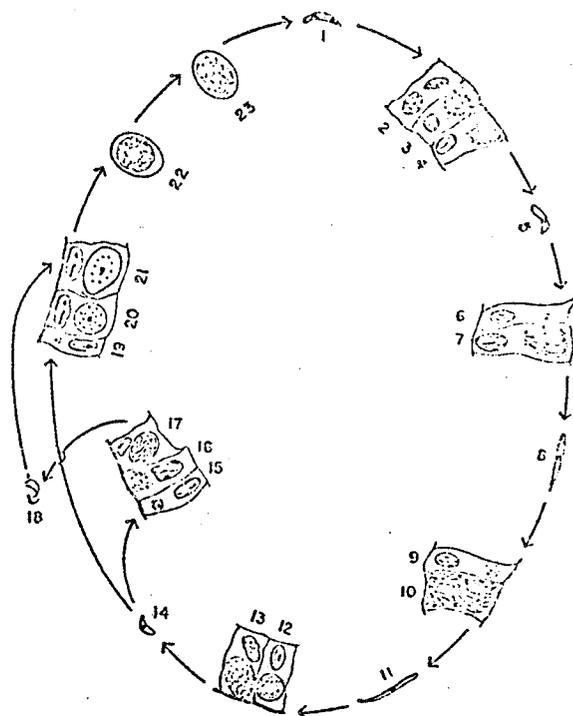
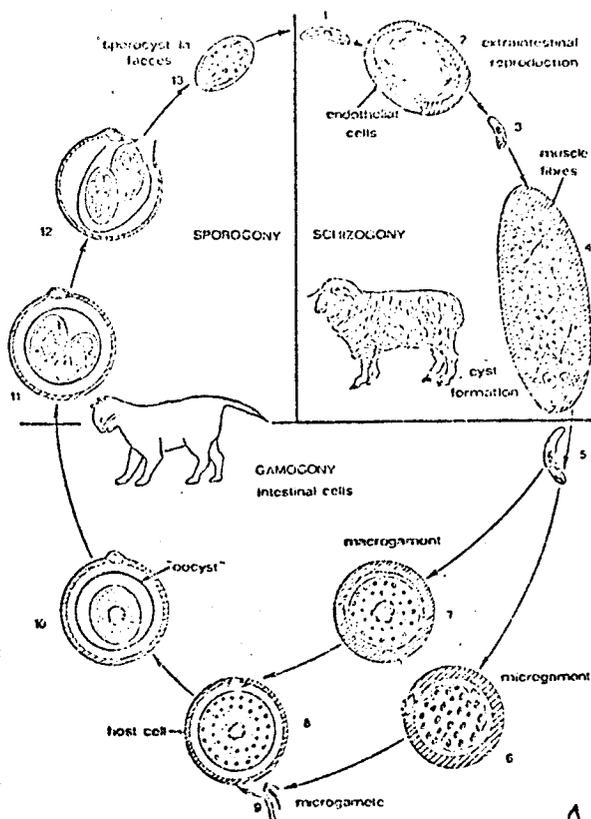
22 à 23 : sporulation

C, Cycle de *Toxoplasma gondii* (d'après J. FRENKEL, 1974)

D, Cycle de *Plasmodium sp.* (d'après LANDAU et BOULARD, 1978)

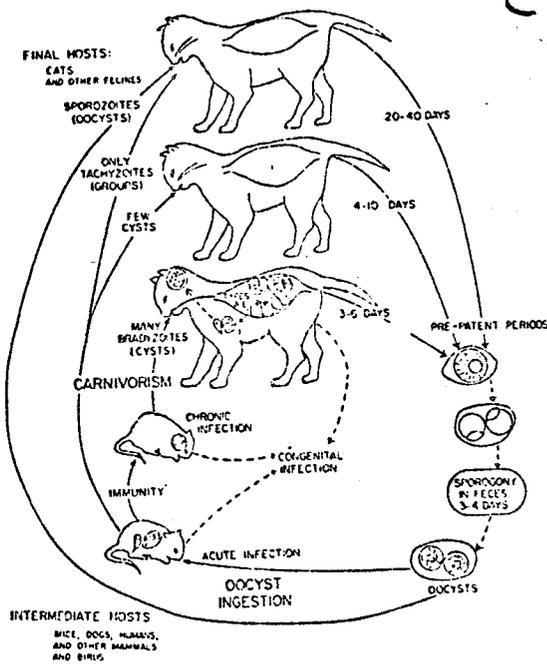
1 à 5 : gamétogenèse et fécondation }
6 à 12 : sporogénèse } moustique

12 à 16 : schizogonies exoérythrocytaire }
18 à 22 : schizogonies érythrocytaires et gamétocytogenèse } vertébré



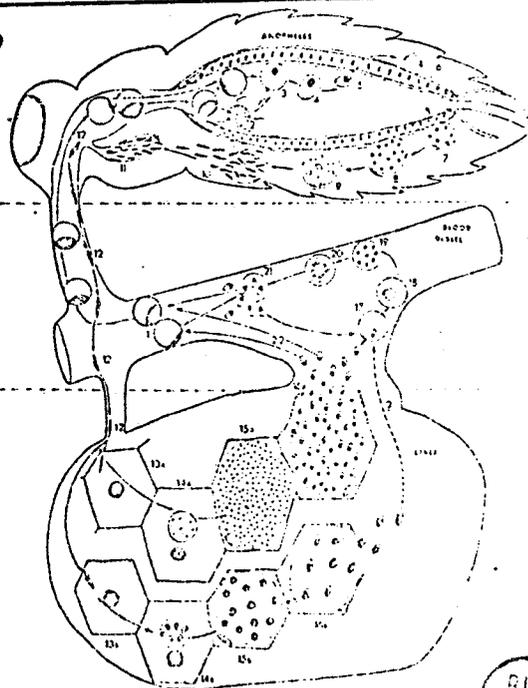
A

B



C

D



BUS LILLE

cerne exactement l'espèce qui nous concerne. Le cycle de *Sarcocystis tenella* (*ovifelis*) est reproduit à la page 8 . Nous avons utilisé des bradyzoïtes des kystes de la muqueuse oesophagienne du mouton.

1.1.1.3. Genre *Toxoplasma*

Le cycle de ce Sporozoaire n'a lui aussi été élucidé que récemment (HUTCHINSON *et al*, 1965). La situation est heureusement moins complexe que pour *Sarcocystis* car une seule espèce (*Toxoplasma gondii*, NICOLLE et MANCEAUX, 1901) a été reconnue dans ce genre qui peut parasiter un grand nombre de vertébrés homéothermes. Le cycle est hétéroxène et comporte une large palette de stades de multiplication asexuée dont certains sont probablement facultatifs, et une phase sexuée qui ne peut se dérouler que dans l'intestin des Félinés. Ce cycle est schématisé page 8 . Nous avons utilisé les tachyzoïtes, forme de multiplication asexuée indéfinie.

1.1.1.4. Genre *Plasmodium*

Nous avons réalisé quelques observations sur le sporozoïte de *Plasmodium yoelii nigeriensis* (KILLICK KENDRICK, 1973) parasite d'un rongeur africain (*Thomomys rutilans*) et d'un Anophélide, et adapté sur souris dans les conditions de laboratoire. Le cycle des *Plasmodium* est rappelé page 8 .

1.1.2. OBTENTION ET ENTRETIEN DES PARASITES

1.1.2.1. *Eimeria*

Ces coccidies sont entretenues sur leur hôte naturel ; elles sont conservées sous la forme d'oocystes sporulés, qui restent infectieux jusqu'à plusieurs années à + 4°C.

1.1.2.1.1. Obtention des oocystes

Eimeria necatrix. La souche a été obtenue auprès du Docteur P. YVORE (Laboratoire de Parasitologie Aviaire, INRA, 37 NOUZILLY). Elle est passée sur poulets de 2 mois environ par infection *per os* avec 50 000 oocystes sporulés.

Les coeca sont prélevés 7 jours plus tard et leur contenu suspendu dans une solution de bichromate de potassium à 2 %.

E. bovis. Les oocystes ont été fournis par les docteurs M. L. MINER et J. B. JENSEN (Utah State University). Ils sont utilisés pour infester *per os* des veaux de 2 mois environ, à raison de $2 \cdot 10^6$ oocystes sporulés par animal. Les fèces sont ensuite collectées du 17e au 25e jour après infestation et suspendues dans le bichromate.

E. rieschulzi. La souche (issue du Landers isolate de W. C. MARQUART, 1966) nous a été fournie par J. L. MAHRT (University of Edmonton). Des rats de 200 à 300 g sont infestés par 500 000 oocystes et les fèces collectées du 7e au 9e jour pour être suspendues dans le bichromate.

1.1.2.1.2. Sporulation

Les oocystes sont recueillis à l'état asporulé chez les *Eimeria*. Ils requièrent une exposition à un milieu richement oxygéné pour subir la sporulation qui mène à la formation des sporozoïtes infectieux.

La suspension fécale dans le bichromate, après avoir été homogénéisée par brassage mécanique est ainsi filtrée à travers un tamis à maille large (0,75 mm), puis plus fine (0,3 mm) pour en éliminer les gros débris. Une centrifugation à $300 g_{\max}$ pendant 10 minutes concentre les oocystes dans un culot qui est resuspendu dans le bichromate de potassium 2 %. La suspension est agitée et aérée par un courant d'air comprimé pendant 72 heures à la température du laboratoire.

1.1.2.1.3. Purification des oocystes

Lorsque la sporulation est terminée, la suspension contenant les oocystes est centrifugée à $500 g_{\max}$ pendant 10 minutes et le culot lavé par deux centrifugations en eau distillée dans les mêmes conditions. Il est ensuite resuspendu dans une solution de Saccharose 1,15 M (Solution de SHEATHER : 550 g de saccharose, 6,4 g de phénol pour 340 ml d'eau distillée, utilisée diluée de moitié), de densité voisine de 1,15, à raison de 10 ml environ de culot pour 100 ml de mélange. La suspension obtenue est ensuite centrifugée à $650 g_{\max}$ pendant 15 minutes. Les oocystes sporulés flottent dans ce milieu et sont ainsi rassemblés à la surface du liquide. Ils sont recueillis par aspiration et lavés par centrifugation dans l'eau distillée. Pour la conservation à $+4^{\circ}\text{C}$, ils sont alors resuspendus dans le bichromate de potassium 2 %. Ils peuvent aussi être immédiatement stérilisés par l'hypochlorite de Sodium (voir 1.2.1.1.1.).

1.1.2.2. Sarcocystis

Les kystes intramusculaires de *Sarcocystis tenella* (*ovifelis*) ont été obtenus à partir d'oesophages de mouton collectés dans les abattoirs de Lille, Douai, Bailleul (Nord). Les kystes sont extraits du tissu par dissection et conservés dans une solution saline (PBS, DULBECCO et VOIGT, 1953, additionnée de 50 unités de Pénicilline et 50 µg de Streptomycine par ml) à 4° C. Ils peuvent ainsi être stockés plus d'une quinzaine de jours sans altération notable de la viabilité des bradyzoïtes qu'ils renferment.

1.1.2.3. Toxoplasma

Les Toxoplasmes ont été obtenus auprès du Laboratoire d'Immunologie et Parasitologie, U 167 INSERM (Prof. A. CAPRON) sous la forme de tachyzoïtes de la souche RH infestant une tumeur d'ascite (TG 180) implantée dans des souris Swiss. Le contenu de l'ascite est prélevé par injection intrapéritonéale de 5 ml de milieu de culture (MEM EAGLE, 1959) et aspiration immédiate de la suspension.

1.1.2.4. Plasmodium

Les moustiques contaminés et porteurs d'oocystes de *Plasmodium yoelii nigeriensis* nous ont été fournis par P. MAUROIS (Immunologie Parasitaire et Fongique, U 42 INSERM, Prof. J. BIGUET) et R. E. SINDEN (Imperial College field Station, Ascot, G. B.).

1.2. TECHNIQUES

1.2.1. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES ZOITES

1.2.1.1. Sporozoïtes d'*Eimeria*

Les sporozoïtes sont obtenus à partir des oocystes sporulés par broyage mécanique puis excystation enzymatique selon des techniques désormais classiques, progressivement mises au point entre 1960 et 1970 par plusieurs laboratoires (voir D. J. DORAN, 1973). Nous détaillerons ici la méthode que nous avons développée pour *Eimeria nieschulzi*.

1.2.1.1.1. Stérilisation des oocystes

Les oocystes sporulés sont stérilisés par l'hypochlorite de sodium commercial à 5,25 % (Chlorox, Proctor & Gamble, équivalent à 24° chlorométriques français, c'est-à-dire eau de Javel commerciale concentrée diluée au demi) pendant 15 minutes à la température du laboratoire. La densité de cette solution entraîne la flottaison des oocystes. Après centrifugation à 650 g_{max} 10 minutes, ceux-ci forment un voile en surface, qui est recueilli par aspiration et dispersé dans la solution saline stérile. La suspension d'oocystes est lavée par centrifugations répétées jusqu'à ce que la solution saline ne soit plus décolorée (généralement 4 fois).

Ces manipulations sont réalisées stérilement, de même que celles qui suivent, quand les sporozoïtes sont préparés pour la culture *in vitro*. A la fin de cette étape, les oocystes sont très hautement purifiés ; généralement aucun contaminant n'est détectable à l'observation au microscope photonique.

1.2.1.1.2. Broyage des oocystes

Les oocystes sont suspendus dans la solution saline A de PUCK (1957) à raison de 10⁷/ml. Ils sont incubés à 37° C pendant 30 minutes. Cette étape correspond au traitement par le CO₂ en milieu réducteur introduit par JACKSON (1962) pour les Coccidies des herbivores. Chez *E. nieschulzi*, l'élévation momentanée de la température suffit à fragiliser la coque de l'oocyste et à optimiser le rendement du broyage.

La suspension est ensuite homogénéisée dans un broyeur de POTTER. Une quinzaine d'allers et retour à environ 1 500 rpm sont généralement suffisants pour ouvrir plus de 90 % des oocystes sporulés et libérer les sporocystes.

1.2.1.1.3. Excystation

Ces derniers sont rassemblés par centrifugation à 500 g_{\max} pendant 5 minutes et suspendus dans le milieu d'excystation dont la composition est la suivante :

- Trypsine (1 : 250, Difco) 0,25 g ;
- Taurocholate de Sodium (N.B.C.) 0,75 g ;
- Solution saline A (PUCK) pH 7,6, q.s. 100 ml.

Une incubation de 10 minutes à 37° C est nécessaire pour obtenir la libération quantitative des sporozoïtes. La suspension est alors centrifugée à 500 g_{\max} 5 minutes et le culot resuspendu dans le Ringer pour être purifié.

1.2.1.1.4. Purification sur fibres

La suspension obtenue à la fin de l'étape précédente contient, en plus des sporozoïtes, les coques d'oocystes, de sporocystes ainsi que quelques oocystes non sporulés et des débris cytoplasmiques issus du résiduum de l'oocyste. Ces débris sont de petite taille et facilement séparés par centrifugation différentielle. Les coques sont éliminées par filtration : WAGENBACH (1969) développa cette technique avec des billes de verre ; M. BONTEMPS et P. YVORE (1974) l'ont améliorée en utilisant des fibres de nylon habituellement employées pour déleucocyter le sang (Leucopak Filter, Travenol). Nous avons adapté cette méthode à notre matériel.

Un gramme de fibres est tassé de façon homogène dans une colonne de verre de diamètre intérieur 1 cm, sur une hauteur de 8 cm. La colonne est ensuite équilibrée dans le Tris-Ringer pH 8 (force ionique 0,22 μ , WAGENBACH, 1969) par passage d'au moins 25 ml de Tampon ; 5 ml de suspension de sporozoïtes à purifier (jusqu'à 10^8 /ml) sont versés sur la colonne qu'on laisse couler à 1 à 2 gouttes par seconde.

Quand la suspension est entrée dans les fibres, du Ringer est ajouté pour éluer les parasites. Les 20 premiers ml suivant l'arrivée des zoïtes à la sortie de la colonne sont collectés. La purification est généralement excellente, enlevant la totalité des oocystes et des coques d'oocystes ; seules peuvent contaminer la préparation quelques coques de sporocystes. Le rendement de l'opération peut varier de 60 à 90 %, mais avoisine généralement 80 %.

Selon les cas, les sporozoïtes, après centrifugation à 500 g_{max} 5', sont resuspendus dans un milieu de culture ou dans une solution saline. Ils peuvent éventuellement être conservés ainsi quelques jours à + 4° C, mais leur viabilité décroît alors progressivement. Il est possible de conserver les sporozoïtes par congélation dans l'azote liquide (D. J. DORAN et J. M. VETTERLING, 1968) mais cette méthode entraîne une mortalité importante (30 à 50 %) et nous l'avons peu utilisée.

1.2.1.2. Mérozoïtes d'*Eimeria*

Les mérozoïtes III (selon ROUDABUSH, 1937) d'*Eimeria nieschulzi* sont prélevés dans l'intestin de rat 110 à 112 heures après infestation, l'étude préalable des rendements entre 4 et 5 jours ayant montré qu'il s'agissait de l'optimum.

Les rats de 200 à 300 g sont infestés par $2 \cdot 10^6$ oocystes sporulés. Ils sont tués 110 - 112 h plus tard, après un jeûne de 24 heures, par dislocation des vertèbres cervicales. L'intestin grêle est prélevé et seul le tiers médian est conservé (environ 40 cm). La lumière est lavée par passage de 10 ml de PBS à 4° C, de façon à éliminer les débris restants et la majeure partie des flagellés intestinaux dont la taille est voisine de celle des mérozoïtes. Ces derniers étant plutôt situés dans les intervillosités sont peu entraînés par le lavage. L'organe est ensuite incisé longitudinalement, étalé sur une surface plane et la muqueuse est raclée à l'aide d'un scalpel. La purée de tissus ainsi obtenue est immédiatement suspendue dans 10 volumes de PBS à 4° C, et réunie à celle provenant des autres rats.

La suspension est ensuite homogénéisée à l'appareil de POTTER (5 allers-retour manuels) afin d'ouvrir les schizontes submatures et d'éclater le plus possible de cellules intestinales encore intactes. La suspension est filtrée sur 4 épaisseurs de gaze chirurgicale. Elle est ensuite centrifugée à 650 g_{max} pendant 10 minutes. Les culots sont repris dans un volume de PBS égal au volume de départ et l'homogénéisation, la filtration sur gaze et la centrifugation sont répétées dans les mêmes conditions. Le

culot est resuspendu dans le tampon de fractionnement cellulaire à la concentration de 10^8 organismes par ml. Il s'agit alors d'une préparation quasiment pure de mérozoïtes de grande taille (20 à 25 μ de long), où persistent quelques cellules intestinales et les membranes de ces cellules (surtout des bordures en brosse) ainsi que quelques flagellés et hématies. Le rendement final varie entre 2 et $5 \cdot 10^8$ mérozoïtes par rat (en moyenne $3 \cdot 10^8$).

La même méthode a été appliquée à l'isolement de mérozoïtes de 2e génération d'*Eimeria necatrix*. Des poussins de 10 jours ont été infestés chacun par $2 \cdot 10^7$ oocystes sporulés d'*Eimeria necatrix* (souche transmise dans ce cas par J. B. MILLARD, Houghton Poultry Research Station, Grande Bretagne). Sacrifiés 102 heures plus tard, ils ont produit environ 10^9 mérozoïtes chacun. La contamination par des hématies et des débris cellulaires était plus importante que pour *E. nieschulzi*.

1.2.1.3. Bradyzoïtes de *Sarcocystis tenella*

Les kystes oesophagiens sont suspendus dans une solution de trypsine (Difco, 1 : 250) à 0,25 % en PBS. Ils sont éclatés par aspiration forcée dans une seringue sans aiguille. La suspension ensuite incubée dix minutes à 37° C, puis filtrée sur quatre épaisseurs de gaze chirurgicale (on élimine ainsi les enveloppes kystiques) et le filtrat centrifugé à $500 g_{max}$ pendant 5 minutes. Le culot est relavé deux fois dans le PBS, puis une fois dans le milieu de fractionnement cellulaire dans lequel il est ensuite resuspendu à raison de 10^8 organismes par ml. La suspension obtenue est constituée exclusivement de bradyzoïtes de *Sarcocystis*.

1. 2. 1. 4. Tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*

1.2.1.4.1. Isolement à partir de l'ascite

Les souris infestées sont tuées par dislocation des vertèbres cervicales, la peau du ventre incisée et 5 ml de MEM injectés dans la cavité abdominale. Le liquide est aussitôt réaspiré dans la seringue ; un second lavage par 3 ml de MEM est ensuite pratiqué.

La suspension de Toxoplasmes ainsi obtenue peut contenir plus de 10^8 tachyzoïtes par ml (jusqu'à 10^9 par souris). Elle est plus ou moins contaminée par des cellules d'ascite et des hématies. Ne sont retenus que les lavages renfermant moins de 1 cellule pour 100 zoïtes, ce qui est fréquent chez les souris agonisantes où les Toxoplasmes ont lysé toute la po-

pulation cellulaire péritonéale (indigène et implantée). La suspension de zoïtes est lavée trois fois par centrifugation à $600 g_{\max}$ pendant 10 minutes dans le milieu de fractionnement cellulaire. La suspension finale est ajustée à 2.10^8 zoïtes/ml. Elle contient alors en moyenne également 10^6 cellules et 4.10^6 hématies.

1.2.1.4.2. Isolement à partir de cellules en culture

Pour certaines expériences (marquage radioactif) nous avons isolé les tachyzoïtes développés *in vitro*, sur cellules Hela.

Une boîte de 75 cm^2 de cellules Hela confluentes est infestée par 10^8 tachyzoïtes d'ascite. 24 à 30 heures plus tard, la plupart des cellules remplies de zoïtes sont éclatées ou sur le point de l'être. Le fond de la boîte est alors raclé avec un grattoir de caoutchouc, dans le milieu de culture et la suspension obtenue (qui renferme 3 à 4.10^8 zoïtes), est ensuite filtrée sur fibres de verre selon la technique de B. G. GRIMWOOD *et al* (1979). L'éluat est centrifugé à $600 g_{\max}$ 10 minutes et lavé une fois en PBS. On obtient ainsi environ 2.10^8 tachyzoïtes purs à l'observation microscopique, par boîte de 75 cm^2 .

1.2.2. CULTURES CELLULAIRES

Les manipulations *in vitro* des zoïtes (pénétrations et développement) ont requis l'utilisation de cultures de cellules et des techniques classiques s'y rapportant.

1.2.2.1. Cellules utilisées

Nous avons d'une part réalisé des cultures primaires à partir d'embryons ou d'organes et d'autre part entretenu des lignées obtenues auprès d'autres laboratoires ou développées par nous-mêmes.

Les résultats rapportés dans ce Mémoire ont été acquis sur lignées continues : cellules Hela (cancer utérin humain), BHK (rein de Hamster) obtenues auprès de l'U 102 INSERM (Virologie, Lille), 3T3 (fibroblaste murin) obtenues auprès de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, MDBK (MADIN DARBY Bovine Kidney), EBTr (Embryonic bovine trachea) issues de l'American type culture collection.

1.2.2.2. Techniques de culture

Toutes les manipulations sont effectuées stérilement, soit à la flamme d'un bec bunsen, soit en salle stérile, soit en hotte à flux laminaire. Les matériels utilisés sont stérilisés à la chaleur sèche (1 heure à 160° C) ou à l'autoclave (20 minutes à 120° C). Les milieux sont selon les cas autoclavés ou stérilisés par ultrafiltration.

1.2.2.2.1. Entretien des cellules

Lorsque la population cellulaire sature le fond du récipient (nous avons utilisé des cellules adhérentes se développant en monocouches), elle est décollée et répartie en récipients fils. Cette opération requiert l'utilisation d'un mélange Trypsine (Difco 1 : 250, 0,5 %) - EDTA (0,2 %) en solution saline de PUCK, qui est mis en contact avec les cellules pendant deux minutes à 37° C. Le liquide est ensuite décanté, les cellules détachées par choc mécanique et reprises dans le milieu de culture, comptées à l'hématimètre et réparties. Le milieu utilisé a généralement été le MEM (EAGLE, 1959) additionné de 10 % de sérum de veau. Divers types de récipients ont été employés : flacons verre ou polystyrène, boîtes de Pétri, tubes de Leighton, multiplaques. Dans le cas de récipients ouverts, la méthode de TRAGER-JENSEN (candle jar, 1977) a été utilisée, à défaut d'incubateur à CO₂.

1.2.2.2.2. Cryopréservation

Les lignées cellulaires ont été conservées dans l'azote liquide. Les cellules sont décollées, centrifugées et reprises dans 10 volumes de milieu de culture additionné de 10 % de Dimethylsulfoxyde. Cette suspension est répartie par 1 ml dans des cryules de verre (scellées à la flamme) ou de polypropylène. Les cryules sont amenées progressivement à - 196° C au moyen d'un dispositif de congélation BIOGEL (AIR LIQUIDE). Elles sont ensuite stockées dans l'azote liquide.

La décongélation est opérée par immersion de la cryule dans un bain-marie à 37° C, ouverture et dilution du contenu dans le milieu de culture puis ensemencement des boîtes.

1.2.2.2.3. Culture des Coccidies

Les zoïtes préparés stérilement sont suspendus dans le milieu de culture des cellules et la suspension introduite dans les récipients de culture. Après un temps de contact variable (6 à 24 h.), le milieu est renouvelé pour éliminer les débris et parasites non pénétrés

Dans le cas de l'étude de la pénétration, la suspension est introduite sur les cellules à + 4°C, et le récipient est stocké 20 minutes à cette température pour permettre aux zoïtes de sédimenter sur les cellules. Il est ensuite transporté sans heurts sur le microscope inversé muni d'une enceinte thermostatée à 37° C. Cette méthode développée par JENSEN et HAMMOND (1975) pour les Coccidies permet un enrichissement considérable en stades de pénétration lors d'une fixation dans les minutes qui suivent le réchauffement.

1.2.3. MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Les observations sur le vivant ont été réalisées en contraste de phase ou en contraste interférentiel sur microscopes Nacet 200, Leitz Diavert, Zeiss Photomicroscope I, munis d'enceintes thermostatées à 37° C.

Les observations en fluorescence ont été réalisées sur microscope Leitz Orthoplan muni d'un dispositif d'épifluorescence et enregistrées sur film Kodak Ektachrome 200.

1.2.4. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

1.2.4.1. Techniques classiques de préparation

1.2.4.1.1. Fixation

Nous avons le plus souvent utilisé le glutaraldéhyde à 2,5 % (v/v) dans le tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,4 ou cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,4 pendant 2 heures à la température du laboratoire, suivi

d'un lavage dans le tampon et d'une postfixation par le tétroxyde d'osmium à 2 % (p/v) dans le même tampon.

1.2.4.1.2. Déshydratation et inclusion

Les pièces sont ensuite rincées au tampon et déshydratées par une série croissante d'alcools avec imprégnation pendant 20 minutes par l'acétate d'uranyle à 0,5 % (p/v) dans l'éthanol 70°. L'éthanol absolu est suivi par l'oxyde de propylène sauf dans le cas d'inclusion *in situ* de couches monocellulaires développées sur polystyrène. Dans ce cas, nous avons d'abord utilisé le passage à l'hydroxypropylméthacrylate (BRINKLEY *et al.*, 1967), mais cette méthode s'est avérée inutile, le passage direct alcool absolu-Epon donnant d'excellents résultats. Les inclusions ont été réalisées le plus souvent en Epon.

1.2.4.1.3. Coupes

Les coupes ont été réalisées sur ultra microtomes Porter-Blum MT1, MT2, MT2B, et sur Reichert OMU 2 au moyen de couteaux de verre ou de diamant (Leitz, Du Pont ou Diatome).

Les coupes semi-fines ont été colorées par le bleu azur B, les coupes fines contrastées par la double coloration acétate d'uranyle 2 % dans l'éthanol 50 % - citrate de plomb.

1.2.4.1.4. Cas particulier des cultures incluses *in situ*

Dans le cas des cultures cellulaires, nous avons le plus souvent inclus les monocouches *in situ*, décollé le support après inclusion, et sélectionné les cellules, parasites ou aires intéressantes par microscopie photonique à contraste de phase. Ces régions ont été découpées, recollées sur support et directement coupées en sections ultrafines, l'épaisseur du matériel (environ 5 μ) n'autorisant pas la réalisation de coupes semi-fines.

1.2.4.2. Cryofracture

Les matériels destinés à cette étude ont été fixés par le glutaraldéhyde à 2,5 % (v/v) en Tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4, rincés dans le tampon puis imprégnés par le glycérol à 30 % (v/v).

Congelés dans l'azote fondant (préparé par dépressurisation d'azote liquide) après installation sur des supports en or, les échantillons sont fracturés sous vide (10^{-6} Torr) à -150°C et immédiatement ombrés sous un angle de 30° par évaporation de platine-carbone et la réplique recouverte de carbone dans une unité de cryofracture Balzers BAF 380. L'épaisseur des dépôts est d'environ 2 nm pour le Pt-C et 20 nm pour le carbone support.

Les répliques obtenues sont ramenées à la température ambiante, lavées par l'hypochlorite de sodium, rincées à l'eau et recueillies sur grilles de cuivre pour être observées.

Certaines répliques ont été obtenues par ombrage rotatif de la préparation lors de l'évaporation du mélange Pt-C.

1.2.4.3. Observation, Exploitation des résultats.

Les observations ont été réalisées sur microscopes électroniques Siemens Elmiskop 1 A, Zeiss EM 9, Hitachi HS7S, HU11E, HU12. Les numérations de particules sur clichés ont été pratiquées d'abord manuellement au moyen d'un quadrillage, puis avec un dispositif d'analyse d'image MOP (Kontron).

1.2.5. FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

1.2.5.1. Homogénéisation

Divers procédés ont été expérimentés pour tenter d'éclater les zoïtes en respectant l'intégrité des organites. Ce sont :

- l'homogénéiseur de POTTER ELVEGHEM ;
- le broyeur de DOUNCE ;
- l'homogénéiseur Virtis ;

- le broyeur au mortier après congélation ;
- les ultrasons (appareil MSE) ;
- la French Press (American Instrument Co).

L'efficacité de ces divers procédés est relatée dans la partie "Résultats". Le milieu utilisé a été une solution de sucrose 250 mM et EDTA 1mM dans le tampon triéthanolamine - HCl 5mM à pH 7,5.

1.2.5.2. Ultracentrifugation et récupération des fractions

Toutes les centrifugations ont été réalisées sur ultracentrifugeuse Beckman L 65-B avec les rotors oscillants SW27, SW40, SW50.1, en tubes de nitrate de cellulose ou de polyallomères.

Selon le type de séparation désiré, les solutions utilisées sont le milieu d'homogénéisation ou des solutions plus concentrées de sucrose dans le même tampon.

Les différents fractionnements ont utilisé des gradients de densité discontinus ou linéaires de saccharose.

Les fractions séparées ont été récupérées au moyen d'un fractionneur de gradient ISCO mesurant la densité optique à 280 nm.

1.2.6. ELECTROPHORESE DES PROTEINES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

L'analyse électrophorétique des protéines des zoïtes ou de leurs compartiments subcellulaires a été réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS en milieu dissociant selon LAEMMLI (1971) dans un appareil conçu par C. DISSOUS.

Le gel séparateur est un gradient continu d'acrylamide (généralement 10 - 18 %) dans le tampon Tris-HCL 375 mM à pH 8,8 contenant 0,05 % de dodécyl sulfate de sodium (SDS) et dont les dimensions sont 16 x 14 x 0,10cm. Le gel de concentration est à 5 % d'acrylamide en Tris HCL 125 mM pH 6,8 contenant 0,1 % de SDS.

Les échantillons (dont la teneur en protéines est préalablement mesurée par la méthode de LOWRY, 1953) sont préparés dans le Tris-HCL 62,5 mM pH 6,8 contenant 1 % de SDS, 5 % de B-mercaptoethanol, 5 % de sucrose et 0,2 %

de bleu de Bromophénol et ils sont chauffés à 100° C pendant 3 minutes.

L'électrophorèse est menée pendant 18 heures à 4 mA dans le tampon Tris-glycine pH 8.3 contenant 0,1 % de SDS. Le gel est ensuite fixé pendant deux heures dans l'acide trichloracétique à 50 %, coloré pendant 7 minutes dans le bleu de Coomassie R à 0,2 % dans la même solution, puis décoloré par l'acide acétique à 7 %. Il est ensuite séché par évaporation sous vide. Des marqueurs de poids moléculaire (MWM Pharmacia) sont traités en même temps que les échantillons pour permettre une mesure du poids moléculaire apparent des peptides dans ce système.

1.2.7. MARQUAGE RADIOACTIF

1.2.7.1. Iodination des protéines superficielles

La radioiodination par la lactopéroxydase des protéines superficielles des zoïtes de *Sarcocystis tenella* a été pratiquée par une méthode dérivée de celle de MARCHALONIS *et al* (1971).

Le milieu réactionnel est préparé en PBS et sa composition est la suivante :

- Iodure de Sodium (Na^{125}I , Amersham, sans entraîneur) :
1 millicurie/ml ;
- Iodure de Potassium : $1,25 \cdot 10^{-6}$ M ;
- Eau oxygénée : $4 \cdot 10^{-5}$ M ;
- Lactopéroxydase (Calbiochem, 100 U/mg) : 5 $\mu\text{g/ml}$;
- Butylhydroxytoluène : 20 $\mu\text{g/ml}$.

Les zoïtes y sont suspendus à la concentration de 10^7 /ml et le mélange est incubé dans la glace pendant 15 minutes en agitant fréquemment.

La réaction est stoppée par l'addition d'azide de sodium et d'Iodure de Potassium en amenant leurs concentrations respectives à $3 \cdot 10^{-5}$ M pour le premier et $1,25 \cdot 10^{-3}$ M pour le second.

Les zoïtes sont ensuite lavés quatre fois par centrifugation à 800 g_{max} pendant 5 minutes dans 20 ml de PBS.

Ils sont ensuite précipités par l'acide Trichloracétique 10 % à 4° C. Le précipité est retenu sur filtre en fibre de verre et lavé par le TCA 8 % puis un mélange Ether (3 V) - Acétone (IV).

La radioactivité retenue sur le filtre est alors mesurée dans un compteur de rayons gamma.

Pour l'électrophorèse, le filtre est dilacéré dans le tampon de dépôt (voir 1.2.5.), et le mélange chauffé 3 minutes à 100° C.

1.2.7.2. Incorporation d'acides aminés radioactifs

Les protéines de *Toxoplasma gondii* ont été marquées *in vitro* par incorporation de Leucine tritiée (Leu 3, 4, 5 ³H, CEA, 40 Ci/mM). Un tapis de cellules Hela confluant à 80 % reçoit 50 µl de solution de Leucine ³H (100 µCi) 24 heures avant l'infestation par des Toxoplasmes d'ascite (voir 1.2.1.4.2.) qui sont additionnés au milieu de culture sans décantier ce dernier. Cinq heures après infestation, le milieu est remplacé par du milieu frais contenant à nouveau 50 µl de Leucine tritiée. Les Toxoplasmes marqués sont récoltés 24 heures plus tard.

L'incorporation est mesurée par scintillation en phase liquide après précipitation par le TCA 10 %, filtration sur fibre de verre et solubilisation dans un cocktail approprié (Lumasolve - Lipoluma).

Pour l'électrophorèse, le précipité TCA insoluble retenu sur filtre est solubilisé dans le tampon de dépôt.

1.2.7.3. Détection des protéines marquées après électrophorèse

1.2.7.3.1. Autoradiographie

Les protéines iodées sont révélées par autoradiographie sur film Kodak Royal X O Mat. L'exposition a lieu à - 70°C.

1.2.7.3.2. Fluorographie

Les protéines tritiées sont révélées par fluorographie selon la méthode de LASKEY et MILLS (1975). Après coloration par le bleu de Coomassie et régression dans l'acide acétique 7 %, le gel est équilibré dans le diméthylsulfoxyde, puis immergé dans une solution de PPO (diphényloxazole) à 20 % dans le DMSO. Il est ensuite lavé à l'eau distillée et séché. L'exposition est faite sur film Royal xo Mat à - 70° C.

CHAPITRE 2

CYTOLOGIE ULTRASTRUCTURALE DES ZOITES DE COCCIDIES :
STRUCTURE, GENESE ET INTERACTION AVEC LA CELLULE HOTE.

Ainsi que nous l'avons déjà signalé, l'introduction de la microscopie électronique a mis en évidence la complexité et l'unité structurale des zoïtes de Sporozoaires. Nous rappellerons ces caractéristiques dans ce premier chapitre en nous servant pour l'illustrer des organismes que nous avons utilisé au cours de nos travaux.

L'analyse cytologique a également apporté des informations sur les processus de genèse des zoïtes d'une part, et sur les modalités de l'invasion de la cellule hôte d'autre part. Nous avons participé à ces travaux et présenterons ici nos résultats avant de discuter des problèmes posés et des perspectives ouvertes par les observations ultrastructurales.

2.1. CYTOLOGIE DES ZOÏTES DE COCCIDIOMORPHES

Plusieurs revues détaillées ont été publiées sur ce sujet et nous ne ferons ici que rappeler les caractéristiques essentielles des zoïtes, afin de pouvoir situer les problèmes auxquels nous nous sommes intéressé. Il s'agit de cellules généralement allongées, souvent en forme de banane, dont la taille est de l'ordre d'une dizaine de microns. Une extrémité est arrondie ; l'autre, plus effilée, correspond à la partie antérieure. L'examen au microscope électronique conduit à y distinguer une paroi, un complexe apical et des organites cytoplasmiques et inclusions diverses.

2.1.1. LA PAROI (OU PELLICULE)

Les zoïtes sont entièrement enveloppés par un plasmalemme d'aspect classique en coupe (unit-membrane, ROBERTSON, 1957). Celui-ci est doublé intérieurement par une formation pentalaminée appelée "complexe membranaire interne", constituée de deux membranes unitaires accolées et dont VIVIER et PETITPREZ (1969) ont montré, chez le Toxoplasme, qu'il s'agissait

de vésicules aplaties à la lumière généralement collapsée. Ce complexe interne est interrompu sur une courte distance aux extrémités de la cellule qui ne sont ainsi couvertes que par la membrane cytoplasmique.

Le (ou les) micropore est une différenciation pariétale constituée par une interruption du complexe interne qui forme un court cylindre dans lequel le plasmalemma peut ou non s'invaginer. Cet organite est supposé jouer un rôle dans la phago-(ou pino)-cytose aux dépens de l'hôte et ne serait pas fonctionnel chez les zoïtes (voir E. SCHOLTYSECK, 1973, in "The Coccidia").

2.1.2. LE COMPLEXE APICAL

Ce terme, dû à J. SENAUD (in LEVINE, 1970) regroupe un ensemble d'organites caractéristiques des zoïtes de Sporozoaires et situés dans la partie antérieure de ces organismes (il a été observé que cette partie pénètre la première dans la cellule hôte). Selon les groupes, certains éléments peuvent manquer ; les Eimeridés possèdent quant à eux un complexe apical complet, c'est-à-dire un conoïde, des anneaux apicaux, des microtubules sous pelliculaires, une vésicule apicale, des rhoptries et des micronèmes.

2.1.2.1. Le conoïde (GUSTAFSON *et al.*, 1954)

C'est un organite en tronc de cône creux situé au niveau de l'interruption du complexe membranaire interne. Il est constitué de fibres juxtaposées et arrangées en spirale.

2.1.2.2. Les microtubules sous pelliculaires

Bien que cette formation s'étende jusque dans la région postérieure du zoïte, elle s'initie (voir 2.2.) et s'insère dans la région antérieure et il apparaît donc justifié de l'intégrer dans le complexe apical.

Les zoïtes possèdent ainsi un système de microtubules de diamètre environ 20 nm insérés sur un anneau dense juxtaposé à l'interruption antérieure du complexe membranaire interne et qui sont appliqués à intervalles réguliers contre la face interne de la pellicule. Les colorations négatives ont apporté des précisions sur la structure des microtubules qui sont composés d'une douzaine de protofibrilles formées elles-mêmes de sous-unités de 4 x 8 nm (DUBREMETZ, 1971).

L'extrémité postérieure des microtubules est mal définie. Elle est située dans le tiers postérieur de la cellule.

2.1.2.3. Les anneaux apicaux

Ce sont deux anneaux denses (ou couronnes de densifications, VIVIER et PETITPREZ, 1972) surmontant le conoïde dont ils ont à peu près le diamètre.

2.1.2.4. La vésicule apicale

Il s'agit d'une petite vésicule de 60 nm, au centre généralement dense, adhérant au plasmalemme dans l'axe du conoïde. Cette formation de petite taille a souvent été négligée par les cytologistes qui, quand ils l'observaient, en faisaient une vésicule cytoplasmique banale. Nous l'avons toujours retrouvée à cet endroit chez les Eiméridés et pensons qu'il s'agit d'un organite à part entière dont la fonction reste à élucider. Les observations de cryofracture nous ont conforté dans cette vue (voir 3.1.1.1.).

2.1.2.5. Les rhoptries (SENAUD, 1967)

Ce sont des organites allongés, à l'extrémité plus ou moins renflée surmontée d'un long pédoncule qui peut s'étendre jusque dans le conoïde et se terminer à proximité de la vésicule apicale. Leur contenu est uniformément dense aux électrons (sauf chez *Toxoplasma*, chez qui la partie renflée a un aspect spumeux) ; elles sont limitées par une membrane unitaire. Elles sont situées dans le tiers antérieur de la cellule. Leur nombre est difficile à évaluer précisément sauf par coupes sériées ou dans certains cas favorables d'étalement (exemple *Sarcocystis* : E. PORCHET, 1975). Leur dénomination primitive de "paired organelles" (GARNHAM *et al.*, 1960) est évocatrice. Il y a en effet 2 rhoptries chez les bradyzoïtes de *Sarcocystis tenella* (*ovifelis*), 2 ou 3 chez les mérozoïtes II d'*Eimeria necatrix* et d'*Eimeria tenella*, les mérozoïtes III d'*Eimeria nieschulzi*, et les mérozoïtes I d'*E. bovis*. Mais il y en a un plus grand nombre (quelques-unes à plusieurs dizaines) chez les sporozoïtes d'*Eimeria bovis*, d'*E. nieschulzi*, d'*E. tenella*, d'*Isospora felis* et les tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* pour nous en tenir aux espèces que nous avons observées.

2.1.2.6. Les micronèmes

Ce sont de petits organites en forme de navettes, de 200 x 50 nm environ, limités par une membrane unitaire et de densité aux électrons comparable à celle des rhoptries. Ils sont disposés en amas plus ou moins ordonnés dans le tiers antérieur des zoïtes. Extrêmement abondants chez les bradyzoïtes de *Sarcocystis tenella*, ils sont nombreux chez les mérozoïtes II d'*Eimeria necatrix* ou *E. tenella* et les mérozoïtes III d'*E. nieschulzi*. Leur nombre est plus réduit chez les sporozoïtes observés (*E. nieschulzi*, *E. bovis*, *E. tenella*, *I. felis*). Ils n'existeraient pas chez *Toxoplasma* (VIVIER et PETITPREZ, 1972, qui les interprètent comme des coupes de rhoptries à des stades divers) où, paradoxalement, ils ont été décrits pour la première fois (GUSTAFSON, 1954) et pour qui le terme a été proposé (JACOBS, 1967). Ceci illustre bien la confusion qui a longtemps régné entre les deux types d'organites denses antérieurs, entretenue par une multiplicité de dénominations heureusement abandonnées.

2.1.3. LES ORGANITES ET INCLUSIONS CYTOPLASMIQUES ET LE NOYAU

En arrière du complexe apical, la cellule renferme, dans un cytoplasme riche en ribosomes, des organites classiques (mitochondries, dictyosome, ergastoplasme) et des inclusions variées, caractéristiques des Sporozoaires (grains d'amylopectine, granules denses, corps paranucléaires, vésicules plurimembranaires), en plus d'un noyau généralement situé aux 2/3 du zoïte.

2.1.3.1. Les mitochondries

Elles possèdent les crêtes en forme d'ampoule caractéristiques des Sporozoaires (VIVIER *et al.*, 1970). Souvent arrondies en coupe, elles sont parfois allongées et ramifiées.

2.1.3.2. L'appareil de Golgi

Les zoïtes possèdent en général 1 seul dictyosome constitué d'un petit nombre de saccules aplatis empilés contre la face antérieure du noyau dont ils sont séparés par un lit de vésicules.

2.1.3.3. L'ergastoplasme

Il est peu abondant, réduit à quelques profils isolés dont certains sont reliés à la membrane nucléaire externe.

2.1.3.4. Les grains d'amylopectine (autrefois paraglycogène)

Ils peuvent occuper une part importante de la zone médiane des zoïtes. Ils sont ovoïdes, de taille voisine de 0,2 μ m. J. RYLEY *et al* (1969) ont les premiers démontré, chez *E. tenella*, qu'il s'agissait d'amylopectine (chaînes de 20 glucoses liés en α 1-4 et branchés en α 1-6).

2.1.3.5. Les vésicules plurimembranaires

Il s'agit de vésicules de taille variable, limitées par 3 ou 4 membranes unitaires irrégulièrement accolées et au contenu finement granuleux. Elles sont généralement peu nombreuses et situées au-dessus du dictyosome. Elles ont reçu selon les auteurs des appellations très diverses et sont dans certains cas considérées comme l'équivalent de mitochondries (VIVIER et PETITPREZ, 1972)

2.1.3.6. Les corps paranucléaires

Aussi dénommés corps réfringents, de par leur aspect en microscopie photonique, il s'agit de deux (parfois 3) masses denses aux électrons situées de part et d'autre du noyau chez les sporozoïtes et les mérozoïtes I ; les mérozoïtes II, III, IV, les bradyzoïtes et tachyzoïtes en sont généralement dépourvus. Ces corps sont arrondis, souvent entourés de grains d'amylopectine et ne sont limités par aucune membrane. Uniformément denses chez les *Eimeria*, ils sont, chez les *Isospora* et organismes apparentés (*Sarcocystis*) formés d'un arrangement régulier de petits grains denses qui leur a valu le nom de cristalloïde (voir VIVIER et PROUVOST, 1977).

2.1.3.7. Les granules denses

Cette dénomination regroupe une variété d'inclusions dont la caractéristique commune est d'être arrondies, limitées par une membrane et opaques aux électrons sur coupes fines. Des coupes transversales de rhoptries peuvent les mimer et cette catégorie d'organites est donc assez

mal définie. Le fractionnement cellulaire a permis de les caractériser chez *Sarcocystis tenella* (voir 4) où ils ont été décrits par SENAUD (1967) sous le nom de grains moyens, puis assimilés à des rhoptries par H. MEHLHORN *et al* (1975). Ils sont également présents chez *Toxoplasma* (VIVIER et PETITPREZ, 1972). Les microsphères décrites par BANNISTER *et al* (1975) chez les mérozoïtes de *Plasmodium* en sont peut-être des équivalents.

2.1.3.8. Le Noyau

Il est arrondi, muni d'une enveloppe de type classique, avec des plaques de chromatine appliquées contre la membrane interne. Le nucléole est généralement absent des zoïtes libres.

2.2. GENESE DES ZOITES - ETUDE ULTRASTRUCTURALE CHEZ LES EIMERIA

L'étude ultrastructurale de la genèse des zoïtes de Coccidiorformes a apporté des informations sur l'origine des divers organites qu'ils renferment et sur la séquence des événements intervenant dans la différenciation. Cette approche statique était un préalable indispensable à toute étude dynamique des phénomènes morphogénétiques. Elle a permis de mieux définir les modèles expérimentaux et d'en cerner les possibilités.

Nous avons, pour notre part, étudié la schizogonie d'*Eimeria* développées *in vivo* et *in vitro* et les résultats obtenus sont rapportés dans les articles insérés en annexe.

2.2.1. EIMERIA NECATRIX

" La genèse des mérozoïtes chez la coccidie *Eimeria necatrix*. Etude ultrastructurale. " J. Protozool. 22 , 71-84 , 1975 .

2.2.2. EIMERIA BOVIS

" Ultrastructural study of Schizogony of *Eimeria bovis* in Cell Cultures . " J. Protozool. 26 , 367-376 , 1979 , en collaboration avec Y. Y. Elsner .

2.2.3. DISCUSSION

De la même manière que la structure des zoïtes est très homogène chez les Sporozoaires, la séquence de genèse des organites au cours de leur différenciation varie peu au sein du groupe, les différences tenant surtout à l'absence de l'un ou l'autre des organites.

La première question posée face à ce phénomène est celle du déclenchement de la différenciation. En effet, la schizogonie qui préside à la multiplication des zoïtes peut conduire à la formation de 2 (*Toxoplasma*) à plusieurs milliers (*Eimeria bovis*, *Plasmodium*) d'individus fils suivant le nombre de divisions nucléaires qui précède la genèse de ces derniers. La stabilité des nombres de zoïtes formés par génération ou par stade au sein des divers genres ou espèces permet de penser que ce phénomène est sans doute programmé génétiquement et dépend d'une régulation du nombre des mitoses. Le fait que le nombre de zoïtes formés par schizonte lors de culture "*in vitro*" est souvent plus faible que dans l'hôte normal (DORAN, 1973) montre cependant qu'il est possible de perturber ce programme. Le mécanisme par lequel s'effectue cette transition de la croissance à la différenciation reste à élucider.

Une seconde question réside dans le lieu d'initiation de la genèse. La plupart des auteurs ont distingué deux types de développement selon que les zoïtes apparaissent à l'intérieur (endogenèse) ou à la périphérie (exogenèse) de la cellule mère (voir PORCHET, 1972). Si la différence cytologique peut apparaître spectaculaire, nous pensons qu'elle n'a qu'une portée très limitée dans le phénomène de différenciation lui-même, qui est identique dans les deux cas.

En fait, le lieu d'initiation des zoïtes est exclusivement conditionné par l'emplacement des centres cinétiques dans la cellule au cours des mitoses successives : s'ils sont en permanence voisins du plasmalemme on observe une exogenèse ; s'ils en sont indépendants, l'endogenèse intervient. Tous les travaux publiés confirment cette thèse, qui attribue ainsi au comportement mitotique une différence que l'on avait cru caractéristique du mode de genèse.

Le terme de zone d'induction a été proposé pour le lieu d'initiation des zoïtes (PORCHET, 1977, VIVIER, 1979) et, dans l'exogenèse,

l'interaction noyau - membrane externe est considérée comme capitale dans l'induction de l'organitogenèse. Nous avons ci-dessus mis en doute cette dernière proposition. Par ailleurs, le terme d'induction utilisé pour désigner la réunion des conditions de la synthèse du zoïte (PORCHET, 1977) ne correspond pas à l'acception classique du vocable introduit en embryologie par SPEMANN (1912, cité par FAUTREZ, 1967) et qui désigne une modification dans un système produite par simple contiguité avec un autre système. Il n'y a pas jusque là d'évidences permettant d'affirmer que la genèse des zoïtes résulte de l'interaction d'organites ou de structures. Aussi, bien que l'organitogenèse séquentielle rappelle les processus d'induction connus dans l'embryogenèse des Métazoaires (VIVIER, 1979), nous préférons utiliser pour les zoïtes le terme d'initiation, moins précis, mais neutre quant aux mécanismes, lesquels restent énigmatiques.

Nos résultats, et l'analyse des travaux parus nous conduisent à proposer un schéma global de genèse des zoïtes qui peut s'appliquer à tous les cas décrits et servir de base à l'analyse expérimentale du phénomène.

La genèse du zoïte s'organise ainsi autour du centre cinétique, qui est généralement en même temps un pôle de la dernière mitose (centriole comme chez les *Eimeria*, ou masse moins organisée cytologiquement comme chez les *Plasmodium*). L'évènement initial est l'organisation à proximité de ce centre de l'anneau à partir duquel se développeront les microtubules sous pelliculaires. On peut ainsi concevoir la régulation du déclenchement de la genèse par le signal de synthèse d'un des composants de l'anneau, ce dernier ne pouvant d'autre part s'édifier qu'autour du centre cinétique et en un seul exemplaire chaque fois. Dans l'anneau doivent être contenues les informations nécessaires à la genèse du système microtubulaire, c'est-à-dire le nombre et le sens de polymérisation des tubules. Il est simple d'imaginer que ces informations puissent résider dans la conformation moléculaire des composants de l'anneau.

Les sites initiateurs étant ainsi constitués, les microtubules sous pelliculaires peuvent s'édifier à partir des tubulines et des protéines associées (préexistantes ou néoformées).

Simultanément, une synthèse de matériel membranaire doit intervenir, qui donnera naissance au complexe interne. Cette synthèse s'effectue au niveau de l'ergastoplasme, et souvent plus précisément dans l'enveloppe du noyau. Un transit des membranes formées par le dictyosome est généralement

observé, ce dernier formant des vésicules qui sont à l'origine du complexe interne.

La mise en place du système microtubules-membrane doit être considérée comme étant gouvernée par les microtubules. Il est en effet beaucoup plus aisément admissible que ces derniers servent de charpente à l'installation du réseau membranaire que l'inverse. Il suffit que les vésicules destinées au complexe interne soient munies de récepteurs reconnaissant les microtubules et s'y liant pour assurer la mise en place du système.

Simultanément, au début de la genèse, les vésicules denses préfigurant les rhoptries "apparaissent" au-dessus du dictyosome, dont elles dérivent probablement. Le processus de synthèse de leur contenu (comme celui de tous les autres organites d'ailleurs) est inconnu.

Nous avons, dans nos résultats, insisté sur la signification possible d'une relation observée entre le centre cinétique et le sommet du complexe apical (conoïde quand il est présent) sous la forme d'une tigelle dense s'étirant entre les deux régions au cours de leur éloignement. Nous pensons qu'il s'agit là d'un organite maintenant le rapport entre le centre cinétique et l'apex du zoïte et régulant la distance entre les deux formations au cours de la genèse. On peut ainsi expliquer l'intégration du noyau dans le futur zoïte, indispensable à l'élaboration d'un parasite fonctionnel, le noyau apparaissant lié au centre cinétique (soit au niveau d'un pore - *Plasmodium* - soit par un centrocone - *Eimeria*).

Le signal de fin d'allongement des zoïtes pourrait également venir des microtubules, si l'arrêt de leur polymérisation conduisait les membranes s'allongeant encore à converger et refermer l'individu fils.

Enfin, l'association complexe membranaire interne - plasmalemme (précoce en exogenèse, tardive en endogenèse) doit également provenir de la reconnaissance de sites complémentaires entre les deux formations et de leur interaction.

Ce modèle n'est qu'un essai d'interprétation des phénomènes observés, basé sur la nécessité de les rapporter à des mécanismes d'assemblage moléculaire afin de pouvoir tenter de les expliquer. Il montre surtout l'immense ignorance dans laquelle nous nous trouvons du déroulement de l'organitogenèse.

2. 3. INVASION DE LA CELLULE HÔTE

La pénétration des zoïtes de Coccidiomorphes dans leur cellule hôte a pu être étudiée finement dans quelques cas par l'utilisation simultanée de la microscopie électronique et des techniques de culture *in vitro*. Les conditions optimales d'observation du phénomène sont en effet beaucoup plus difficiles à réunir dans les profondeurs d'un hôte naturel.

Plusieurs genres ont été étudiés avec une précision variable (*Plasmodium*, *Babesia*, *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma*). Nous avons pour notre part analysé le comportement de *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii*, deux organismes que d'autres critères désignaient comme favorables aux investigations ultérieures à l'échelle moléculaire mais pour lesquels les modalités d'invasion de la cellule hôte n'avaient pas été décrites finement.

2.3.1. ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE L'INVASION DE LA CELLULE HÔTE PAR SARCOCYSTIS TENELLA ET TOXOPLASMA GONDII

Les études ont été réalisées *in vitro*, en adoptant la technique développée par JENSEN et HAMMOND (1975) et qui consiste à laisser sédimenter à froid une grande quantité de zoïtes sur un tapis cellulaire, puis à réchauffer la préparation. On obtient ainsi un grand nombre de pénétrations simultanées, condition indispensable à l'étude ultrastructurale.

2.3.1.1. *Sarcocystis tenella*

L'observation sur le vivant de l'interaction entre les zoïtes de *Sarcocystis* activés par la trypsine et un tapis cellulaire (fibroblastes de mouton, cellules épithéliales de chat, cellules Hela ou BHK) montre que les zoïtes se déplacent par glissement sur le substrat (verre ou polystyrène) ou sur les cellules, l'extrémité la plus effilée vers l'avant. L'invasion d'une cellule hôte débute par l'entrée en contact de l'extrémité antérieure du zoïte et de la surface cellulaire. Dans certains cas, le parasite pivote sur cet appui à la manière d'une vrille avant d'entrer. Mais la pénétration peut également être immédiate et l'on voit alors le zoïte s'enfoncer rapidement dans le cytoplasme hôte, sans perturbation importante de la surface cellulaire. Les zoïtes peuvent cheminer à l'intérieur des cellules, passer de l'une à l'autre dans une monocouche confluyente, ou même ressortir.

sans que la cellule hôte semble lésée.

A l'échelle ultrastructurale, nous avons observé des stades allant du contact avec le plasmalemme jusqu'à la sortie après traversée de la cellule.

En phase précoce d'interaction, on observe entre le plasmalemme de la cellule et l'apex du zoïte quelques vésicules formées d'une membrane unitaire enfermant un contenu faiblement opaque aux électrons (Pl. 2, fig. 3).

Lorsque le zoïte est engagé dans le cytoplasme hôte, l'invagination produite est limitée par une membrane en continuité avec le plasmalemme et que rien en coupe ne permet de distinguer de celui-ci. Les zoïtes intracellulaires (ou largement pénétrés, les coupes ne permettant pas toujours de les distinguer) sont situés dans une vacuole limitée par une membrane unitaire (pl. 2, 3 et 4).

Sur les coupes de parasites en cours de pénétration, deux caractéristiques retiennent l'attention. Ce sont d'une part des zones de contact étroit entre le zoïte et le plasmalemme hôte. Il s'agit généralement de courtes appositions entre les membranes qui sont ailleurs séparées par des espaces plus ou moins larges. Ce type d'interaction se rencontre antérieurement jusqu'en haut du conoïde (Pl. 3, fig. 2).

Le second élément remarquable est la présence dans l'espace séparant les plasmalemmes de profils "myéliniques" d'abondance et de volume variables, ou de vésicules identiques à celles décrites ci-dessus (Pl. 2, fig. 3) noyées dans un réseau filamenteux irrégulier. Les deux types de formations peuvent coexister (Pl. 2, fig. 1,4). Les figures "myéliniques" vont de la simple vésicule aplatie à l'empilement de 5 à 6 unités "membranaires" enroulés en vésicules multilamellaires. L'épaisseur d'une unité est d'environ 8 nm, identique au plasmalemme du zoïte (lequel apparaît légèrement plus épais que celui de la cellule, les feuilletts denses étant plus contrastés). On observe dans la région antérieure de certains parasites une vacuole presque entièrement transparente aux électrons mais renfermant des empilements membranaires comparables à ceux observés dans la vacuole parasitophore en formation (Pl. 3, fig. 3).

A l'apex du zoïte, la vésicule apicale est souvent très proéminente, et est fréquemment excentrée par rapport aux anneaux apicaux sous jacents (Pl. 2, fig. 3, Pl. 4, fig. 1). Le plasmalemme recouvrant cette région est par places moins bien défini, sans qu'il soit possible de

savoir si cet aspect correspond à une modification structurale ou à un changement local de l'incidence de coupe (Pl. 4, fig. 1,2). Si des micronèmes ou des pédoncules de rhoptries sont visibles dans cette région, nous n'avons jamais observé de contact entre ces organites et le plasmalemme apical. Les pédoncules de rhoptries semblent d'ailleurs se terminer le plus souvent sous la vésicule apicale (Pl. 2, fig. 3, Pl. 3, fig. 4).

Nous avons observé des coupes de zoïtes en cours de sortie, phénomène fréquemment observé sur le vivant et qui, dans le cas de *Sarcocystis*, ne semble pas léser la cellule hôte. Deux étapes peuvent être distinguées. La première consiste en une hernie faisant saillie à la surface de la cellule devant l'apex d'un zoïte et constituée de vésicules irrégulières dont la paroi apparaît par places trilaminée sans que ce caractère soit aussi net que pour les autres membranes cytoplasmiques (Pl. 4, fig. 1). Cette hernie est limitée extérieurement par le plasmalemme de la cellule hôte, dont la structure semble altérée à ce niveau. La limite interne est la membrane de la vacuole parasitophore, également moins bien définie. Le second stade, prélude à la sortie, montre la dispersion des vésicules qui doit suivre la rupture de la hernie (Pl. 4, fig. 3). Bien que la zone de sortie soit un peu perturbée, il semble que la membrane de la vacuole parasitophore et le plasmalemme se resoudent rapidement.

L'analyse de la pénétration par cryofracture avait été entreprise pour étudier la structure de la membrane de la vacuole parasitophore en formation (Pl. 2, fig. 2). La quasi absence de clivages interprétables à ce niveau n'a pas permis d'effectuer cette étude.

2.3.1.2. Toxoplasma gondii

La pénétration de tachyzoïtes de *Toxoplasma* dans des cellules HeLa a été étudiée selon le même protocole que celui utilisé pour *Sarcocystis*. Les images obtenues ont été classées en deux étapes : processus d'entrée et zoïtes intracellulaires (la plus petite taille de *Toxoplasma* et leur forme ovoïde permet en effet de définir beaucoup plus facilement le stade dans lequel le parasite a été fixé).

Les tachyzoïtes en cours d'invasion sont séparés de la cellule hôte par une membrane en continuité avec le plasmalemme et qui paraît bourgeonner des vésicules à contenu clair dans le cytoplasme environnant, lequel est appauvri en ribosomes (Pl. 5, fig. 1,2). Cette membrane, généralement

appliquée contre le zoïte semble dans certains cas discontinue, fragmentée en courts lambeaux adhérant au parasite ou au cytoplasme hôte (Pl. 5, fig. 3, Pl. 7, fig. 1, 2). Une apposition plus étroite entre zoïte et membrane de la vacuole parasitophore en formation est reconnaissable à l'endroit où s'inva-gine le plasmalemma de la cellule hôte, sur une distance d'environ $0,2 \mu\text{m}$, et qui se traduit sur les images par une densification du contact (Pl. 7, fig. 2). Cette formation est encore reconnaissable lors de la fermeture de la vacuole sur l'extrémité postérieure du parasite (Pl. 7, fig. 1).

Les zoïtes en cours d'entrée montrent à la partie antérieure un espace partiellement vide, limité par une membrane, débutant dans le conoïde et s'étendant postérieurement sur $0,7 \mu\text{m}$ environ (Pl. 5, fig. 3, Pl. 6, fig. 1). En forme d'ampoule plus ou moins allongée, souvent branchée, cette formation renferme des condensations irrégulières sur un fond clair. On observe parfois dans la région antérieure du zoïte une vacuole claire contenant des figures myéliniques (Pl. 6, fig. 2).

Enfin, on observe dans certains zoïtes en cours de pénétration des individus fils en voie d'élaboration (Pl. 5, fig. 1) ; ce fait est confirmé par l'observation de zoïtes intracellulaires fixés moins de 20 mn après la pénétration dont certains sont à un stade avancé d'endogenèse (Pl. 7, fig. 3).

Les zoïtes récemment entrés (2 mn) sont dans une vacuole limitée par une membrane généralement continue, parfois très ondulée, souvent étroitement appliquée contre le plasmalemma du parasite (Pl. 5, fig. 3, Pl. 6, Pl. 7, fig. 4). Le faible espace vacuolaire renferme un matériel granuleux de densité variable (Pl. 6, fig. 1, Pl. 7, fig. 4). La vacuole parasitophore est fréquemment entourée par une strate d'ergastoplasme particulière, dépourvue de ribosomes sur la face exposée au zoïte (Pl. 5, fig. 3, Pl. 6, fig. 2, Pl. 7, fig. 3, 4). L'espace situé entre cette strate et la membrane vacuolaire est épais de 25 à 50 nm et est dépourvu d'inclusions, excepté parfois des vésicules à centre clair identiques à celles décrites lors de la pénétration. L'ergastoplasme entourant le parasite est formé de lames de longueur variable séparées par de courts espaces. Sa mise en place n'est pas affectée par la présence de cycloheximide (1 mg/ml) appliquée sur les cellules depuis 30 mn avant la pénétration et jusqu'à la fixation.

Des expériences de pénétrations successives dans lesquelles les zoïtes étaient libérés par rupture des cellules hôtes (à l'homogénéiseur de DOUNCE) trente minutes après la mise en contact puis redéposés sur des cellules neuves ont permis de montrer que certains zoïtes au moins étaient capables de réaliser 3 invasions successives en 60 minutes.

2.3.2. DISCUSSION

Les problèmes principaux soulevés par l'invasion d'une cellule par un parasite sont les suivants :

- L'interaction est-elle spécifique, c'est-à-dire y a-t-il une reconnaissance entre les partenaires avant l'invasion ?
- Le plasmalemmes de la cellule est-il percé ou seulement refoulé devant l'envahisseur ?
- La pénétration est-elle active ou passive : la phagocytose peut-elle intervenir ?
- Le parasite excrète-t-il des facteurs de pénétration ?

Ces questions restent posées pour la plupart des parasites intracellulaires, nombreux chez les Protozoaires et les Procaryotes. Les quelques cas où une approche de réponse a été fournie montrent par ailleurs que les stratégies retenues par ces divers organismes pour envahir la cellule hôte varient d'un groupe à l'autre (GOREN, 1977), ce qui complique la tâche des investigateurs mais accroît l'intérêt de l'étude.

Nous envisagerons successivement les divers problèmes évoqués ci-dessus à la lumière de ce qui est connu de l'invasion de la cellule hôte par les zoïtes de Sporozoaires.

2.3.2.1. Spécificité

Le développement des techniques de culture *in vitro* a montré le manque de spécificité de l'invasion chez la plupart des Coccidiomorphes. Ainsi *Toxoplasma* peut envahir n'importe quelle cellule, excepté peut-être les hématies matures (DORAN, 1973), la raison de cette exclusion étant semble-t-il physique, due à la plus faible fluidité de leur membrane (TANAGE *et al.*, 1979). Les *Eimeria* ou *Sarcocystis* en culture infestent également une grande variété de types cellulaires (DORAN, *op. cit.*).

Par contre, les mérozoïtes érythrocytaires des *Plasmodium* font montre d'une spécificité d'hôte très étroite, d'autant plus stricte que l'hôte s'avance dans l'Evolution (BANNISTER, 1977), et n'envahissent de plus que des cellules de la lignée érythrocytaire.

Dans le cas de ces mérozoïtes cependant, une adhésion préalable à la cellule intervient (BANNISTER, 1977), puis probablement une interaction avec des récepteurs membranaires déclenchant le processus d'entrée (MILLER *et al*, 1979), phénomènes qui ne semblent pas intervenir chez les Coccidiomorphes non hématozoaires.

Mais même en l'absence de spécificité se pose la question de la reconnaissance d'un plasmalemme par le zoïte. Ou, dans une autre formulation, y a-t-il déclenchement d'un processus de pénétration par le contact zoïte-plasmalemme, et si oui, comment ? La question reste ouverte.

On peut se demander par ailleurs comment expliquer la spécificité d'hôte et de site *in vivo* de la plupart des Coccidies si elles sont capables d'envahir toutes les cellules. Le développement *in vitro* éclaire là encore le problème en montrant une spécificité de développement, indépendante de l'invasion, liée à l'origine des cellules tant au niveau de l'espèce que de l'organe (DORAN, 1973). Nos observations sur la sortie de plus de 99 % des zoïtes de *Sarcocystis* dans les 6 heures suivant la pénétration *in vitro* rejoignent ces résultats et suggèrent une reconnaissance de la cellule hôte après l'invasion, le zoïte pouvant dans ce cas ressortir et aller chercher mieux ailleurs s'il ne trouve pas dans la cellule envahie les conditions adéquates à son développement.

2.3.2.2. Devenir du plasmalemme de la cellule hôte au cours de la pénétration

Jusqu'aux observations de LADDA *et al* (1969) qui ont les premiers montré la préservation du plasmalemme de l'hématie s'invaginant devant les mérozoïtes de *Plasmodium berghei* et *P. gallinaceum*, la pénétration des Coccidies dans une cellule était considérée comme une effraction, avec percée de la membrane de l'hôte. Cette hypothèse a d'ailleurs été encore souvent soutenue ultérieurement (LONG et SPEER, 1977).

Il faut noter que la présence ou l'absence d'une membrane entourant le parasite à l'observation ultrastructurale est très dépendante de la qualité de la fixation. Par ailleurs, l'obliquité de la section influe, de même que les grossissements utilisés (deux membranes accolées peuvent être confondues en une seule et c'est probablement ce qui avait conduit NORRBY en 1970 à penser que le Toxoplasme pouvait être directement dans le cytoplasme deux heures après l'entrée. La fig. 1, Pl. 6, montre comment la confusion est

possible). Bien des travaux publiés résistent mal à ce type d'analyse et perdent ainsi de leur intérêt.

Un pas important a été réalisé par JENSEN *et al* qui ont les premiers procédé à une étude approfondie de la pénétration d'*Eimeria* (1975), puis d'*Isospora* (1978), en synchronisant l'entrée et en utilisant le rouge de ruthénium comme indicateur de communication éventuelle entre le compartiment cytoplasmique et l'extérieur. Ils démontrèrent ainsi la non traversée du plasmalemme au cours de l'invasion, celui-ci étant refoulé devant le parasite puis se resoudant derrière, après fermeture de la vacuole parasitophore. Ces résultats ont également été rapportés avec plus ou moins de précision chez d'autres genres : *Plasmodium* (BANNISTER *et al*, 1975, MC LAREN *et al*, 1979, AIKAWA *et al*, 1978), *Babesia* (RUDZINSKA *et al*, 1976), *Toxoplasma* (JONES *et al*, 1972, TAKEUCHI, 1977, AIKAWA *et al*, 1977, LYCKE *et al*, 1975). L'entrée des zoïtes de *Sarcocystis* semble se conformer à un tel schéma puisque nous n'avons jamais observé de rupture membranaire dans la vacuole parasitophore en formation. La question se pose par contre pour *Toxoplasma*, où nous avons obtenu fréquemment des images de discontinuité pour des stades terminaux d'invasion. Ces résultats rappellent l'observation rapportée par JENSEN et HAMMOND d'une désagrégation partielle et transitoire de la membrane de la vacuole parasitophore peu après la pénétration des sporozoïtes d'*Eimeria magna* (1975).

A ce propos, il faut noter que la technique utilisée pour accroître le nombre d'observations de pénétrations ne produit pas une synchronisation parfaite et conduit à l'observation de situations intervenant entre 0 et environ 2 minutes après l'entrée. Quand on sait que la durée de la pénétration est de l'ordre de quelques secondes, on réalise que la technique renseigne mal sur la séquence exacte des événements précoces de l'interaction hôte-parasite. Ainsi JENSEN et HAMMOND montrent dans une cellule deux sporozoïtes dont l'un est dans une vacuole et l'autre entouré par une membrane discontinue et il est très difficile de situer exactement l'emplacement et la durée de cette phase de déstabilisation membranaire dont on sait qu'elle est transitoire puisqu'ensuite la vacuole entière est toujours présente. Si ce que nous avons observé chez *Toxoplasma* correspond à ce que JENSEN et HAMMOND ont décrit, cette phase est probablement un peu plus précoce que chez *Eimeria* puisqu'elle commence en cours de pénétration.

Même si la discontinuité observée est peut-être artefactuelle, due à des perturbations intervenant pendant ou après la fixation, le fait de l'obtenir ou non alors que les expériences sur *Sarcocystis* et *Toxoplasma* ont été réalisées dans des conditions identiques témoigne d'une différence entre les membranes des vacuoles parasitophores en formation à travers un comportement différent envers les traitements de préparation à l'étude cytologique.

Le fait que les zoïtes de *Sarcocystis* puissent ressortir peu après l'entrée sans léser la cellule alors que le même comportement de la part de sporozoïtes d'*Eimeria* conduit à la lyse de la cellule hôte (*E. magna*, et observations personnelles sur *E. nieschulzi*) renforce cette hypothèse.

D'autres différences sont à noter entre *Sarcocystis* et *Isospora* d'une part, et *Eimeria*, *Toxoplasma* ou *Plasmodium* d'autre part : chez les seconds, on décrit dans le cytoplasme adjacent au plasmalemme en cours d'invagination des vésicules qui semblent sur certaines images, bourgeonner à partir de cette membrane. Chez *Sarcocystis* (ce travail) et *Isospora* (JENSEN et EDGAR, 1978) ce type de formations n'a été qu'exceptionnellement observé, et seulement dans la hernie que le zoïte rompt lorsqu'il sort d'une cellule. A l'inverse, entre le zoïte de *Sarcocystis* et la membrane hôte sont observés de nombreux profils myéliniques, beaucoup plus abondants que chez *Eimeria* et a fortiori que chez *Toxoplasma* ou *Plasmodium* où ils sont quasi absents. L'origine de ce matériel membranaire est indéterminée. Le fait d'en observer également parfois dans des vacuoles incomplètement vidées du zoïte suggère une provenance parasitaire et il pourrait s'agir des rhoptries, mais si c'est le cas, cette hypothèse demande à être étayée par des arguments plus solides que cette constatation morphologique. Par ailleurs, l'altération d'un plasmalemme (insertion d'une micro aiguille) peut également conduire à une prolifération membranaire (SZUBINZKA, 1978) et la participation de la cellule hôte à la formation de ces figures ne peut être exclue.

La cryofracture de la membrane parasitophore en formation pourrait apporter des informations très intéressantes sur sa structure. Des obstacles techniques rendent extrêmement difficile l'obtention de répliques de fractures de cette membrane et, dans tous les cas où elle a été tentée, l'opération a fourni des résultats très fragmentaires. Les quelques images obtenues (MC LAREN *et al*, 1979 : *Plasmodium*, E. PORCHET *et al*, 1980 :

Toxoplasma , nous-même : *Sarcocystis*) montrent une déplétion presque totale en particules intramembranaires dans les faces de fracture de cette membrane au cours de l'entrée des zoïtes. Ces résultats demandent à être affinés, en particulier par l'étude cinétique de l'évolution de la membrane vacuolaire au cours de et après la pénétration.

Ils permettent toutefois déjà d'affirmer que le plasmalemme de la cellule hôte refoulé par le parasite est profondément modifié. Ce fait avait été suggéré par DVORAK *et al* (1975) qui constataient un gonflement de l'hématie dû à une modification de perméabilité juste avant la fermeture de la vacuole hôte chez *Plasmodium*.

Les différences observées dans le comportement de la vacuole parasitophore néoformée (discontinuité ou non) suggèrent une variabilité spécifique dans la déstabilisation membranaire induite lors de l'entrée, et laisse donc entrevoir la possibilité de variations dans les mécanismes d'invasion.

2.3.2.3. Invasion active ou phagocytose ?

Quand la préservation du plasmalemme lors de l'entrée des zoïtes a commencé à être mise en évidence, l'analogie avec la phagocytose a été soulignée, introduisant dans la littérature une certaine confusion entre les deux phénomènes. Cette confusion est venue essentiellement de l'étude de *Toxoplasma* : les zoïtes sont petits, peu mobiles, et infestent souvent des phagocytes "professionnels" tels les macrophages péritonéaux. Des images de phagocytose de zoïtes ont ainsi été obtenues, et les auteurs ont ensuite fait appel, pour expliquer la pénétration dans des cellules non phagocytaires, à une "phagocytose induite", due à une action du parasite sur la cellule.

Bien que les deux phénomènes soient encore trop mal connus pour qu'on puisse exclure totalement une certaine communauté entre les mécanismes qui les régissent, plusieurs arguments conduisent à distinguer nettement la pénétration des zoïtes d'une phagocytose.

Le premier est qu'il n'a pas été trouvé dans des homogénats de *Toxoplasma* , de facteur augmentant la capacité phagocytaire de cellules envers des particules inertes , alors qu'il y était mis en évidence un facteur augmentant l'efficacité de pénétration des zoïtes (LYCKE *et al*, 1966).

Par ailleurs, chez les *Eimeria*, JENSEN et EDGAR (1976) ont montré que l'invasion n'était pas affectée par la diminution des capacités phagocytaires des cellules hôtes par des inhibiteurs métaboliques, mais qu'elle l'était sensiblement par l'altération de la mobilité des zoïtes. Cette pénétration de phagocytes bloqués par des drogues a été retrouvée pour les sporozoïtes de *Plasmodium* (DANFORTH *et al.*, 1980).

Dans le même ordre d'idées, l'observation de la pénétration d'*Eimeria* ou de *Sarcocystis* sur des tapis cellulaires, quand les zoïtes entrent en des temps de l'ordre de la seconde, traversent les cellules et en ressortent, exclut également une relation étroite avec la phagocytose. La durée d'ingestion de particules de taille comparable par des fibroblastes en culture est en effet de l'ordre de la minute (VICKER, 1977).

Enfin, l'invasion d'hématies par les mérozoïtes de *Plasmodium* ou de *Babesia*, parasites pourtant peu mobiles peut difficilement être attribuée à une capacité phagocytaire. Par contre les travaux récents de AIKAWA *et al.* (1978) ont mis en évidence l'existence d'une jonction annulaire entre les plasmalemmes du mérozoïte de *P. knowlesi* et de l'hématie, dont le déplacement vers l'arrière du parasite peut expliquer la pénétration. Ces auteurs suggèrent deux possibilités de fonctionnement pour cette "jonction mobile" : glissement le long de la membrane ou "zipper mechanism", c'est-à-dire mise en jeu de zones de contact successives se détachant après le passage de la jonction. Une certaine ambiguïté peut toutefois subsister, l'observation ultrastructurale ne permettant pas de préciser si la mobilité est due à l'hématie ou au parasite ; cependant, par analogie avec les autres Sporozoaires, il semble qu'il faille l'attribuer à ce dernier. Nous reviendrons sur ce point plus loin.

Une telle jonction mobile n'a pas jusque là été décrite chez d'autres Coccidiomorphes. Nos images en suggèrent l'existence chez *Toxoplasma*. Chez *Sarcocystis*, il existe des zones de contact étroit entre le zoïte et la membrane de la vacuole hôte en formation et il pourrait également s'agir de jonctions permettant le glissement du parasite à l'intérieur de la cellule.

2.3.2.4. Y a-t-il exocytose lors de la pénétration ?

Bien avant que soient connus les détails de l'interaction entre zoïte et cellule hôte, quand l'on croyait encore à l'effraction, les auteurs ont suggéré l'émission par le parasite de facteurs susceptibles d'agir sur la cellule pour faciliter l'invasion (enzymes lytiques en l'occurrence, GARNHAM *et al.*, 1961). Les observations s'affinant, les interprétations ont été progressivement corrigées, mais elles font toujours appel à une exocytose : il ne s'agirait plus de substances lytiques, mais de facteurs induisant l'augmentation de surface membranaire, soit par intercalation de substances amphiphiles (JENSEN et EDGAR, 1976 b), soit directement par addition de phospholipides (BANNISTER *et al.*, 1975).

La découverte des organites apicaux (rhoptries, micronèmes) en a fait immédiatement des candidats de choix, et en particulier les rhoptries, pour un tel rôle, surtout quand les observations ultérieures d'organites "vides" après pénétration sont venues renforcer la suggestion d'exocytose. Ce phénomène, s'il existe, n'a pas encore été rendu accessible à l'observation directe. L'analyse ultrastructurale de zoïtes en cours de pénétration n'a pas apporté d'images indiscutables de l'excrétion du contenu de l'un ou l'autre des organites. Les arguments morphologiques retenus par les auteurs sont de deux ordres : d'une part la présence de vacuoles partiellement vides et de forme rappelant les rhoptries dans la région antérieure de zoïtes récemment pénétrés, d'autre part, lors de l'utilisation de rouge de ruthenium lors de la fixation, la pénétration du traceur dans les pédoncules des organites (JENSEN *et al.*, 1975, 1978). Nos résultats étendent l'observation d'"organites vides" ou renfermant des profils membranaires comparables à ceux trouvés dans la vacuole hôte à *Toxoplasma* et *Sarcocystis*. Comme ceux de nos prédécesseurs, ils ne démontrent pas définitivement une exocytose. Ainsi, soit le phénomène est très rapide, et dans ce cas, il nécessite plus d'observations pour multiplier les chances de la mettre en évidence, soit il se fait par un système de pores petits ou mal préservés par la fixation glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium. JENSEN décrit des pores de 40 nm dans le plasmalemme apical des zoïtes d'*Isospora* ; nous avons également observé des interruptions membranaires dans cette zone, mais il nous paraît difficile d'éliminer les artefacts de préservation dans ces images... Par ailleurs, la persistance d'une vacuole partiellement vide évoque une excrétion par expansion du contenu plutôt que par contraction du contenant ; cela pourrait expli-

quer pourquoi c'est plus souvent, au moins chez les Hémozoaires, une diminution de densité des rhoptries qui est décrite et non leur vacuité.

Ces considérations montrent que l'observation morphologique est insuffisante à élucider l'intervention possible d'une exocytose lors de la pénétration. Dans un cas "*Toxoplasma*" une autre approche expérimentale a été utilisée, qui a également renforcé l'hypothèse d'exocytose, sans toutefois encore l'établir sans équivoque. Il s'agit de la mise en évidence du "Penetration enhancing factor" (facteur accroissant la pénétration) de *Toxoplasma* (LYCKE et LUND, 1966). Ces auteurs ont, par numération des Toxoplasmes intracellulaires après un temps donné après la pénétration, démontré l'existence dans les extraits de *Toxoplasma* d'un facteur accroissant l'efficacité de pénétration des zoïtes (A partir d'une suspension contenant le même nombre de parasites, il accroît jusqu'à plus de 60 % le pourcentage de zoïtes envahissant effectivement les cellules, celui-ci ne dépassant pas 40 % chez le témoin). Ils ont ensuite établi que ce facteur était une protéine "légèrement" acide et estimé sa masse moléculaire entre 70 000 et 150 000 (par gel filtration sur Sephadex G 200). Des anticorps contre une préparation enrichie en ce facteur ont été produits chez le rat et le lapin et ils en inhibaient le pouvoir promoteur de la pénétration. Par immunofluorescence l'antigène était détecté dans "des structures cytoplasmiques localisées dans la partie antérieure de *Toxoplasma*" (NORRBY, 1971). Enfin, le PEF était moins abondant dans les zoïtes sitôt après la pénétration et il semblait ne pas agir sur le pouvoir phagocytaire des cellules ou sur la mobilité des zoïtes, mais altérait les membranes plasmiques des cellules en culture à des doses cent fois supérieures à la concentration active sur la pénétration (celle-ci étant de l'ordre de $\mu\text{g/ml}$ de milieu) (LYCKE *et al.*, 1975). En utilisant le même système expérimental, LYCKE *et al.*, 1975 montraient également un effet promoteur de 5 enzymes sur la pénétration de *Toxoplasma* (β galactosidase, β glucuronidase, phosphatase acide, lysozyme, Hyaluronidase), bien que nécessitant des concentrations beaucoup plus élevées (au moins 50 fois) que le PEF pour obtenir le même résultat. A titre de comparaison, FAYER *et al.* (1970) n'ont pu mettre en évidence d'effet de la hyaluronidase sur la pénétration de sporozoïtes d'*Eimeria adenoeides* *in vitro*.

Par ailleurs, LYCKE *et al.* (1975) ont aussi mis en évidence un important effet promoteur de la pénétration des ions divalents (Ca, Mg), alors que TANABE *et al.* (1980) ne le retrouvent que pour le magnésium, et notent en plus un effet des monosaccharides, dans un système utilisant des erythro-

cytes d'embryons de poulets. L'importante somme de résultats des auteurs suédois montre que le phénomène pénétration est accessible à l'expérimentation *in vitro* et qu'au moins un facteur protéique issu des zoïtes de *Toxoplasma* a une influence sur son déroulement. L'exocytose du PEF lors de la pénétration n'a cependant pas été montrée de manière directe. Par ailleurs, bien que les auteurs l'excluent, son influence sur la mobilité des zoïtes n'a pas été mesurée et cet aspect reste à étudier avec précision. La localisation du facteur dans la zone antérieure du zoïte demande à être précisée ; *Toxoplasma* possède en effet au moins 3 types d'organites (rhoptries, micronèmes, granules denses) à ce niveau (Voir Chapitre 4). Le fait que des enzymes très différents soient également efficaces suggère que divers types de perturbations membranaires de la cellule hôte peuvent faciliter l'invasion de manière aspécifique.

On constate donc que si le travail expérimental sur *Toxoplasma* donne des raisons supplémentaires de penser qu'une exocytose intervient en cours de pénétration de la cellule hôte, cette éventualité reste à démontrer définitivement et à interpréter. Par ailleurs, ainsi que nous l'avons suggéré plus haut, le comportement de la membrane vacuolaire pendant et après pénétration varie selon les genres observés, et il faut donc s'attendre à une variabilité des facteurs liés à la pénétration s'ils existent dans tous les cas.

En outre, si le système rhoptries micronèmes est considéré comme candidat à l'exocytose lors de l'invasion de la cellule hôte, il faut remarquer que des organites comparables morphologiquement existent chez des Sporozoaires ne présentant pas de phase intracellulaire (Grégarines).

Ils ont alors été considérés comme participant à l'ancrage du sporozoïte dans la cellule hôte (DESPORTES, 1969) et également comme réserves d'enzymes équivalant à des lysosomes (la présence de phosphatase acide y ayant été démontrée (SCHREVEL, 1968). VIVIER et PETITPREZ (1972) ont également détecté cet enzyme dans les rhoptries de *Toxoplasma*. Par ailleurs, la migration de certains zoïtes à travers les tissus pourrait également impliquer l'intervention de sécrétions lytiques issues d'organites de la région antérieure des parasites (traversée de la basale intestinale par les sporozoïtes *d'Aggregata*, PORCHET, RICHARD et FERREIRA, 1980), et l'on peut se demander, dans le cas de *Sarcocystis tenella* par exemple, qui se développe en profondeur dans la muqueuse intestinale du chat, si certains organites ne jouent pas un rôle dans le cheminement trans-tissulaire des zoïtes.

Ces derniers commentaires montrent qu'il est nécessaire de ne pas considérer la pénétration intracellulaire comme seul mode d'interaction des zoïtes avec l'hôte et de ne pas restreindre l'étude du rôle des organites denses de la région antérieure à ce seul phénomène.

2.4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'analyse ultrastructurale a montré que les zoïtes de Sporozoaires sont des cellules hautement différenciées, issues d'un processus de genèse complexe. Elle a éclairé certains aspects de leur rôle essentiel, c'est-à-dire l'invasion de la cellule hôte, mais elle ne permet pas d'expliquer les mécanismes physiologiques des phénomènes observés.

Ces travaux ont permis de poser une série de questions concernant la nature, l'origine et la fonction des structures décrites, et qui nécessitaient pour les résoudre, la mise en oeuvre d'autres méthodes d'investigation.

Parmi tous les composants du zoïte, ceux qui retiennent d'abord l'attention sont les différenciations originales car on peut supposer qu'elles participent aux fonctions particulières de ce stade et donc essentiellement à l'interaction précoce avec la cellule hôte. Et nous avons vu en effet que l'invasion semble impliquer d'une part la pellicule, génératrice du déplacement, et d'autre part les organites de la région antérieure, supposés sécréteurs.

Il apparaissait donc nécessaire d'approfondir la connaissance de ces deux formations pour pouvoir à la fois progresser vers l'élucidation de leur (s) fonction (s) et disposer de moyens plus efficaces d'étude de leur genèse.

Nous avons pour notre part oeuvré à préciser la structure de ces formations à l'échelon moléculaire et tenté d'étudier certains des aspects fonctionnels qui y étaient liés. Nous rapporterons successivement dans les chapitres suivants les résultats obtenus sur l'architecture et la fonction de la pellicule des zoïtes, puis ceux obtenus sur les organites denses de la région antérieure (Rhoptries, micronèmes).

CHAPITRE 3

ARCHITECTURE MOLECULAIRE ET PHYSIOLOGIE
DE LA PELLICULE DES ZOITES DE COCCIDIES.

3.1. ARCHITECTURE MOLECULAIRE DE LA PELLICULE

Nous avons étudié la pellicule des zoïtes selon 2 voies : d'une part l'analyse de répliques de cryofracture, d'autre part l'isolement de "ghosts" et l'étude de leur composition protéique.

3.1.1. CRYOFRACTURE

L'utilisation de cette technique a apporté des résultats spectaculaires sur l'architecture des membranes, là où les autres méthodes de préparation ne pouvaient donner que peu d'informations. En effet, la rupture sous vide d'échantillons biologiques congelés très rapidement (pour éviter la formation de cristaux de glace) conduit à une fracture préférentielle au sein de la zone hydrophobe des membranes cellulaires (entre les extrémités des chaînes d'acides gras des phospholipides selon la représentation de DANIELLI et DAVSON, 1943) et met en évidence des particules intramembranaires (P. I. M.) dont il a été montré dans certains cas favorables (SEGREST *et al.*, 1974) qu'elles correspondent essentiellement aux protéines intégrales de la membrane (selon le modèle de SINGER et NICHOLSON, 1972).

Appliquée aux zoïtes, cette technique révèle 3 plans de fracture dans la pellicule, qui correspondent au plasmalemme et aux deux membranes du complexe interne. Elle nous a permis de mettre en évidence des différenciations très caractéristiques qui seront décrites ci-dessous.

Nous avons étudié ainsi les sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* et ceux de *Plasmodium yoelii nigeriensis*, et les résultats obtenus ont fait l'objet des publications insérées en annexe. Par ailleurs, des schizontes de seconde génération d'*Eimeria necatrix* ont fait l'objet d'observations préliminaires. Enfin, la technique d'ombrage rotatif, récemment introduite, a permis d'apporter quelques précisions sur la structure des particules intramembranaires.

3.1.1.1. Le sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi*

" Freeze Fracture Study of the Pellicle of
an Eimerian Sporozoite (Protozoa , Coccidia) ."

J. Ultrastruct. Res. 62 , 94-109 , 1978 , en collaboration avec
G. Torpier.

(Article inséré en annexe)

3.1.1.2. Le sporozoite de *Plasmodium yoelii nigeriensis*

" Structure de la pellicule du sporozoite de
Plasmodium yoelii : étude par cryofracture . "

C. R. Acad. Sci. Paris 288 , 623-626 , 1979 , en collaboration avec
G. Torpier , P. Maurois , G. Premsier et R. Sinden .

(Article inséré en annexe)

3.1.1.3. Schizogonie chez *Eimeria necatrix*

L'étude par cryofracture de la genèse des mérozoïtes chez *Eimeria necatrix* avait été entreprise dans le but d'analyser plus finement l'élaboration de la pellicule, déjà partiellement décrite par les techniques classiques (voir Ch. 2). La rareté des fractures favorables dans les schizontes a limité l'intérêt de ce travail. Nous avons cependant retrouvé la caractéristique originale de cette espèce où le complexe membranaire interne est d'abord formé de longues lames dont une partie seulement est accolée contre le plasmalemme. Dans ce cas, les quelques images obtenues montrent l'absence de particules dans la partie "flottante" (face P i) quand les alignements caractéristiques sont déjà présents dans la zone accolée au plasmalemme (Pl. 8, fig. 2). Par ailleurs, la rosette apicale semble n'apparaître que tardivement dans les mérozoïtes en cours d'évagination et ne peut donc servir de point de repère sur les schizontes immatures.

Les mérozoïtes submatures (ou mûrs, la distinction étant délicate quand ils sont encore dans la vacuole hôte, et le fait d'être libérés du reliquat cytoplasmique n'étant pas un critère de maturité, voir DUBREMETZ, 1975) présentent à tous égards des caractéristiques de cryofracture comparables à celles des sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* ou des zoïtes de *Sarcocystis tenella* (Pl. 8, fig. 1). Des différences spécifiques peuvent exister quant aux densités en PIM, au nombre de plaques du complexe interne, au nombre de rangées de PIM dans les plaques, mais nous n'avons pas quantifié ces données chez *E. necatrix*.

3.1.1.4. Apports de l'ombrage rotatif après cryofracture

Les observations de répliques de cryofracture de sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* où l'ombrage métallique est réalisé avec rotation de l'objet (et non de manière unidirectionnelle comme c'est classiquement le cas) apportent des informations complémentaires sur la structure des particules intramembranaires (Pl. 8, fig. 3). Seul le plasmalemme a jusque là pu être étudié de façon satisfaisante, les couches sous jacentes étant plus rarement exposées favorablement à l'ombrage. Les P.I.M. apparaissent composées de sous unités (de 1,5 à 3 nm après ombrage) arrangées généralement en couronne, le nombre des sous-unités croissant avec le diamètre de la particule selon une relation linéaire. Des images évoquant des fusions de particules sont par ailleurs observées.

3.1.2. ANALYSE DES GHOSTS DE ZOÏTES DE SARCOCYSTIS

Le protocole de fractionnement cellulaire mis au point pour les zoïtes de *Sarcocystis tenella* (Chapitre 4) permet d'obtenir des "ghosts" purifiés de zoïtes. Ceux-ci sont constitués de grands fragments de pellicule ayant conservé leur structure trimembranaire (Pl. 11, fig. 1). L'observation en contraste de phase montre que la forme du zoïte est fréquemment conservée, ce que les coupes fines de sections transversales fermées révèlent également. Il est commun de trouver des régions antérieures de taille comparable à celle de la cape apicale, où persistent le conoïde, les anneaux apicaux et l'anneau d'insertion des microtubules sous pelliculaires et où l'on remarque l'adhérence de la vésicule apicale au plasmalemme, à l'emplacement de la rosette du même nom (Pl. 11, fig. 2). Des microtubules sous pelliculaires sont encore présents, surtout dans la région antérieure.

La fraction renferme également des profils membranaires simples, dont il est difficile de savoir s'ils viennent de la dégradation de la pellicule ou de membranes cytoplasmiques, enveloppe nucléaire en particulier.

L'analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide SDS en milieu dissociant des protéines des "ghosts" de *Sarcocystis* met en évidence une trentaine de composants protéiques dans la zone 0-100 KD. Nous détaillerons plus loin cette carte protéique pour montrer qu'elle diffère avant et après activation des zoïtes par la trypsine (Ch. 5).

3.2. OBSERVATIONS SUR LA PHYSIOLOGIE DE LA PELLICULE DES ZOÏTES

Les observations réalisées sur les zoïtes vivants lors de l'interaction avec des cellules ou divers substrats nous ont convaincu du caractère superficiel de la motilité chez ces organismes et donc d'une participation très probable de la pellicule dans ce phénomène. Deux aspects principaux seront rapportés ici. Le premier concerne l'interaction du sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi* avec divers substrats. Le second est l'activation par la trypsine des bradyzoïtes de *Sarcocystis tenella*.

3.2.1. MOTILITE SUPERFICIELLE CHEZ LE SPOROZOITE D'*ETMERIA*
NIESCHULZI

3.2.1.1. Mouvements des sporozoïtes : interaction avec un
support

Les sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* comme la plupart des zoïtes de Coccidies (HAMMOND, 1973), présentent deux types principaux de mouvements lors de l'observation sur le vivant à 37° C : glissement sur le substrat d'une part et flexion d'autre part. Seul le premier est inhibé par la cytochalasine B à partir de 20 µg/ml. La colchicine est sans effet sur la motilité qui est inhibée à + 4° C et très ralentie à 20° C.

Les mouvements de glissement, dont l'amplitude varie de quelques-unes à quelques dizaines de longueurs cellulaires alternent avec des phases de repos de durée variable. Les glissements se terminent parfois en position redressée, quand seule l'extrémité postérieure du zoïte touche encore la lame. Dans ce dernier cas, les zoïtes sont capables de pivoter sur eux-mêmes et d'accomplir des rotations complètes sur leur extrémité postérieure. Mais en aucun cas, ils ne quittent le fond pour "nager" dans le milieu.

Le glissement a toujours lieu dans le même sens : la partie antérieure, plus effilée, se déplaçant vers l'avant. Nous n'avons jamais vu de zoïtes d'*Eimeria* (ou de *Sarcocystis*) se déplacer vers l'arrière, sauf quand ils étaient refoulés par un obstacle souple (cellule par exemple).

La vitesse de déplacement n'a pas été quantifiée de façon précise mais elle peut être grossièrement estimée à environ une longueur par seconde, soit de l'ordre de 10 µm/s.

Lorsque le substrat (lame de verre) est artificiellement couvert de charges positives par absorption de polylysine (FISHER, 1975), et que l'on observe la sédimentation progressive de sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi*, on constate qu'arrivés à proximité d'une telle surface, les zoïtes sont brusquement attirés et s'étalent, lysés, sur le verre. Seuls ceux qui tombent sur l'extrémité postérieure ne sont pas tués et peuvent pivoter comme décrit ci-dessus ; ils subissent cependant le sort de leurs congénères s'ils se couchent sur la lame.

3.2.1.2. Interaction des zoïtes avec des éléments figurés (hématies) (Pl. 10, fig. 4, 5)

La mise en présence de sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* et d'hématies (de souris) permet d'observer des phénomènes curieux d'interaction entre les deux types cellulaires. Il est ainsi fréquent de voir des sporozoïtes en cours de déplacement venir au contact d'une hématie, soit par la partie antérieure, soit par un point quelconque de leur surface et, le zoïte restant sur place, de voir l'hématie glisser le long du parasite jusqu'à l'extrémité postérieure où elle reste accrochée plus ou moins longtemps pendant les déplacements ultérieurs du parasite. Ce phénomène se déroule à une vitesse comparable à celle des déplacements sur la lame.

Dans le cas où les hématies sont fixées sur le fond par une couche de polylysine, le zoïte peut, tout en restant accroché à un globule par son extrémité postérieure, entrer en contact avec une autre hématie et la déformer par glissement du point de contact vers l'arrière (la déformation est réversible, le contact pouvant revenir à son point de départ lorsque le sporozoïte semble relâcher la tension).

3.2.1.3. Interaction des sporozoïtes avec une molécule chargée positivement : la ferritine cationisée

La ferritine cationisée (ferritine enrichie en groupements $-NH_2$, $pH_i > 8$, au lieu de 4,6 pour la protéine native) a été introduite par DANON *et al* (1972) pour l'étude ultrastructurale des sites anioniques membranaires à pH physiologique. Le marquage de cette molécule par la fluoresceïne (KING & PRESTON, 1977 a) a étendu son usage à la microscopie photomicroscopie.

Nous avons utilisé la ferritine cationisée native (MILES) ou le dérivé fluorescent préparé pour nous par D. AFCHAIN et J. FRUIT (U 165 INSERM).

L'incubation de sporozoïtes vivants d'*Eimeria nieschulzi* dans une solution de ferritine cationisée (50 $\mu g/ml$, PBS) conduit à un marquage général du plasmalemme (Pl. 9, fig. 1, 3 ; Pl. 10, fig. 2) qui peut être suivi d'une redistribution du ligand (formation d'une "capé") sur l'extrémité postérieure de la cellule (tache brillante en fluorescence, amas de molécules en ultrastructure, Pl. 9, fig. 2, 5, 7).

Si l'incubation est réalisée à 4° C, quelle qu'en soit la durée, les zoïtes restent marqués sur toute leur surface (Pl. 10, fig. 2). La cape postérieure ne se forme que lorsqu'on laisse se réchauffer le milieu. Si l'incubation a lieu à 37° C, de nombreuses capes sont déjà présentes après 10 secondes ; le microscope électronique montre cependant encore à ce stade en plus de la cape quelques petits amas (patches dans la terminologie anglo-saxonne, TAYLOR *et al*, 1971) dispersés sur le corps cellulaire (Pl. 10, fig. 3). Après un temps d'incubation de l'ordre d'une seconde à 37° C, les cellules sont entièrement fluorescentes, mais présentent déjà une légère cape postérieure. Après une minute à 37° C, le pourcentage de capes ne change plus; il apparaît par contre un nombre croissant de zoïtes dépourvus de marquage. L'observation à 37° C montre que ces derniers sont vivants et mobiles, et sont en fait des cellules ayant abandonné leur cape sur le verre.

L'incubation à 20° C ralentit le "capping" et le pourcentage de capes ne se stabilise qu'après environ 30 minutes. Dans tous les cas, il reste approximativement 30 % de zoïtes uniformément marqués ; nous n'avons jamais vu bouger de tels zoïtes, qui sont probablement physiologiquement déficients.

La fixation des cellules par le glutaraldéhyde avant l'incubation avec le ligand entraîne un marquage uniforme stable de toute la surface cellulaire (Pl. 9, fig. 1, 3), même après neutralisation des groupements aldéhydiques libres par le chlorure d'ammonium (selon WESSELS *et al*, 1976). La présence de poly L Lysine (Masse moléculaire environ 230 000, SIGMA) ou d'acide polyglutamique (Masse moléculaire environ 8 000, SIGMA) dans le milieu n'influence pas le phénomène quand ils sont en concentration vitale (0,1 µg/ml pour la première, très toxique pour les zoïtes, 0,5 mg/ml pour le second). L'incubation préalable des zoïtes dans la neuraminidase (KOCH-LIGHT, 25 U/ml) pendant 20 minutes à 37° C est également sans effet. La cytochalasine B à partir de 20 µg/ml inhibe la formation de capes et l'effet n'est pas dû au diméthylsulfoxyde, vecteur de la drogue dans le milieu.

Lors des observations sur le vivant, il arrive de rencontrer des zoïtes partiellement fluorescents, c'est-à-dire dont la partie antérieure est dépourvue du marqueur sur une certaine longueur (Pl. 9, fig. 5). Tous les intermédiaires entre la fluorescence uniforme et la cape ont été observés et ils pouvaient représenter jusqu'à 10 % des parasites rencontrés. Aucun d'entre eux n'était cependant mobile.

La formation de capes n'a aucun effet sur la distribution des particules intramembranaires du plasmalemmes ou du complexe interne.

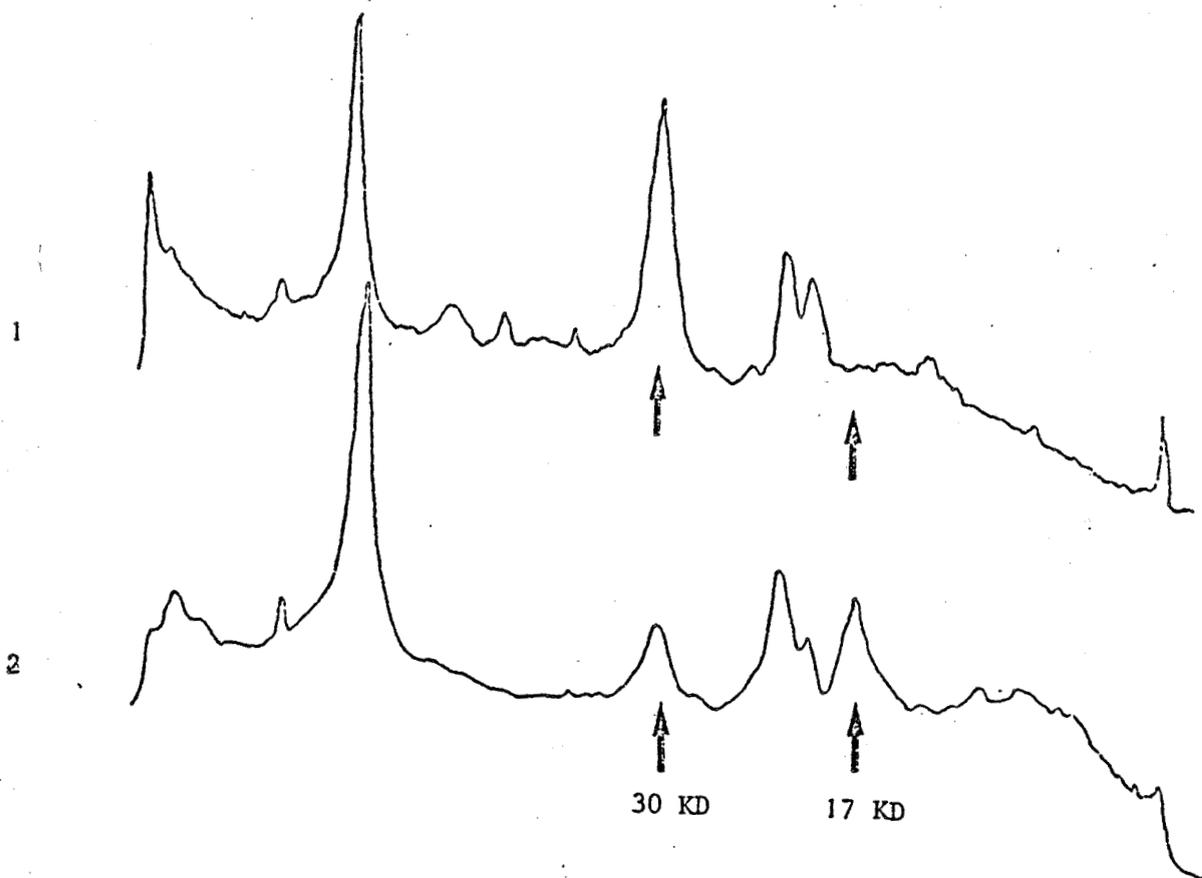
3.2.2. DECLENCHEMENT DE LA MOTILITE DES ZOITES DE *SARCOCYSTIS TENELLA* PAR LA TRYPSINE

3.2.2.1. Activation enzymatique des zoïtes

Certains des zoïtes étudiés ne sont pas spontanément mobiles à 37° C en solution saline physiologique. C'est le cas en particulier des bradyzoïtes de *Sarcocystis tenella*. Nos travaux sur cet organisme ont nécessité d'en obtenir l'activation *in vitro*. Pour ce faire, nous avons tenté de nous rapprocher des conditions naturelles d'infestation (récemment reconnues à l'époque pour être celles régnant dans l'intestin du chat, ROMMEL *et al*, 1972).

Le déclenchement enzymatique de la motilité par la trypsine (DIFCO 1 : 250) a ainsi été démontré (DUBREMETZ *et al*, 1975). (N'ayant pas jusque là analysé l'effet des inhibiteurs spécifiques et ayant observé un effet activateur de l'alphachymotrypsine, nous ne pourrions ici définir avec certitude l'enzyme actif, à moins que les deux le soient). D'autres protéases (papaine, pronase, pepsine) se sont avérées incapables de déclencher le mouvement, de même que les phospholipases C et D. Par contre, certains substituants ont été mis en évidence, qui miment l'action de la trypsine mais sont généralement beaucoup moins efficaces, c'est-à-dire que l'activité des zoïtes est alors très faible et ne permet pas la pénétration dans les cellules. Il s'agit du sérum de veau, de certains détergents non polaires comme le Triton X 100 (0,01 %), ainsi que la bile de boeuf ou le taurocholate de sodium à 1 %.

L'activation persiste après lavage et resuspension des zoïtes dans une solution saline dépourvue d'enzyme.



Enregistrement densitométrique d'autoradiogrammes de zoites de *Sarcocystis tenella* iodés par la lactoperoxydase.

1 : zoites iodés

2 : zoites iodés puis trypsinés

(voir planche 11 , pistes F et G)

3.2.2.2. Modifications membranaires lors de l'activation

3.2.2.2.1. - L'étude par cryofracture de zoïtes fixés avant ou après activation n'a pas révélé de différence significative dans la densité en particules intramembranaires ni dans leur distribution entre les faces. Les alignements de particules de la face Pe existent aussi bien avant l'activation qu'après et, bien qu'ils paraissent plus abondants dans les zoïtes fixés en cours d'interaction avec des cellules, nous n'avons pu quantifier cette impression, faute de pouvoir observer la totalité de la surface de chaque zoïte.

3.2.2.2.2. - L'étude biochimique a par contre révélé des différences entre les profils électrophorétiques de pellicules de zoïtes isolées avant ou après activation (Pl. 11). La différence essentielle introduite par l'activation se traduit sur des gels peu chargés par la disparition d'une protéine majeure de 32 KD et l'apparition d'une protéine de 18 KD. Des dépôts plus importants et une résolution plus fine montrent que la situation est plus complexe et que des groupes de polypeptides sont concernés ; ils révèlent par ailleurs de très nombreuses différences mineures, disparition ou apparition, atténuation ou renforcement de bandes, s'étageant sur toute la longueur du profil.

L'iodination des protéines superficielles par la lactopéroxydase montre également une modification du profil obtenu lors de l'action de la trypsine.

En effet, les autoradiogrammes d'électrophorèse de zoïtes iodés montrent quatre bandes majeures (83, 30, 22, 20 KD) tandis que chez les mêmes zoïtes iodés puis trypsinés une cinquième bande apparaît (17 KD) alors que la bande 30 KD est fortement atténuée. Un léger glissement du composant 83 KD vers 81 KD accompagné d'un renforcement d'intensité relative est également noté.

3.3. DISCUSSION

Les résultats obtenus, tant sur le plan structural que sur l'aspect fonctionnel, sont loin de permettre l'explication de la physiologie membranaire des zoïtes de Coccidie. Les questions abordées nous conduisent cependant vers une définition plus précise des problèmes posés par cette pellicule.

La caractéristique à nos yeux la plus importante est le phénomène de motilité superficielle des zoïtes. Cette propriété, rarement évoquée dans la littérature permet en effet d'expliquer tant la mobilité des parasites que la dynamique de la pénétration dans la cellule hôte.

Elle est probablement une nouvelle illustration de la "fluidité membranaire" suggérée par SINGER et NICOLSON (1972) et abondamment démontrée depuis.

Nous tenterons donc de replacer nos résultats dans le cadre de cet important aspect de la Biologie Cellulaire.

3.3.1. FORMATION DE CAPES

3.3.1.1. Charges superficielles des zoïtes

Le marquage des zoïtes par la ferritine cationisée témoigne de la présence de charges négatives superficielles couvrant la cellule. Cette propriété est banale, la plupart des cellules possédant une charge de surface résultante négative (WEISS, 1969). Cette charge fut d'abord étudiée par électrophorèse des cellules entières (AMBROST E. J., 1966), puis par l'utilisation de techniques cytochimiques léthales (Fer colloïdal, GASIC *et al.*, 1968) puis vitales (Ferritine cationisée, DANON *et al.*, 1972). Cette dernière molécule a sur les autres l'avantage de permettre l'observation sur le vivant. Son inconvénient majeur est qu'elle induit un réarrangement des charges de surface (discuté plus bas) et qu'il s'agit donc d'une sonde perturbatrice. En fixant préalablement, ou en opérant à 4° C, on obtient toutefois une image relativement fidèle de la répartition superficielle des charges et certains sont allés jusqu'à quantifier la capacité de liaisons

possibles (par fluorescence, KING et PRESTON, 1977, ou marquage radioactif, GRINNEL & HAYES, 1979). Des doutes ont cependant été récemment émis sur l'innocence de la fixation, même quand elle est suivie d'une neutralisation des groupements chargés introduits (BURRY & WOOD, 1979). En effet, le pontage des protéines par le fixateur peut modifier leur structure tertiaire et par là l'exposition superficielle des groupements chargés. D'après ces auteurs, la fixation au formaldéhyde n'a pas ce défaut, mais elle a rarement été utilisée avant les marquages par la ferritine cationisée.

Les charges négatives de surface sont attribuées essentiellement aux groupements carboxyl (acides sialiques, acides aminés), aux phosphates (phospholipides), aux sulfates (sulfolipides) (KING & PRESTON, 1977, BURRY & WOOD, 1979). Dans le cas des sporozoïtes, il semble qu'on puisse exclure une participation des acides sialiques, la neuraminidase étant sans effet sur l'interaction avec le ligand. C'est également le cas chez les amibes (KING & PRESTON, 1977), les neurones en culture (WESSELLS *et al.*, 1976), les trypanosomes (DWYER, 1975), les cellules pancréatiques B (HOWELL et TYHURST, 1977), les cellules d'hépatome de rat (MOLLER et CHANG, 1978), les mycoplasmes (SCHIEFER *et al.*, 1976), alors que dans d'autres cas, illustrés en particulier par les hématies (DANON *et al.*, 1972) ou divers types cellulaires normaux ou transformés (MARIKOWSKI *et al.*, 1974), l'action de la neuraminidase supprime ou diminue considérablement le marquage par la ferritine cationisée.

L'absence d'acides sialiques chez les Protozoaires (voir PHILIPPE *et al.*, 1979) pourrait expliquer nos résultats sur ce point.

Chez des stades intraérythrocytaires de *Plasmodium berghei*, SEED et KREIER⁽¹⁹⁷⁶⁾ mettent en évidence par électrophorèse une charge nette négative à pH physiologique et l'attribuent aux phospholipides. Cependant, la charge électrophorétique d'une cellule n'est pas comparable à celle détectée par les ligands (BURRY & WOOD, 1979) et, comme KING et PRESTON (1977), il nous semble possible d'exclure une telle interprétation pour les sporozoïtes car on imagine mal une "capping" des phospholipides tel que celui visualisé par la ferritine cationisée.

La nature des sites anioniques mis en évidence à la surface des sporozoïtes d'*Eimeria* reste donc à déterminer. Les phénomènes de capping observés accroissent l'intérêt de cette détermination, puisqu'ils montrent qu'il s'agit de sites mobiles dans le plan de la pellicule et que leur étude peut apporter des informations sur la physiologie de cette dernière.

3.3.1.2. Capping

La formation de capes induites par des ligands multivalents, observée pour la première fois chez des lymphocytes B (TAYLOR *et al*, 1971), a été décrite depuis chez de très nombreux types cellulaires. Ce phénomène consiste généralement en un marquage général de la surface cellulaire suivi par une redistribution en plages ("clustering", "patching") puis en une seule cape ("capping") du ligand suivi d'une phagocytose ou d'une élimination dans le milieu ("shedding") (SCHREINER & UNANUE, 1976). Les ligands induisant le "capping" sont des anticorps, des lectines, des polycations, des hormones. Des comportements très variables ont été décrits quant aux conditions de blocage ou de déclenchement du phénomène en fonction des cellules, des ligands, de la température, d'agents pharmacologiques divers. Une telle diversité a rendu caducs les essais successifs d'interprétation unitaire du phénomène et il a été suggéré qu'il puisse s'agir de processus différents régis par des mécanismes distincts (SCHREINER et UNANUE, 1976, NICOLSON, 1976, GERSHON, 1978).

Une distinction essentielle est à faire entre le regroupement de récepteurs en petits agrégats (Clustering, patching) et la formation d'une cape. Le premier phénomène est usuellement spontané, indépendant des drogues, inhibiteurs métaboliques, ou du ligand pourvu que ce dernier soit multivalent et il correspond à une précipitation des protéines dans le plan de la membrane, induite par le ligand (NICOLSON, 1976, GERSHON, 1978). Il n'est restreint que dans certains cas à basse température, et la cause en serait l'accroissement de viscosité des lipides membranaires (SCHREINER et UNANUE, 1976). Le capping est par contre lié à l'intégrité métabolique de la cellule et deux mécanismes principaux ont été avancés pour l'expliquer. Le premier fait intervenir les éléments du cytosquelette qui reconnaîtraient plus ou moins directement les agrégats ligand-induits et les conduiraient à un pôle de la cellule (De PETRIS, 1977). Le second implique un mouvement polarisé de la membrane ou de certains de ses composants (qui entraînerait les agrégats (lipid flow, BRETSCHER, 1976). Les deux systèmes pourraient exister isolément ou simultanément (STERN *et al*, 1979).

Dans tous les cas, la formation de capes apparaît comme un moyen pour la cellule de neutraliser une molécule toxique ou sensibilisante.

La signification biologique du phénomène est surtout apparente dans le cas des "cappings" immuno induits : stimulation de la mobilité des lymphocytes B (UNANUE *et al*, 1974), élimination des anticorps de l'hôte chez divers parasites (voir plus loin). Le rejet (shedding) de la cape apparaît alors comme un cas particulier de la propriété qu'ont les cellules de relarguer des composés superficiels dans le milieu (DOLJANSKI et KAPPELLER, 1976).

3.3.1.3. "Capping" d'Anticorps chez les Protozoaires parasites

La formation de capes provoquée par l'interaction avec des anticorps spécifiques a été décrite chez divers protozoaires parasites avec une précision variable.

Chez *Toxoplasma gondii*, l'incubation de zoïtes dans un sérum humain immun, puis dans des anticorps anti-globulines humaines fluorescents, marqués par la peroxydase ou radioactifs induit le capping des ligands, le phénomène étant inhibé à basse température ou par les inhibiteurs métaboliques. Les auteurs (DZBENSKI et ZIELINSKA, 1976 ; DZBENSKI *et al*, 1976) attribuent à la cape une localisation antérieure, mais leurs images ne sont pas convaincantes. Ils signalent d'autre part un rejet des capes dans le milieu mais n'ont pu en obtenir de preuve directe.

Les sporozoïtes mûrs de certains *Plasmodium* incubés à 37° C dans le sérum d'un hôte immun développent une "circumsporozoïte precipitate (CSP) reaction" qui consiste en une accumulation progressive de matériel filamenteux couvrant la partie postérieure du sporozoïte et se prolongeant par une traîne dépassant parfois la longueur du parasite. A 4°, ou fixé, le parasite est uniformément couvert par le "coat" et la traîne ne se forme pas. Il semble donc s'agir bien ici d'une formation de cape, "attempt by the parasite to shed the coat deposited as a result of its interaction with immune serum" (COCHRANE *et al*, 1976). Il faut noter que lorsque cette réaction avait été décrite pour la première fois, elle avait été localisée à la partie antérieure des zoïtes (VANDERBERG *et al*, 1969) et interprétée comme une sécrétion des rhoptries (VANDERBERG *et al*, 1972). Cette observation erronée avait par ailleurs mené à croire que les sporozoïtes avançaient à reculons (VANDERBERG, 1974). Cette remarque justifie nos doutes quant à la localisation exacte de la cape observée chez *Toxoplasma*.

Nous avons réalisé des expériences préliminaires d'incubation de sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* avec un sérum de lapin immunisé puis avec un conjugué anti-immunoglobulines de lapin fluorescent. Elles ont montré un capping postérieur et une élimination de la cape formée.

Si toutes les caractéristiques de ce phénomène restent à étudier, il confirme la polarité antéropostérieure du capping chez les zoïtes de Coccidiomorphes. L'apparente exception du Toxoplasme reste à confirmer et nécessite une investigation plus précise.

Les flagellés présentent également des réarrangements superficiels immunoinduits. Le phénomène a été étudié très précisément chez *Leishmania donovani* (DWYER, 1976). Qu'il s'agisse d'immunofluorescence directe ou indirecte, et de sérums immuns naturels ou induits, le marquage uniforme de la surface cellulaire est suivi par une aggrégation puis un "capping" du ligand vers la région antérieure du flagellé où se trouve le dictyosome (pro ou amastigote). Les inhibiteurs métaboliques, le froid, inhibent le phénomène, la colchicine et la cytochalasine B sont par contre inopérants et cette inefficacité est rapprochée de leur absence d'effet sur la motilité des promastigotes.

Des variations existent quant au déroulement du processus chez les autres flagellés étudiés. Chez *Trypanosoma brucei*, deux couches d'anticorps (Immunofluorescence indirecte) sont indispensables et BARRY (1979) l'explique par l'impossibilité de la première couche d'anticorps à former le réseau nécessaire à l'aggrégation. Chez *Trypanosoma lewisi*, le capping par anticorps dirigés contre le parasite est inhibé à 4° (CHERIAN et DUSANIC, 1978) alors que celui par anticorps dirigés contre les immunoglobulines d'hôtes présentes à la surface du parasite se déroule également à 0° C (GIANNINI et D'ALESSANDRO, 1978), ce qui conduit les auteurs de ce dernier travail à conclure que le capping des protéines extrinsèques requiert moins d'énergie que celui de molécules plus profondément ancrées.

Chez les amibes *Naegleria fowleri* (FERRANTE et THONG, 1979) et *Entamoeba histolytica* (AUST-KETTIS et SUNDQVIST, 1978), un capping est également obtenu par une double couche d'anticorps, suivi d'une phagocytose de la cape.

Ces exemples montrent que chez les Protozoaires existent des phénomènes membranaires comparables à ceux décrits chez les cellules de vertébrés et qui peuvent également être interprétés comme un moyen pour la cellule d'éliminer un ligand. La polarité du phénomène est ici souvent beaucoup plus marquée car elle préexiste chez l'animal alors que sur les cellules d'organismes supérieurs, l'uropode souvent formé (SCHREINER et UNANUE, 1976) est une conséquence du "capping". Enfin, une relation entre formation de capes et motilité cellulaire apparaît ici alors qu'elle est beaucoup moins nette dans les cellules de vertébrés (NICOLSON, 1976).

3.3.1.4. Capping de polycations

Le fait que la ferritine cationisée autorise la mise en évidence des charges superficielles à pH physiologique a conduit à la faire agir sur des cellules vivantes et la redistribution induite par le ligand a ainsi été rapidement mise en évidence, chez des cellules BHK en culture (GRINNEL *et al.*, 1975), puis chez d'autres types cellulaires, *in vitro* (neurones : WESSELS *et al.*, 1976, hepatome : MOLLER et CHANG, 1978, ascite d'Erlich : SUBJECK et WEISS, 1975, macrophages : SKUTELSKY et HARDY, 1976) et *in vivo* (épithélium de vaisseaux, SKUTELSKI et DANON, 1976). Dans la plupart des cas étudiés, un caractère assez régulier de l'interaction avec la ferritine cationisée est l'indépendance du phénomène à l'égard des inhibiteurs métaboliques et de la température. Ceci est également vrai pour d'autres polycations (LARSEN, 1977) et est interprété comme une précipitation des macromolécules dans la membrane, plus efficace ici qu'avec les lectines ou les anticorps étant donné le plus grand nombre de sites par molécule de ligand (LARSEN, *op. cit.*). Il se pourrait par ailleurs que les polycations interagissent avec des molécules plus superficielles (ce qui se rapprocherait du cas observé par GIANNINI et D'ALESSANDRO chez *Trypanosoma*).

Plus proches de nos résultats, les observations de KING et PRESTON (1977 b) sur l'amibe *Naegleria gruberi* font état de la dépendance du phénomène envers la température, et de sa rapidité, conditions également retrouvées chez les sporozoïtes. Il faut cependant noter que dans les deux cas la redistribution des sites n'affecte pas les propriétés de motilité cellulaire et de pénétration dans une cellule hôte pour *Eimeria* et que donc les

sites reconnus par la ferritine cationisée ne sont ni (les seuls) impliqués dans l'interaction avec le substrat, ni nécessaires à l'invasion de la cellule hôte. Cependant, le phénomène observé témoigne de la capacité pour le sporozoïte de déplacer de manière orientée un ligand le long de sa surface.

Ceci était déjà suggéré par le comportement de *Plasmodium* ou *Toxoplasma* envers les anticorps. Nous montrons ici que cette propriété chez les sporozoïtes d'*Eimeria* présente la même orientation, les mêmes inhibiteurs et une célérité comparable à celle de la mobilité par glissement de la cellule. Ceci nous conduit à suggérer que les deux phénomènes pourraient procéder d'un mécanisme fondamental commun, propriété originale de la surface des zoïtes, qui reste à expliquer.

3.3.2. MOTILITE SUPERFICIELLE

3.3.2.1. Existence

L'interaction de sporozoïtes d' *Eimeria nieschulzi* avec des éléments figurés est un événement spectaculaire, extrêmement éloquent quant au mécanisme de glissement qu'il suggère. Nous ne l'avons pas découvert : WC MARQUARDT (1966) décrit une telle interaction entre des mérozoïtes de la même espèce et des particules du contenu intestinal. D'autres exemples de glissement de particules sur une surface cellulaire sont connus : chez les cellules en culture (ABERCROMBIE *et al*, 1970), sur des flagellés (BLOODGOOD *et al*, 1977, 78, 79). Le second type semble assez répandu (Héliozoaires, Flagellés, Blastule d'oursin) et est comparable à ce que nous observons chez les sporozoïtes bien que le mouvement puisse se faire dans les deux directions le long de l'axe flagellaire : "gliding is a physiological expression of the force transduction artificially visualized by using polystyrene microspheres attached to the flagellar surface" (BLOODGOOD, 1978).

Nous pensons de la même manière que ce que nous avons observé est la traduction du mécanisme de glissement des sporozoïtes, formation d'une jonction transitoire mouvante avec le substrat, ce dernier devenant la partie mobile du couple quand il est plus léger que le zoïte (cas de l'hématie).

Le problème se pose donc d'une part de la nature de l'interaction avec le substrat et d'autre part de la nature et des propriétés du site d'interaction à la surface du parasite.

La première question demande des investigations supplémentaires, en particulier mesure de la distance d'interaction et effet des ions. Chez *Naegleria*, PRESTON et KING (1978) établissent l'existence de forces d'attraction électrostatiques avec le verre. Rien ne permet encore d'en faire état chez les sporozoïtes.

La seconde question est liée à la première, mais elle peut recevoir déjà certains éléments de réponse. Par exemple, l'initiation de l'interaction n'a pas toujours lieu à l'apex du zoïte, mais à n'importe quel point de sa surface. Plus difficile est de savoir si l'interaction est induite par le sporozoïte au point de contact ou si elle est spontanée lors du contact. Le fait que le mouvement des zoïtes soit discontinu indique soit qu'il existe un flux continu dans la pellicule, mais que le zoïte module l'interaction, soit que le zoïte module le déplacement lui-même. Il est encore trop tôt pour y répondre.

Cet ensemble de questions reste un domaine d'investigation ouvert. BLOODGOOD *et al*, 1979 proposent pour le système flagellaire un modèle idéalisé où le récepteur serait une protéine transmembranaire qui pourrait être en relation avec un microtubule par un pont ATPasique. Une intervention des protéines peut être évoquée également ici, renforcée par les modalités du déclenchement de la motilité chez *Sarcocystis* où il semble que l'évènement soit la coupure d'une protéine accessible à l'iodination enzymatique. Chez les sporozoïtes de *Plasmodium*, VANDERBERG a mis en évidence une activation par le sérum, qu'il a attribué à la serumalbumine (1974) mais dont nous demandons si elle n'est pas en fait liée à une protéase sérique, telle la thrombine (qui détache par exemple la fibronectine de fibroblastes en culture, MOSHER et VAHERI, 1978), à moins que l'interaction récemment découverte avec des facteurs spécifiques de l'hôte (VANDERBERG *et al*, 1980) soit à incriminer.

3.3.2.2. Motilité superficielle et pénétration

L'homologie mécanique entre la motilité par glissement et la pénétration dans la cellule hôte est étroite. La description d'une "jonction mouvante" (AIKAWA *et al.*, 1978) lors de la pénétration des erythrocytes par les mérozoïtes de *Plasmodium* renforce cette hypothèse en montrant l'importance de l'interaction entre les membranes de l'hôte et du parasite lors de l'invasion. Si, comme nos observations chez *Sarcocystis* et *Toxoplasma* semblent le suggérer, un phénomène comparable existe chez les autres Coccidiomorphes, il est concevable d'identifier le mécanisme d'entrée dans la cellule à celui du glissement ; les seules différences pourraient éventuellement résider d'une part dans la jonction zoïte substrat ou cellule, d'autre part dans la mise en jeu simultanée de plusieurs sites ou d'un anneau lors de l'invasion alors que pour le glissement un seul site pourrait suffire. Cette hypothèse est ouverte à l'expérimentation.

3.3.2.3. Mécanisme possible

L'orientation antéro postérieure du mouvement des zoïtes est calquée sur celle des microtubules sous pelliculaires et des alignements de particules du complexe membranaire interne. Ceci nous conduit à considérer ces éléments structuraux comme pouvant être responsables au moins de l'orientation de la mobilité en servant de guides, d'axe de référence au mécanisme mis en jeu. BLOODGOOD *et al.*, 1979 attribuent un rôle similaire aux microtubules flagellaires dans leur système.

Bien que n'ayant pas d'éléments expérimentaux pour l'appuyer, nous inclinons à penser que le complexe membranaire interne pourrait intervenir également d'une manière dynamique et être même le moteur du système. La symétrie de cette formation peut en effet amener à en comparer chaque élément (chaque plaque) à un ruban continu fermé, et à imaginer un fractionnement en tapis roulant qui pourrait entraîner les éléments du plasmalemma sus jacent servant à la jonction avec le substrat.

Des modulations de l'état dynamique du ruban, des interactions entre les éléments mobiles du complexe interne et ceux du plasmalemma,

de celles entre le plasmalemme et le substrat pourraient expliquer les caractéristiques de discontinuité, d'initiation aléatoire et aussi de mise en jeu d'un nombre variable de sites de cette motilité superficielle.

Notons qu'il faudrait définir d'une part la source énergétique de ce système (activités ATPasiques par exemple) et d'autre part les molécules impliquées : on pourrait dans le cadre de la "fluidité membranaire" imaginer des protéines glissant de manière orientée dans un ruban lipidique inerte et interagissant avec des protéines du plasmalemme et il serait alors tentant de les identifier avec les particules intramembranaires ; la possibilité d'un tel glissement rapide des PIM dans la bicouche lipidique a été démontrée au moins dans un cas, chez un flagellé termiticole (TAMM, 1979).

Ce modèle hypothétique reste à éprouver par l'expérimentation. Il constituerait un système original de motilité et pourrait représenter le rôle majeur du complexe membranaire interne chez le zoïte.

CHAPITRE 4

FRACTIONNEMENT CELLULAIRE DES ZOITES ET ANALYSE DU CONTENU PROTEIQUE DES ORGANITES APICAUX

Une partie de ce travail a été publiée sous le titre :

"Characteristic proteins of micronemes and dense granules from *Sarcocystis tenella* zoites", DUBREMETZ J. F. & DISSOUS, C., Molecular and Biochemical Parasitology (1980), 1, 279-289.

La référence quasi permanente des auteurs ayant étudié la pénétration des zoïtes ou même simplement leur morphologie à une intervention possible des rhoptries ou des micronèmes dans le phénomène, contraste avec le peu de travaux réalisés jusque là pour tenter de démontrer cette hypothèse.

L'étude d'organites inconnus passe nécessairement par la caractérisation de leur contenu et celle-ci est facilitée par l'isolement des organites considérés. Nous avons voulu aborder ce problème dans le but de pouvoir ensuite étudier le rôle de ces organites.

Comme une telle étude supposait la mise au point de protocoles de fractionnement cellulaire pour lesquels aucun travail préalable n'était disponible chez les Sporozoaires, il était nécessaire de l'aborder par un modèle facile à obtenir pur et en grandes quantités. Comme peu de zoïtes de Sporozoaires présentent ces caractéristiques, le choix fut simple et se dirigea vers *Sarcocystis tenella*, qui présentait l'avantage supplémentaire de contenir en très grande abondance l'un des organites recherchés, en l'occurrence les micronèmes.

Les résultats obtenus sur ce modèle permirent d'aborder ensuite le fractionnement des zoïtes d'*Eimeria* puis de *Toxoplasma*, plus difficiles à obtenir, mais plus riches en potentialités d'information sur les organites apicaux et, pour *Toxoplasma*, en possibilités expérimentales.

Nous décrirons d'abord les protocoles de fractionnement mis au point puis l'analyse du contenu protéique des fractions obtenues.

4.1. FRACTIONNEMENT CELLULAIRE DES ZOÏTES

Les techniques d'obtention et de purification des zoïtes ont été décrites plus haut (Chapitre 1).

4.1.1. BRADYZOÏTES DE *SARCOCYSTIS TENELLA*

4.1.1.1. Homogénéisation

Cette première étape, préalable indispensable au fractionnement consiste en un éclatement cellulaire dans des conditions respectant l'intégrité des organites recherchés. La mise au point de ces conditions a nécessité de nombreux essais, car les procédés habituellement utilisés se sont avérés inapplicables aux zoïtes. En effet, les homogénéiseurs de DOUNCE ou de POTTER ne lysent qu'une quantité infime des cellules dans des conditions normales d'utilisation (une vingtaine d'allers-retour de piston serré au DOUNCE, 50 allers-retour au POTTER à 1 000 rpm). Le seringueage est inefficace, de même que l'homogénéiseur VIRTIS. Les premiers résultats encourageants sont venus de l'utilisation des ultrasons (Générateur MSE) : un traitement très bref (3 secondes) a permis dans certains cas l'obtention d'homogénats très riches en organites intacts. Il s'est cependant avéré impossible de standardiser la méthode, l'efficacité de l'homogénéisation variant considérablement d'un essai à l'autre, bien que les conditions expérimentales soient reproduites aussi fidèlement que possible.

Les résultats les plus satisfaisants ont été obtenus en utilisant la French Press, dont le principe se rapproche de celui du seringueage, sous pression beaucoup plus élevée. Une série d'expériences a permis d'établir l'optimum d'éclatement vers 50 Kg/cm^2 . Il reste alors 1 à 5 % de cellules entières, qui sont éliminées par une centrifugation de 5 mn à $500 g_{\text{max}}$. Le surnageant représente l'homogénat, qui subit ensuite le fractionnement.

4.1.1.2. Séparation des organites

4.1.1.2.1. Sédimentation différentielle

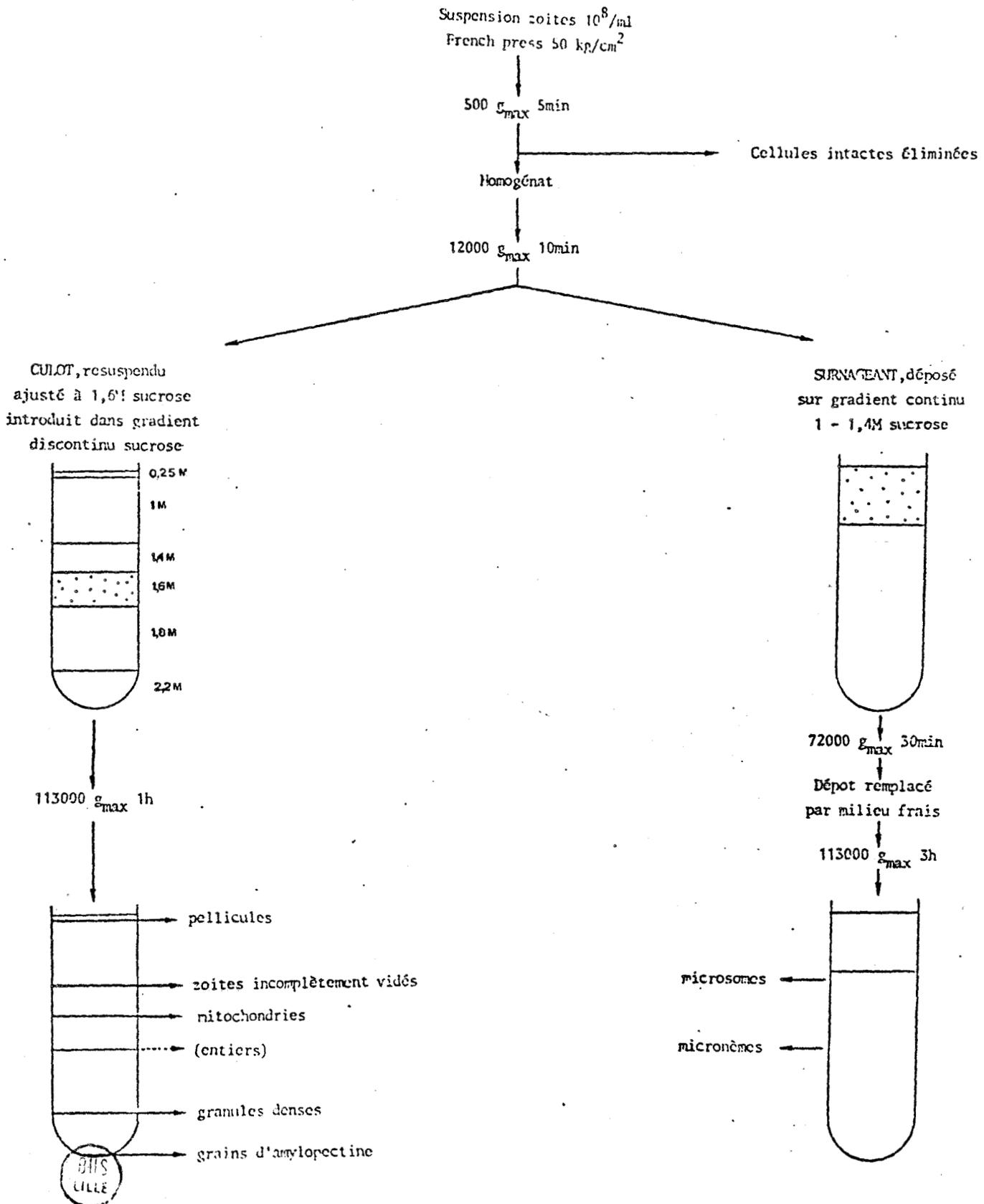
L'homogénat est centrifugé à 12 000 g_{max} pendant 10 mn (rotor SW50). On obtient un culot qui renferme des cellules plus ou moins bien vidées, des granules denses, des mitochondries, des pellicules, des grains d'amylopectine. Le surnageant renferme les micronèmes, des grains d'amylopectine, des microsomes et des ribosomes. Il est à noter qu'en aucun cas les noyaux n'ont pu être préservés.

4.1.1.2.2. Purification des organites

La purification des organites est obtenue par ultracentrifugation en gradients de densité en sucrose (toutes les solutions de sucrose sont préparées dans le milieu d'homogénéisation).

Le culot 120 000 g_{max} x min est transféré dans un homogénéiseur de DOUNCE et resuspendu dans le milieu d'homogénéisation (à raison d'1 ml par 10^9 équivalent cellules) par 5 allers-retour d'un piston lâche. Ce traitement augmente le rendement en pellicules propres car il aide à vider les cellules, mais il a été constaté qu'il ne fallait pas le prolonger car il peut entraîner progressivement l'éclatement des granules denses. La suspension obtenue est ajustée à 1,6 M sucrose au moyen de sucrose 2,2 M et introduite dans un gradient de sucrose discontinu (2,2 M : 4 ml ; 1,8 M : 10 ml ; 1,6 M : 5 ml-dépôt - ; 1,4 M : 5 ml ; 1 M : 10 ml, 0,25 M : 2 ml) qui est alors centrifugé à 4 500 g_{max} pendant 15 mn, puis 113 000 g_{max} pendant 1 heure (rotor SW27). Le matériel présent à chaque interface est recueilli et dilué avec la solution de sucrose identique à celle qui le recouvre. Chaque fraction est alors centrifugée 1 heure à 113 000 g_{max} pour en sédimenter le contenu. Les culots sont alors soit congelés, soit immédiatement préparés pour l'analyse ultrastructurale ou électrophorétique.

Protocole de fractionnement des zoïtes de *Sarcocystis tenella*



Les pellicules purifiées sont obtenues à l'interface 0,25-1 M sucrose, alors que les granules denses se rassemblent à l'interface 1,8 - 2,2 M. Les interfaces 1 - 1,4 M et 1,4 - 1,6 M renferment des cellules mal vidées ; les mitochondries sont à l'interface 1,4 - 1,6 M. Les grains d'amylopectine traversent le sucrose 2,2 M et forment un culot au fond du tube.

Les micronèmes sont purifiés à partir du surnageant 120 000 g_{max} x min. Des portions de 8 ml de ce dernier sont déposées sur des gradients linéaires de sucrose 1 à 1,4 M de volume 30 ml et centrifugés à 72 000 g_{max} pendant 30 minutes. Les 7,5 ml supérieurs sont alors aspirés et remplacés par le même volume de tampon d'homogénéisation. Cette étape élimine les ribosomes qui viendraient interférer avec la purification des micronèmes lors de l'étape suivante. Les gradients sont alors recentrifugés pendant 3 heures à 113 000 g_{max} puis fractionnés. La fraction micronèmes qui s'équilibre vers 1,2 M sucrose est diluée par 1 volume de milieu d'homogénéisation et sédimentée à 72 000 g pendant 45 minutes.

4.1.1.3. Analyse morphologique des fractions subcellulaires purifiées

Comme aucun autre procédé (composition, analyse enzymatique) n'était disponible pour caractériser les fractions subcellulaires des Sporozoaires, l'analyse morphologique ultrastructurale était le seul moyen d'évaluer le protocole de fractionnement au cours de sa mise au point. Elle a donc été utilisée systématiquement.

4.1.1.3.1. Les pellicules

Elles ont été décrites en 3.2. (page 53).

4.1.1.3.2. Les granules denses (Pl. 12, fig. 1, 2)

La fraction obtenue à l'interface 1,8 - 2,2 M sucrose est composée de granules plus ou moins intacts, de diamètre voisin de 0,6 μ m, limités par une membrane. Tandis que les granules intacts conservent une morphologie identique à celle qu'ils ont *in situ*, ceux qui ont été cassés ont un

contenu spongieux, plus clair au centre qu'à la périphérie. Les principaux contaminants de la fraction sont quelques grains d'amylopectine.

4.1.1.3.3. Les micronèmes (Pl. 12, fig. 3, 4)

Ces organites, après purification, sont de petits sacs de 50 x 250 nm environ, limités par une membrane, et au contenu uniformément dense. Ils ne peuvent être distingués des micronèmes décrits *in situ*. La fraction ne renferme pas de contaminants observables.

4.1.2. SPOROZOITES D' EIMERIA NIESCHULZI

Sur la base des techniques développées lors de la mise au point du fractionnement des zoïtes de *Sarcocystis*, nous avons pu aborder celui des sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* qui contiennent une quantité appréciable de rhoptries, en plus des micronèmes également présents (Pl. 1, fig. 4). Le but était d'essayer d'obtenir au moins les rhoptries, non récupérées chez *Sarcocystis*, ou mieux, les deux organites à partir du même zoïte.

4.1.2.1. Homogénéisation

Les conditions d'homogénéisation (10^8 zoïtes/ml, French Press 50 Kg/cm²) retenues pour *Sarcocystis* se sont avérées utilisables pour les sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi*. Les cellules entières sont ensuite éliminées par 5 minutes de centrifugation à 500 g.

4.1.2.2. Séparation des organites

4.1.2.2.1. Sédimentation différentielle

Des expériences préliminaires ont montré que la centrifugation de l'homogénat à 12 000 g_{max} pendant 15 mn amenait la séparation quantitative d'un culot renfermant cellules mal vidées, ghosts, mitochondries,

rhoptries, amylopectine d'un surnageant renfermant micronèmes, ribosomes et "microsomes". Cette stratégie n'a toutefois pas été retenue au départ étant donné l'échec des tentatives de purification quantitative des rhoptries à partir de ce sédiment. Un compromis a été décidé, afin de permettre l'analyse d'une fraction purifiée de rhoptries. Il consiste à faire subir à l'homogénat une centrifugation à $10\ 000\ g_{\max}$ pendant 10 mn. Le surnageant contient alors en plus des éléments précités, une partie des rhoptries.

4.1.2.2.2. Purification des organites

Comme pour *Sarcocystis*, la purification a été obtenue en utilisant des gradients de densité en sucrose préparés dans le milieu d'homogénéisation.

A la différence de *Sarcocystis*, nous n'avons pas défini un protocole unique de fractionnement à partir du même homogénat, mais les expériences successives ont permis de dégager diverses possibilités en fonction des résultats recherchés.

4.1.2.2.2.1. - Fractionnement du sédiment

$100\ 000\ g_{\max}$ \times min

Pellicules : Le culot est repris à 5.10^8 équivalents cellule/ml dans le milieu d'homogénéisation par 5 allers-retour dans un homogénéiseur de DOUNCE (piston lâche), puis ajusté à 1,6 M sucrose. Cet échantillon est introduit dans un gradient discontinu de sucrose, de mêmes caractéristiques que celui utilisé pour purifier les ghosts de *Sarcocystis*, et qui est centrifugé dans les mêmes conditions. Les pellicules sont recueillies à l'interface 0,25 - 1 M. Dans un tel système, on retrouve rhoptries, mitochondries, et des cellules mal vidées à l'interface 1,6 - 1,4 M.

Les tentatives de purification quantitative des rhoptries à partir du sédiment $100\ 000\ g_{\max}$ \times min se sont jusque là soldées par des échecs. Elles ont toutefois permis d'établir des caractéristiques de sédimentation pouvant présenter un intérêt dans l'établissement de protocoles préparatifs, car la majeure partie des rhoptries est rassemblée dans ce culot.

En introduisant une étape supplémentaire préliminaire (2 000 g_{\max} , 10 min) destinée à éliminer le plus possible de cellules incomplètement vidées, nous avons pu étudier le comportement en centrifugation d'une fraction enrichie en rhoptries et mitochondries. Le surnageant 20 000 g_{\max} x min est centrifugé à 10 000 g_{\max} pendant 10 minutes. Le culot est resuspendu dans le milieu d'homogénéisation à $5 \cdot 10^8$ équivalents cellules/ml. Une portion de 0,4 ml est déposée sur un gradient continu de sucrose 1,4 - 1,6 M (12 ml) et centrifugé à 200 000 g_{\max} pendant 2 h 30 (Rotor SW 40). Cette centrifugation permet de séparer une fraction enrichie en mitochondries à environ 1,45 M sucrose et une fraction enrichie en rhoptries à environ 1,52 M ; la proximité des densités ne permet toutefois pas une séparation quantitative des deux types d'organites.

Si l'on dépose une portion de 2 ml de la même suspension sur un gradient continu de sucrose 1 - 1,4 M (30 ml) qui est ensuite centrifugé à 65 000 g_{\max} pendant 30 minutes (Rotor SW27), la différence de vitesse entre les deux organites permet également de les séparer partiellement. Une fraction enrichie en mitochondries est retrouvée en bas du gradient (Pl. 15, fig. 2) tandis qu'une bande enrichie en rhoptries est retrouvée vers la mi-parcours dans les conditions expérimentales décrites (Pl. 15, fig. 1).

Dans les deux cas, une élimination quantitative des cellules mal vidées n'a pas pu être réalisée et les fractions sont donc affectées par ce contaminant.

4.1.2.2.2. Purification des rhoptries et des micronèmes à partir du surnageant 100 000 g_{\max} x min

Le surnageant est déposé sur un gradient continu de sucrose 1 - 1,6 M (15 ml de suspension sur 20 ml de gradient) qui est centrifugé à 65 000 g_{\max} pendant 30 minutes (rotor SW27).

On obtient deux pics d'absorbance, l'un à l'interface 0,25 - 1 M, l'autre vers 1,3 M. Ce dernier est repris par 3 volumes de sucrose 1 M et sédimenté à 240 000 g_{\max} pendant 15 minutes (SW50). Le culot obtenu est formé de rhoptries très purifiées.

L'interface 0,25-1 M est recueillie et déposée sur un gradient 1-1,3 M sucrose (1 ml de dépôt sur 14 ml de gradient) et centrifugée 3 h à 200 000 g_{\max} (Rotor SW 40). On obtient ainsi une séparation entre les microsomes, plus légers, et les micronèmes, ces derniers s'équilibrant

vers 1,1 M sucrose. Les fractions correspondantes sont reprises dans le milieu d'homogénéisation et centrifugées à 240 000 g_{\max} pendant 20 minutes (Rotor SW50).

4.1.2.3. Analyse morphologique des fractions purifiées

4.1.2.3.1. Les pellicules (Pl. 13, fig. 1)

La fraction est constituée en majorité de grands fragments de pellicule ayant conservé la structure trimembranaire. Les microtubules sous pelliculaires peuvent persister *in situ*, ou libres dans le "ghost". Le conoïde est également maintenu en place avec les anneaux apicaux, la vésicule apicale et l'anneau d'insertion des microtubules sous pelliculaires. Certaines enveloppes emprisonnent encore des rhoptries ou des mitochondries ou des profils membranaires de taille variable.

4.1.2.3.2. Les rhoptries (Pl. 13, fig. 2)

L'aspect des rhoptries isolées ne diffère pas de celui observé *in situ*. Ce sont des organites allongés, limités par une membrane et au contenu uniformément dense et de section circulaire, s'effilant à une extrémité et arrondis à l'autre. La fraction est contaminée par quelques petites mitochondries et une faible quantité de petites vésicules. Quelques rhoptries présentent une zone transparente aux électrons, qui semble être une malformation liée au fractionnement, car elle n'est jamais observée *in situ*.

4.1.2.3.3. Micronèmes (Pl. 13, fig. 3, 4)

La fraction obtenue renferme des micronèmes et une quantité non négligeable de vésicules microsomaies, étant donnée la faible différence de densité en sucrose entre les deux types d'organites. Les micronèmes sont de petits sacs de 200 x 60 nm, limités par une membrane et au contenu uniformément dense aux électrons. Ils sont identiques à ceux observés *in situ*.

4.1.3. MEROZOITES D' EIMERIA

4.1.3.1. Mérozoïtes d'*Eimeria nieschulzi*

Le faible rendement en micronèmes obtenu avec les sporozoïtes (qui contiennent cet organite en petite quantité) nous a conduit à essayer de les isoler à partir d'un autre stade du cycle, dans le double but d'en obtenir plus facilement et de vérifier qu'ils sont équivalents à ceux du sporozoïte. Les mérozoïtes III (selon ROUDABUSH, 1937) qui sont mûrs vers 4 1/2-5 jours après infestation, qui sont les plus grands du cycle et qui contiennent le plus de micronèmes ont été choisis pour cette étude. Leur isolement a été décrit au chapitre I. Notons que la purification n'est pas totale et que la préparation contient encore des éléments issus des cellules intestinales (bordures en brosse "par exemple").

Nous avons limité notre étude à une centrifugation différentielle d'un homogénat de mérozoïtes (10^8 cellules par ml, cassées à la French press à 50 kg/cm^2). Quatre centrifugations successives ont été réalisées, le surnageant étant chaque fois repris et centrifugé à la vitesse supérieure tandis que le culot était fixé ou congelé. Les étapes successives ont été (en rotor SW50) :

- | | | |
|-------------------------------------|---|-------------|
| - 2 000 g_{max} , 10 min | → | culot P 1 ; |
| - 12 000 g_{max} , 10 min | → | culot P 2 ; |
| - 24 000 g_{max} , 15 min | → | culot P 3 ; |
| - 240 000 g_{max} , 15 min | → | culot P 4. |

L'analyse morphologique des culots successifs a donné les résultats suivants (Pl. 14) : P 1 renferme essentiellement des mérozoïtes incomplètement vidés dans lesquels on retrouve fréquemment les 2 rhoptries très allongées ainsi que des micronèmes et des mitochondries. P 2 est composé de mitochondries et de pellicules (dont certaines emprisonnent encore quelques organites). On y observe également des granules denses de $0,5 \mu\text{m}$ ainsi que des rhoptries et quelques micronèmes. P 3 renferme encore quelques mitochondries, rhoptries, grains denses et débris de pellicules, mais est surtout caractérisé par la présence de micronèmes et de profils vésiculaires (microsomes). P 4 enfin est un culot très enrichi en micronèmes et qui contient aussi des microsomes comparables aux précédents. Les micronèmes contenus dans P 3 semblent plus denses aux électrons et légèrement plus volumineux que ceux de P 4 qui sont identiques à ceux des sporozoïtes.

4.1.3.2. Mérozoïtes d' *Eimeria necatrix*

Jusqu'à présent, une seule expérience de fractionnement a pu être tentée avec des mérozoïtes II d' *Eimeria necatrix* dans le but d'essayer de comparer le contenu des micronèmes à l'échelon interspécifique.

Après passage à la French Press à 50 kg/cm^2 , l'homogénéat a été centrifugé 10 minutes à $20\,000 \text{ g}_{\text{max}}$ en rotor SW40. Le surnageant a été ensuite soumis à $110\,000 \text{ g}_{\text{max}}$ pendant 1 h dans le même rotor. Ce second culot a été inclus. Il s'agit d'une fraction enrichie en micronèmes, contenant en outre des profils vésiculaires de taille et de contenu variable (Pl. 15, fig. 3, 4). Les micronèmes sont ici un peu plus ramassés que ceux observés *in situ*.

4.1.4. TACHYZOITES DE TOXOPLASMA

Le Toxoplasme, de par la facilité avec laquelle il croît *in vitro*, représente un modèle de choix pour l'étude de la genèse et du devenir des organites du zoïte. La purification quantitative est toutefois beaucoup plus difficile à réaliser que celle des zoïtes de *Sarcocystis* et d' *Eimeria* et n'avait d'ailleurs pas été obtenue jusqu'à une époque très récente (TRYON *et al*, 1978, GRIMWOOD *et al*, 1980). Nous avons cependant voulu aborder le fractionnement de cette espèce sur des suspensions imparfaitement purifiées afin de commencer à définir d'une part les possibilités d'obtention des organites, et d'autre part, le cas échéant, leurs paramètres de sédimentation.

Les premières approches expérimentales ont donné les résultats suivants : la préparation de zoïtes homogénéisée à la French Press à 50 Kg/cm^2 a été découpée par trois centrifugations successives en rotor SW50 :

- $2\,000 \text{ g}_{\text{max}}$, 10 min \longrightarrow culot P 1
- $18\,000 \text{ g}_{\text{max}}$, 10 min \longrightarrow culot P 2
- $240\,000 \text{ g}_{\text{max}}$, 30 min \longrightarrow culot P 3

P 1 renferme des zoïtes intacts ou mal vidés (Pl. 16, fig. 1). P 2 contient des rhoptries (reconnaissables chez *Toxoplasma* à leur contenu hétérogène), des granules denses de diamètre $0,5 \mu\text{m}$, des mitochondries et des pellicules emprisonnant souvent des organites et des vésicules (Pl. 16, fig. 2).

Le culot comporte également un fond fibrillaire probablement attribuable à la chromatine des noyaux des zoïtes ou des cellules péritonéales. P 3 renferme également des rhoptries et des granules denses, ainsi que des micronèmes identiques à ceux qui peuvent être observés *in situ*. Des microsomes et des ribosomes sont également présents (Pl. 16, fig. 3).

4.2. ANALYSE DU CONTENU PROTÉIQUE DES FRACTIONS PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE SDS

L'analyse ultrastructurale des fractions obtenues ayant révélé une très grande purification d'au moins certains des organites recherchés, nous avons pu aborder l'analyse de leur contenu protéique par électrophorèse.

4.2.1. ZOÏTES DE SARCOCYSTIS

4.2.1.1. Les micronèmes (Pl. 17, A)

La fraction soumise à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS en milieu dissociant montre 2 protéines majeures de 20 000 et 22 000 daltons respectivement. Le composant de bas poids moléculaire disparaît quasi totalement par sonication pendant 1 mn (tant dans la fraction que dans les zoïtes entiers). La fraction micronèmes renferme également de façon reproductible plusieurs bandes mineures de 30 000, 32 000, 96 000 et plus de 100 000 daltons .

4.2.1.2. Les granules denses (Pl. 17, C)

Une protéine majeure de 42 000 daltons est détectée par électrophorèse de la fraction granules denses. Un autre composant, de poids

moléculaire légèrement plus faible est également présent, souvent masqué sur les électrophorégrammes par la large bande de l'élément majeur. Des composants mineurs sont également détectés à 32 000, 33 000, 34 000, 40 000 et 78 000 daltons.

(4.2.1.3. Les pellicules, voir 312)

Il faut noter que les protéines majeures des micronèmes et des granules denses sont également des composants majeurs des zoïtes de *Sarcocystis* entiers (Pl. 17, B).

4.2.2. ZOITES D'EIMERIA NIESCHULZI

4.2.2.1. Micronèmes (Pl. 17, D, J, L, M).

Les fractions les plus enrichies en cet organite issues des sporozoïtes montrent deux protéines majeures de 220 et 94 KD respectivement. Deux autres bandes, beaucoup plus discrètes sont également détectées à 23 KD et 15 KD. Sur les gels très chargés, des bandes mineures nombreuses apparaissent dans l'intervalle 15-90 KD.

Les culots enrichis en micronèmes et obtenus à partir de mérozoïtes III renferment également deux protéines majeures de comportement électrophorétique identique à celle des sporozoïtes pour la 94 KD, et légèrement plus mobile pour la protéine de haut poids moléculaire (215 KD environ). Des polypeptides mineurs sont également représentés, dont l'importance par rapport aux majeurs est plus faible dans la fraction 4 (proportionnellement plus riche en micronèmes).

Les 2 protéines majeures des fractions sont également des composants majeurs des mérozoïtes entiers (Pl. 17, K). Elles apparaissent de manière beaucoup plus discrète sur les électrophorégrammes de sporozoïtes (Pl. 17, I).

4.2.2.2. Rhoptries (Pl. 17, G)

Les préparations les plus enrichies en rhoptries présentent 3 bandes majeures à 200, 150 et 63 KD. Une quatrième apparaît à 42 KD, beaucoup plus marquée sur les fractions moins pures du type rhoptries + mitochondries préparées à partir du culot 120 000 g_{\max} x min. Ces polypeptides sont difficilement détectés sur les profils de sporozoïtes entiers et n'apparaissent pas sur les profils (peu chargés) de mérozoïtes que nous avons réalisés.

4.3. DISCUSSION

4.3.1. FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

Il existe encore peu de rapports relatifs au fractionnement cellulaire de Sporozoaires, et la plupart concernent^{nt} soit la pellicule (Grégari-nes : PHILIPPE *et al.*, 1979, *Plasmodium* : SHERMAN et JONES, 1979, *Toxoplasma* : TRYON, 1979), soit les grains d'amylopectine (WANG *et al.*, 1975) soit enfin des organites cytoplasmiques classiques tels que mitochondries (KILEJIAN, 1975 a) ou ribosomes (*Plasmodium* : COOK *et al.*, 1971, *Eimeria* : WANG, 1978).

Seule A. KILEJIAN (1974) a purifié un constituant spécifique des trophozoïtes de *Plasmodium lophurae* : des granules denses contenant un polypeptide riche en histidine.

Nos résultats constituent donc le premier rapport sur l'isolement et la caractérisation électrophorétique d'organites spécifiques de zoïtes de Sporozoaires. Leur intérêt premier est de donner une identité distincte (morphologie, comportement en sédimentation et contenu protéique) à des organites qui n'étaient jusque là connus que par l'observation ultra-structurale de cellules fixées.

En effet, sur les coupes de zoïtes, les organites apicaux apparaissent tous comme des corpuscules au contenu dense aux électrons, ce qui a toujours entretenu une certaine confusion quant à l'identité véritable et à

l'individualité morphologique des différents types décrits chez les divers zoïtes étudiés.

Bien que notre travail ne suffise pas à répondre à toutes les questions en suspens, nous montrons par exemple que les micronèmes existent réellement chez le Toxoplasme, ce qui était partiellement mis en doute par VIVIER et PETITPREZ (1972) mais nous ne pouvons encore décider s'il s'agit ou non de précurseurs des rhoptries, hypothèse proposée par les mêmes auteurs. Nous confirmons également la dualité entre rhoptries et granules denses chez la même espèce, ce que VIVIER et PETITPREZ avaient montré par coupes sériées. Chez *Sarcocystis*, l'isolement de micronèmes sous la forme de courtes navettes permet d'éliminer définitivement l'appellation de tubules contournés qui leur avait été attribuée à l'origine (SENAUD, 1967, qui les interprétait comme des coupes de tubules denses ondulant dans le cytoplasme) ; il rend d'autre part peu plausible l'hypothèse de l'existence d'un système de canalicules joignant entre eux les divers organites (HELLER et SCHOLTYSECK, 1971 ; VARGHESE, 1977). Par ailleurs, l'isolement des granules denses de *Sarcocystis* sous la forme de granules sphériques les distingue sans équivoque des rhoptries avec lesquelles ils ont parfois été confondus (MEHLHORN *et al.*, 1975).

Chez *Sarcocystis*, nous avons donc pu obtenir et purifier les micronèmes et les granules denses. Les rhoptries n'ont pas été obtenues, soit à cause de leur très petit nombre (les étalements montrent qu'il n'y en a que 2 par zoïte, PORCHET, 1975), soit parce qu'elles sont ancrées dans la région du conoïde et persistent dans les ghosts mal vidés, soit à cause de la fragilité mécanique de leur très long pédoncule qui pourrait être responsable de la fuite de leur contenu. La première hypothèse (faible nombre) reçoit notre préférence, étant donné l'obtention de cet organite chez les sporozoïtes d'*Eimeria* où il est beaucoup plus abondant.

Chez *Eimeria nieschulzi*, nous avons séparé les rhoptries et les micronèmes des sporozoïtes et les micronèmes de mérozoïtes. L'existence de granules denses chez ces organismes ne peut être exclue : ils apparaissent, en faible nombre sur les coupes (COLLEY, 1967-1968, et observations personnelles). Ils sont sans doute trop peu abondants pour être retrouvés, ou sont endommagés lors de l'homogénéisation, s'ils partagent avec ceux de *Sarcocystis* la sensibilité aux forces de cisaillement.

Chez *Toxoplasma*, rhoptries, granules denses et micronèmes coexistent et sont retrouvés dans les homogénats. On peut donc espérer séparer les trois organites à partir du même zoïte, ce qui n'a pu être réalisé avec *Eimeria* ou *Sarcocystis*.

4.3.2. CARACTERISTIQUES DES ORGANITES

4.3.2.1. Micronèmes

Le caractère le plus remarquable des micronèmes de *Sarcocystis* et d'*Eimeria* est le très petit nombre d'espèces protéiques majeures qu'ils renferment.

Chez *Eimeria* l'incomplète pureté des fractions de micronèmes obtenues ne permet pas encore d'affirmer que les deux protéines majeures sont le contenu des micronèmes. Les fractions contiennent en effet des vésicules dont on ne peut encore exclure qu'elles contiennent dans leur membrane ou leur lumière l'une des protéines majeures. Ceci est toutefois peu probable, surtout si l'on considère les mérozoïtes chez lesquels l'abondance de micronèmes en coupe coïncide avec l'importance majeure des deux bandes protéiques dans les profils électrophorétiques de zoïtes entiers. Si les deux bandes représentent le contenu des micronèmes, il est possible qu'elles correspondent respectivement aux deux zones parfois observées au sein de ces organites (centre dense et périphérie plus claire) mais ceci reste à établir.

Bien que nous n'ayons jusque là que deux genres de zoïtes à comparer, la différence observée entre les contenus des micronèmes est importante quant à la masse moléculaire des protéines qu'ils renferment.

Il conviendra de découvrir si elle traduit une différence de fonction ou plutôt si l'on peut définir une séquence ou un site actif commun aux polypeptides caractérisés.

Chez *Sarcocystis tenella* enfin, la relation possible entre l'extrait protéique toxique pour le lapin (Sarcocystine, SENAUD *et al*, 1968) et les micronèmes ou tout autre organite reste à étudier.

4.3.2.2. Rhoptries

Seules les rhoptries d'*Eimeria* ont pu être purifiées et analysées. Elles semblent contenir plus d'espèces protéiques que les micronèmes et granules denses puisque trois polypeptides majeurs ont été détectés et que les gels réalisés jusque là étaient insuffisamment chargés pour détecter des molécules moins abondantes.

La morphologie des rhoptries d'*Eimeria* ou de *Toxoplasma* après homogénéisation cellulaire est comparable à celle décrite *in situ*, excepté, très rarement, la formation d'une vacuole. Nous n'avons jamais observé dans les homogénats de figures myéliniques telles que celles trouvées dans ou hors des zoïtes lors des pénétrations (Ch. 2) ou lors de l'éclatement de mérozoïtes de *Plasmodium* (BANNISTER, 1977 b). Nous ne pouvons donc pas encore apporter d'information sur le lien possible entre les deux types de formations.

4.3.2.3. Les granules denses

Ceux-ci n'ont été purifiés que chez *Sarcocystis* et là encore la caractéristique marquante est le faible nombre d'espèces protéiques majeures (1 ici). Par leur comportement de sédimentation et leur morphologie ultrastructurale ces organites présentent quelques ressemblances avec les granules denses des trophozoïtes de *Plasmodium lophurae* (KILEJIAN, 1974). Ces derniers renferment 1 seul peptide de 37,5 KD, très riche en histidine. L'analyse du composant majeur des granules denses de *Sarcocystis* est nécessaire avant de pouvoir pousser plus loin la comparaison. Par ailleurs, le rôle de ces organites reste inconnu : l'observation unique de l'exocytose d'un granule dense par un zoïte de *Sarcocystis* intracellulaire (DUBREMETZ et PORCHET, 1975) ne suffisant pas à établir qu'il s'agit d'une sécrétion.

4.3.2.4. Ghosts

La préservation de la structure trimembranaire au cours du fractionnement a également été rapportée chez les Grégarines (PHILIPPE *et al.*, 1979) et montre la cohésion entre le plasmalemme et le complexe interne.

Une différence importante a été trouvée entre les densités des "ghosts" : les pellicules de *Sarcocystis* et *Eimeria* sont beaucoup moins denses en sucrose que celles de *Gregarina blaberae* (moins de $1,13 \text{ g/cm}^3$ contre plus de $1,2 \text{ g/cm}^3$) Ceci pourrait être dû au "cell coat" beaucoup plus important chez ces dernières.

4.3.3. PERSPECTIVES

La mise au point d'un protocole de fractionnement cellulaire est une étape méthodologique qui en soi n'apporte pas d'information sur le rôle des organites qu'elle permet d'isoler. Mais c'est une étape capitale vers l'élucidation de ce rôle, car elle permet d'analyser individuellement chacun des organites.

Comme il n'existait pas de préalable, l'observation ultrastructurale a été au départ le seul moyen de caractérisation des fractions obtenues et sur elle a reposé la mise au point des protocoles. Puis, la purification étant réalisée, l'électrophorèse des protéines a révélé l'existence de polypeptides majeurs, caractéristiques des fractions obtenues. Bien que ce type de caractérisation soit moins commode que les enzymes marqueurs utilisés pour les organites classiques, et à défaut d'avoir encore défini de tels enzymes pour les organites qui nous intéressent, il permet un contrôle aisé lors de la reproduction des expériences.

Les résultats déjà obtenus permettent d'envisager d'une part l'analyse des organites : propriétés des composants protéiques majeurs (éventuellement enzymatiques, composition), composants protéiques mineurs éventuels, autres molécules présentes (sucres, lipides, ...) et d'autre part l'étude de leur destinée au cours de la vie du zoïte (génèse et intervention dans la physiologie). Le chapitre suivant illustrera un aspect de ces possibilités.

Si l'analyse des organites peut être réalisée avec n'importe quel zoïte pourvu que l'on dispose d'une quantité suffisante de matériel, l'étude dynamique par contre est grandement facilitée quand les organismes peuvent se développer *in vitro*. Le marquage radioactif par exemple exige ce type d'approche et nous l'illustrerons dans le prochain chapitre.

Ces restrictions expliquent la progression suivie dans notre démarche : des cystozoïtes de *Sarcocystis tenella*, matériel abondant mais ne pouvant être multiplié en culture, vers les zoïtes d'*Eimeria*, capables d'un certain développement *in vitro*, puis vers *Toxoplasma*, qui peut être entièrement maintenu sur cultures de cellules et est donc beaucoup plus favorable à l'étude de la dynamique des organites.

C'est ce qui nous a conduit à entreprendre, simultanément à l'étude d'un fractionnement cellulaire de ce dernier organisme, l'analyse des possibilités expérimentales qu'il offrait, et nous la rapportons dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 5

ESSAI DE MISE EN EVIDENCE D'UNE EXOCYTOSE
ASSOCIEE A LA PENETRATION DES ZOITES DE
TOXOPLASMA DANS LA CELLULE HOTE IN VITRO.

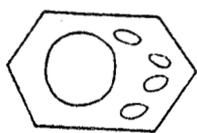
Comme nous l'avons évoqué au chapitre 2, les résultats les plus convaincants quant à l'existence d'une exocytose liée à la pénétration des zoïtes dans la cellule hôte ont été obtenus chez *Toxoplasma* par LUND, LYCKE et NORRBY (1965 à 1975).

Leur démonstration de l'accroissement de pénétration par un facteur protéique repose sur un test biologique difficile à mettre en oeuvre, ne démontre pas directement la libération du dit facteur lors de l'invasion de la cellule hôte, ne permet pas de savoir s'il est seul à intervenir et n'est pas allée jusqu'à le localiser précisément dans un organe particulier.

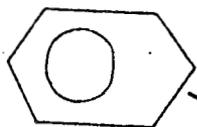
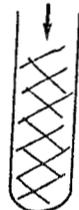
Nous avons voulu essayer d'obtenir par une autre voie une réponse à ces questions, dans le cadre de la mise au point d'un système d'étude *in vitro* de la dynamique des organites de la région antérieure chez *Toxoplasma*.

Nous avons en effet, simultanément à l'étude d'un protocole de fractionnement cellulaire de *Toxoplasma*, abordé l'analyse des possibilités de marquage radioactif des zoïtes *in vitro*, dans le but de pouvoir suivre la dynamique des constituants des organites quand ceux-ci auront été identifiés.

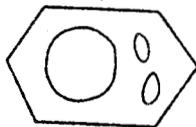
Ayant pu obtenir et purifier des Toxoplasmes marqués (Leucine tritiée), nous avons voulu savoir si un composant radioactif était libéré lors de l'interaction avec un tapis cellulaire *in vitro* et nous rapportons ici les résultats obtenus.



homogénéisation



invasion



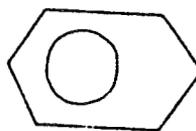
S1

hémolysine

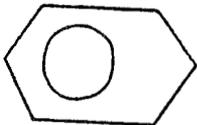


P

S2



incubation
séparée



S1t

hémolysine



Pt

S2t



5.1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL (schématisé ci-contre)

Les Toxoplasmes radioactifs purifiés (voir 1242 et 1272) sont divisés en deux lots égaux ($5 \cdot 10^7$ zoïtes en moyenne), suspendus dans 5 ml de PBS à 4° C. Une boîte de 25 cm² de cellules Hela confluentes préalablement incubée 5 minutes en PBS à 37°, puis refroidie à 4° C reçoit après décantation de son contenu l'un des lots. Les zoïtes sont mis à sédimenter sur le tapis pendant 20 minutes à 4° C. La boîte est ensuite transférée avec un minimum de perturbations sur la platine d'un microscope inversé placé dans une enceinte thermostatée à 37° C, où elle séjourne 30 minutes pendant lesquelles les cellules sont envahies par les zoïtes. Le milieu est ensuite décanté et la boîte lavée 5 fois par 2 ml de PBS à 4° C, de manière à éliminer quantitativement les zoïtes non pénétrés (élimination contrôlée au microscope), c'est-à-dire de 2/3 à 4/5 de la quantité initiale. Le tapis cellulaire est ensuite décollé par grattage dans 5 ml de PBS à 4° C et la suspension obtenue soumise à 5 allers et retours de piston serré dans un broyeur de DOUNCE. Une partie des cellules est ainsi lysée et des zoïtes libérés. La suspension est centrifugée à 900 g_{max} 10 min., de manière à séparer zoïtes et gros débris du lysat cellulaire (S 1), qui est décanté et conservé. Le culot est resuspendu dans 1 ml d'une solution d'hémolysine (don de A. D. LARSON, Louisiana State University) à 1 p 100 dans le PBS et incubé 1 minute à 37° puis la suspension est diluée par 9 ml de PBS à 4° C et centrifugée à 900 g_{max} 10 min pour séparer un second surnageant (S 2) et un culot (P) renfermant les zoïtes et les noyaux.

Le second lot de Toxoplasmes radioactifs est incubé dans les mêmes conditions que le premier dans une boîte de culture dépourvue de cellules ; une fraction équivalente à la quantité de zoïtes pénétrés est ensuite prélevée, ajoutée à froid à la suspension issue du grattage d'une boîte de cellules non infestées et ce mélange témoin subit le même traitement (Dounce puis hémolysine) que le précédent et est donc séparé en culot et surnageants 9 000g_{max} x min. (Pt , S1t , S2t)

La radioactivité des fractions obtenues est ensuite mesurée et les protéines analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide et fluorographie (voir 126 et 127 32).

5.2. RESULTATS

5.2.1. INCORPORATION DE LEUCINE TRITIEE DANS LES PROTEINES DU TOXOPLASME

5.2.1.1. Aspect quantitatif

Selon les expériences, l'incorporation a varié de 2 000 à 75 000 cpm par 10^6 zoïtes, mais était le plus souvent de 40 000 cpm/ 10^6 zoïtes. Les conditions de marquage (durée, chasse éventuelle) ont varié selon les expériences, au cours de la mise au point des protocoles, ce qui peut expliquer les variations obtenues. Dans l'expérience présentée ici, l'incorporation a été de 35 000 cpm/ 10^6 zoïtes.

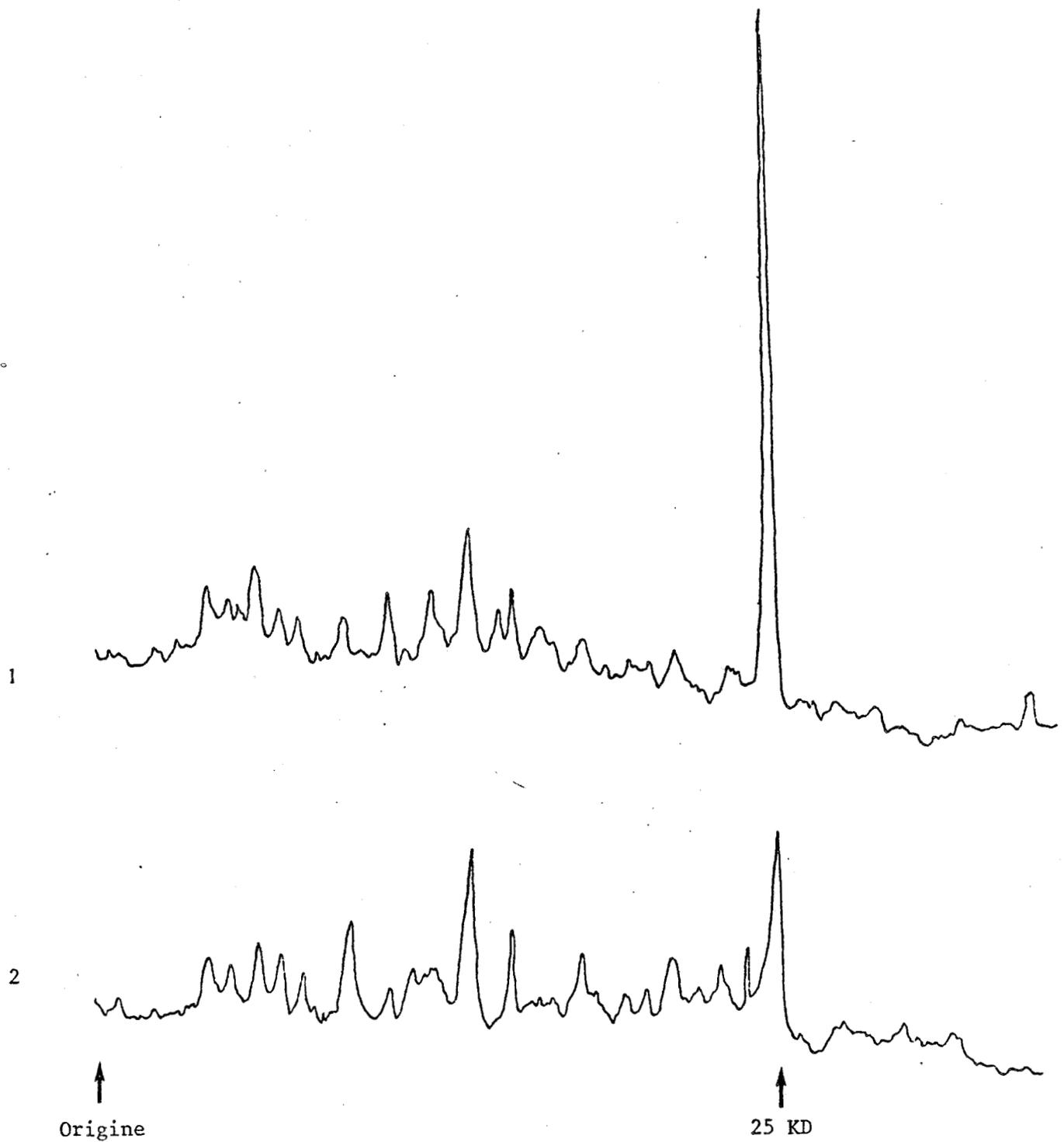
5.2.1.2. Aspect qualitatif

La fluorographie d'électrophorégrammes de Toxoplasmes marqués purifiés produit un profil comparable au résultat obtenu par coloration au Bleu de Coomassie d'une électrophorèse de zoïtes froids (Pl. 18, ABC). On note un groupe de 3 bandes majeures (63, 57, 50 KD), et d'autres bandes caractéristiques (100, 85, 77, 75, 43, 32, 25^{KD}). Les variations dans les protocoles de marquage entraînent des variations légères dans les profils, mais les bandes précitées sont toujours très nettement reconnaissables.

5.2.2. INTERACTION AVEC LES CELLULES

Les surnageants d'interaction zoïtes-cellules et témoins renferment respectivement 8 et 12 % de la radioactivité totale (culot + surnageants).

Lorsque l'on analyse la distribution de cette radioactivité parmi les protéines, on constate qu'elle n'est pas la même dans les



1.

Enregistrements densitométriques correspondant aux pistes F (1) et I (2) , planche 18.

Le pic 25 KD est nettement plus important dans le profil 1 et pourrait donc correspondre à une exocytose liée à l'interaction avec la cellule hôte.

deux séries : la différence majeure réside dans une bande de 25 KD beaucoup plus enrichie dans les surnageants d'interaction que dans le témoin. Un appauvrissement relatif concomitant de la même bande est observé dans le culot d'interaction par rapport au témoin ou aux zoïtes fraîchement purifiés.

5.3. DISCUSSION

5.3.1. MARQUAGE RADIOACTIF DES TOXOPLASMES

Il existe peu de rapports de l'utilisation de traceurs radioactifs pour marquer les Toxoplasmes (NORBY : 1971, glycine, HANDMAN *et al*, 1980, méthionine). L'absence de techniques de purification quantitative des zoïtes est sans doute la raison majeure de cette lacune. Les résultats que nous avons obtenus en réalisant l'incubation avec un précurseur *in vitro* et en purifiant les zoïtes par la technique de GRIMWOOD *et al* (1979) montrent que cet obstacle est à présent levé et qu'un très large champ est dès lors ouvert aux investigations. Il est en effet possible à présent d'étudier d'une part la cinétique d'incorporation de précurseurs dans les zoïtes *in vitro* et d'autre part de suivre le devenir des composants des zoïtes marqués introduits dans une cellule hôte "froide". L'accès est donc ouvert à l'étude du cycle cellulaire du parasite (ce qui nécessitera par ailleurs une synchronisation du cycle) et des rapports métaboliques que ce dernier entretient avec la cellule hôte.

Notre but premier étant d'obtenir des zoïtes marqués, nous avons utilisé des temps d'incorporation très longs, sans chasse, en marquant d'abord les cellules hôtes, puis la culture car nous ne connaissions pas le cheminement des précurseurs dans le couple hôte-parasite : nous ne savions pas en particulier si l'incorporation de précurseurs dans les protéines des zoïtes supposait son transit préalable par les protéines de la cellule hôte. Les résultats récents de PFEFFERKORN et SCHWARTZMAN (1980) montrent qu'il n'en est rien et que le Toxoplasme utilise probablement directement les acides aminés, ce qui devrait permettre de réduire les temps de marquage et d'introduire des chasses autorisant l'étude d'une part d'une éventuelle modification post traductionnelle des protéines des zoïtes et d'autre part de leur transit possible du lieu de synthèse à la localisation définitive.

5.3.2. EXOCYTOSE ?

La mise en évidence de la libération préférentielle d'une protéine de 25 KD lors de la lyse de cellules infestées depuis moins de 30 minutes n'est pas une démonstration définitive de l'exocytose de cette protéine lors de la pénétration. Il est cependant tentant de l'assimiler à la substance dense présente dans la vacuole parasitophore (Pl. 6, fig. 1 ; Pl. 7, fig. 4), et d'en rapprocher les vacuoles "vides" observées dans les zoïtes récemment pénétrés (Pl. 5, fig. 3 ; Pl. 6, fig. 1).

Par ailleurs, nos données ne reposent que sur l'observation d'autoradiographies et de densitogrammes et demanderaient à être quantifiées par la comparaison du rapport entre la radioactivité de la bande 25 KD et celle du reste de la piste chez le surnageant et le témoin, ce qui n'a pas encore été réalisé.

Enfin, nous n'avons analysé ici que les protéines. Si d'autres substances (lipides par exemple) sont relarguées lors de la pénétration, d'autres méthodes seront nécessaires à leur mise en évidence.

On peut aussi se demander, dans le cas d'une exocytose, si le produit émis doit se retrouver dans le milieu ou dans la vacuole parasitophore (ou dans les deux).

En fait, l'analyse des surnageants d'interaction zoïtes cellules (non présentée ici) évoque également un enrichissement en protéine 25 KD, mais il est beaucoup moins net que celui trouvé dans les cellules.

En fonction de ce qui est connu du déroulement de la pénétration, il semble que la vacuole parasitophore en formation représente un volume clos par l'apposition étroite entre plasmalemme de la cellule et du zoïte au niveau du site d'entrée (évidente chez *Plasmodium*, mais également suggérée par l'observation des Coccidies sur le vivant). Ceci nous incite à considérer que, si une exocytose intervient pendant la pénétration, il est plus plausible d'aller chercher le produit dans la cellule qu'au dehors, ce qui explique notre démarche : la lyse mécanique de la cellule infestée conduisant probablement à une lyse au moins partielle des vacuoles parasitophores et à la libération de leur contenu et de leurs membranes dans le surnageant $9\ 000\ g_{\max} \times \min.$

L'approche méthodologique étant différente, il n'est pas encore possible de comparer nos résultats à ceux de LYCKE *et al* ; rien ne permet en effet d'assimiler la protéine 25 KD au "Penetration enhancing factor", mais rien ne permet non plus de les distinguer.

Les deux produits, s'ils sont distincts, pourraient d'ailleurs coexister, car il n'est pas exclu que le PEF, s'il agit à doses très faibles comme le suggèrent les travaux de LYCKE *et al*, ne soit pas facilement détectable par le protocole que nous avons utilisé.

Il est donc indispensable de pousser plus avant l'étude comparative des deux protéines décrites. Par ailleurs, la nécessité de les localiser dans la cellule et donc de disposer d'une méthode de fractionnement cellulaire est ici encore apparente. L'identification sans équivoque de l'un ou l'autre ou des deux produits avec le contenu des rhoptries serait par exemple un important progrès dans l'explication de la pénétration.

Une dernière possibilité à envisager pour la protéine 25 KD est à relier à l'absence de fusion entre la vacuole hôte et les lysosomes de la cellule, clairement démontrée par JONES & HIRSCH (1972) en utilisant comme hôte des macrophages. Cette propriété, partagée par d'autres parasites intracellulaires (GOREN, 1977). pourrait dériver entre autres de l'accumulation de molécules polyanioniques dans les lysosomes (GOREN *op cit*, D'HARCY-HART & YOUNG, 1979). Il n'est pas exclu de penser que la protéine 25 KD puisse représenter une excrétion du toxoplasme vers le cytoplasme de la cellule en vue d'un tel rôle. Ceci reste à étudier, bien que l'absence de fusion avec les lysosomes puisse également s'expliquer par le fait que la vacuole parasitophore n'est pas un phagosome, malgré la confusion souvent rencontrée, et que donc elle n'a pas les récepteurs nécessaires à la fusion avec les lysosomes.

Enfin, une protéine libérée aussi précocement lors de l'interaction hôte-parasite pourrait jouer un rôle dans l'immunogénicité du Toxoplasme envers l'organisme qu'il envahit.

CONCLUSION

La schizogonie est un des caractères les plus originaux des Sporozoaires, qui assure la dissémination de ces parasites dans leurs hôtes sous la forme de zoïtes, cellules hautement différenciées et elles mêmes caractéristiques de ce groupe de Protozoaires.

Notre travail a concerné divers aspects de ce phénomène, passionnant par les problèmes de Biologie Cellulaire qu'il permet d'aborder (mitose, différenciation, interaction hôte-parasite, etc...), et aux conséquences épidémiologiques considérables puisqu'il représente souvent la phase aiguë des parasitoses provoquées par les Sporozoaires.

Deux types de résultats ont été obtenus : d'une part, nous avons défini des caractéristiques structurales, physiologiques et biochimiques par l'application de techniques classiques d'observation ou d'analyse ; d'autre part, nous avons essayé de développer des méthodes particulières susceptibles d'apporter les réponses aux problèmes spécifiques posés par ces organismes.

En ce qui concerne l'aspect analytique, nous avons participé à la description ultrastructurale de la schizogonie chez les *Eimeria in vivo* et *in vitro*. Au sein du nombre important de travaux publiés sur ce sujet, notre contribution a principalement porté sur les stades précoces de genèse (mise en place de la vésicule apicale, du conoïde, initiation du complexe membranaire interne et des microtubules sous pelliculaires). Comme nous l'avons rappelé plus haut, la morphologie ultrastructurale est encore à présent le seul volet connu de l'organitogenèse des zoïtes, processus complexe et original de différenciation dont les mécanismes restent à élucider.

Nos observations concernant la pénétration de *Sarcocystis* et *Toxoplasma* ont confirmé celles effectuées par divers auteurs sur d'autres espèces quant au peu de dommages infligés au plasmalemme de la cellule hôte au moins au point de vue ultrastructural. La seule étude cytologique n'a pas suffi à définir clairement le phénomène, et en particulier à démontrer une exocytose. Nos résultats nous ont conduit d'une part à insister sur une variabilité possible du processus entre les différents genres, et d'autre part à interpréter la pénétration comme résultant probablement de l'activité simultanée de la pellicule et des organites apicaux. Nous avons ainsi orienté notre étude vers ces deux formations.

L'analyse de la pellicule des zoïtes par la cryofracture a révélé une organisation extrêmement ordonnée au sein de cet ensemble membranaire très particulier, et apporté une confirmation indiscutable de la nature vésiculaire du complexe interne par la démonstration de l'identité de structure - en position inverse - des deux strates qui le constituent. L'orientation antéro postérieure très marquée suggère la possibilité d'une intervention des formations décrites dans la mobilité des zoïtes, cette dernière étant elle-même un phénomène très original dont les modalités restent à définir. Les diverses méthodes utilisées pour tenter d'expliquer cette fonction probable de la pellicule (cryofracture, capping, analyse de ghosts, activation tryptique et iodination) ont apporté des éléments d'information qu'il est nécessaire de compléter avant de pouvoir s'engager dans l'explication du phénomène.

Le second volet de notre travail concerne l'apport méthodologique que représente la mise au point de protocoles de fractionnement subcellulaire des zoïtes de Coccidies. Bien que n'ayant pu en tirer encore beaucoup de résultats hormis une meilleure distinction entre les différents types d'organites et la caractérisation du contenu protéique de certains d'entre eux, il est certain que la possibilité d'isoler ces formations ouvre de larges perspectives quant à l'étude de leur structure, de leur genèse et de leur fonction. Les techniques de fractionnement restent à affiner pour *Eimeria*, et surtout *Toxoplasma*, et pourront sans doute être élargies à d'autres genres, mais une étape essentielle était de montrer que ce problème pouvait être abordé et résolu chez les Coccidies et c'est ce qui a été réalisé avec *Sarcocystis*.

Nous nous sommes donné ainsi les outils nécessaires à la recherche de l'explication du mécanisme de l'invasion de la cellule hôte, phénomène qui a été notre préoccupation majeure au cours de ce travail, mais que nous avons jusque là à peine abordé. Nous avons dit plus haut combien cet événement était capital dans la parasitose, tant par son intérêt fondamental d'interaction entre organismes que comme cible d'une intervention thérapeutique.

Par ailleurs, ce que nous avons appris ou sommes en mesure d'apprendre sur les différenciations originales des zoïtes nous amène à aborder des questions d'intérêt plus général. Ainsi la motilité superficielle n'est-elle pas l'apanage des zoïtes de Sporozoaires, même si elle atteint chez eux un développement spectaculaire : elle existe chez bien d'autres cellules et y remplit sans doute d'importantes fonctions. Sous l'angle du déplacement de récepteurs dans la membrane, ce phénomène constitue actuellement une préoccupation majeure de la Biologie Cellulaire, et les zoïtes de Coccidies représentent à notre avis un matériel de choix pour son étude.

D'autre part, bien que difficile à étudier chez des parasites intracellulaires, l'organitogenèse intervenant lors de la schizogonie représente un processus de différenciation cellulaire très original dont les régulations sont inconnues. Le fait d'avoir caractérisé des contenu protéiques simples dans certains organites offre à l'expérimentateur des marqueurs privilégiés pour l'étude des phases de développement et devrait permettre d'aborder l'étude des mécanismes de contrôle de la genèse.

Au cours de l'exposé de nos résultats, nous avons souligné les interrogations que ceux-ci soulevaient et par là même les voies de recherche qu'ils ouvraient. Il s'agira ainsi d'étudier le rôle de la pellicule des zoïtes dans leur motilité. Le problème est double puisqu'il concerne d'une part la définition des interactions avec le support, et d'autre part la mise en évidence du mécanisme générateur de l'énergie nécessaire au mouvement. Il s'agit d'un processus biophysique complexe nécessitant pour le comprendre une collaboration multidisciplinaire. Si l'étude des protéines superficielles a été abordée, il conviendra également de considérer le rôle possible des lipides membranaires. Le problème du mécanisme de la motilité soulève celui des interactions entre plasmalemme, complexe membranaire interne et microtubules sous pelliculaires, encore totalement inconnues. Nous avons préparé cette étude en isolant les "ghosts" et il sera indispensable à présent d'en séparer les éléments constitutifs afin d'étudier leurs rapports mutuels et leur intervention possible dans le mouvement.

Le travail engagé sur les organites apicaux ouvre deux voies majeures : l'étude de leur genèse et celle de leur rôle. Il est encore nécessaire d'améliorer les fractionnements subcellulaires afin de pouvoir comparer les organites entre genres, ce qui n'a été réalisé jusque là que pour les micronèmes. Par ailleurs, seules les protéines ont été caractérisées dans ces formations et les autres espèces moléculaires susceptibles d'y être représentées sont encore à rechercher.

L'analyse de la genèse des rhoptries, granules denses et micronèmes sera facilitée par la culture *in vitro* en présence de précurseurs radioactifs et les premiers jalons de ce travail ont été posés. Mais une nécessité impérieuse apparaît dès que l'on tente de définir les aspects techniques de cette étude : il faudra en effet parvenir à synchroniser le développement de ces parasites de façon à pouvoir analyser avec précision le déroulement de leur différenciation.

Le rôle des organites apicaux demeure énigmatique et seule l'étude des propriétés de leur contenu et de leur évolution au cours de l'interaction avec l'hôte pourra éclaircir ce problème. Ainsi, si l'exocytose en cours de

pénétration semble très probable, elle n'affecte sans doute pas les trois formations et la première question à résoudre est de savoir quels sont, parmi les organites, ceux dont le contenu est excrété, et à quel moment. On peut ainsi concevoir le rôle d'une sécrétion dans le glissement, ou, après pénétration, dans l'interaction du parasite avec la cellule hôte, préalable à son développement. Par ailleurs, une fonction dans le cytoplasme même de la Coccidie ne peut être exclue pour l'une ou l'autre de ces différenciations. L'analyse des propriétés enzymatiques ou physiques particulières des contenus devrait aider à découvrir ces fonctions.

Enfin, il reste à comprendre l'exocytose liée à la pénétration dans le cellule hôte. Les hypothèses avancées sont nombreuses, mais aucune n'a pu jusque là être vérifiée, faute d'avoir pu définir précisément le phénomène. Il est nécessaire d'identifier et de localiser le produit sécrété et de définir son rôle sur le plasmalemma hôte ou sur le cytoplasme sous-jacent. En outre, comme il s'agit d'une molécule libérée précocement lors de l'interaction avec l'hôte, on peut s'interroger sur son implication possible dans les réactions immunitaires de l'hôte envers son parasite. L'absence de vaccin efficace contre ces organismes justifie largement l'intérêt d'une telle investigation.

Ainsi peut-on envisager à la suite de ce travail tant des implications pratiques que des contributions d'intérêt fondamental, ces deux aspects reflétant les préoccupations majeures et complémentaires qui s'imposent au parasitologiste. Si nous avons apporté quelques réponses, nous avons posé beaucoup de questions et espérons pouvoir participer à la résolution de certaines d'entre elles.

BUS
LILLE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABERCROMBIE, M., HEAYSMAN, J. E. M., PEGRUM, S. M. (1971)
Exp. Cell Res. 67, 359 - 367.

AIKAWA, M., KOMATA, Y., ASAI, T., MIDORIKAWA, O. (1977)
Am. J. Pathol. 87, 285- 290.

AIKAWA, M., MILLER, L.H., JOHNSON, J., RABBEGE, J. (1978)
J. Cell Biol. 77, 72-82.

AMBROST, E. J. (1966)
Prog. Biophys. Mol. Biol. 16, 243.

AUST- KETTIS, A., SUNDQVIST, K. G. (1978)
Scand. J. Immunol. 7, 35-44.

BANNISTER, L. H. (1977)
Parasite Invasion (TAYLOR, A. E., MULLER, R., Eds)
P27-55, Blackwell, Oxford.

BANNISTER, L. H., BUTCHER, G. A., DENNIS, E. D., MITCHELL, G. H. (1975)
Parasitology 71, 483-491.

BANNISTER, L. H., BUTCHER, G. A., MITCHELL, G. H. (1977)
Bull. O. M. S. 55, 163- 169.

BLOODGOOD, R. A. (1977)
J. Cell Biol. 75, 983-989.

BLOODGOOD, R. A. (1978)
Cell Biol. Int. Rep. 2, 171-176.

BLOODGOOD, R. A., LEFFLER, E. M., BOJCZUK A. T. (1979)
J. Cell Biol. 82, 664-674.

BONTEMPS, M., YVORE, P. (1974)
Ann. Rech. Vet. 5, 109-113.

BRETSCHER, M. S. (1976)
Nature 260, 21-23.

BRINKLEY, B. R., MURPHY, P., RICHARDSON, L. C. (1967)
J. Cell Biol. 35, 279-283.

BURRY, R. W., WOOD, J. G. (1979)
J. Cell Biol. 82, 726-741.

CHERIAN, P. V., DUSANIC, D. G. (1978)
Exp. Parasit. 44, 14-25.

COCHRANE, A. H., AIKAWA, M., JENG, M., NUSSENZWEIG, R. S. (1976)
J. Immunol. 116, 859-867.

COOK, R. T., ROCK, R. C., AIKAWA, M., FOURNIER, M. J. (1971)
Comp. Biochem. Physiol. 39 B, 897-911.

DANFORTH, H. D., AIKAWA, M., COCHRANE, A. H., NUSSENZWEIG, R. S. (1980)
J. Protozool. 27, 193-201.

DANIELLI, J. F., DAVSON, H. (1934)
J. Cell. Comp. Physiol. 5, 495.

DANON, D., GOLDSTEIN, L., MARIKOVSKY, Y., SKUTELSKI, E. (1972)
J. Ultrastruct. Res. 38, 500-510.

DE PETRIS, S. (1974)
Nature 250, 54-56

DE PETRIS, S. (1977)
Cell Surf. Rev. 3, 643-728.

DESPORTES, I. (1969)
Ann. Sci. Nat. (12e Série) 11, 31-96.

D'HARCY-HART, P., YOUNG, M. R. (1979)
Exp. Cell Res. 118, 365-375

DOLJANSKI, F., KAPPELLER, M. (1976)
J. Theor. Biol. 62, 153-270.

DORAN, D. J. (1973)

The Coccidia (HAMMOND, D. M., LONG, P. L., Eds)
185-252, University Park Press, Baltimore.

DORAN, D. J. , VETTERLING, J. M. (1968)

Nature 217, 1262.

DUBREMETZ, J. F. (1971)

C. R. Acad. Sci. Paris 272, série D, 600-603.

DUBREMETZ, J. F. (1975)

J. Protozool. 22, 71-84.

DUBREMETZ, J.F., DISSOUS, C. (1980)

Molec. Biochem. Parasit. 1, 279-289.

DUBREMETZ, J. F., PORCHET, E., PARENTY, M. D. (1975)

C. R. Acad. Sci. Paris 280, série D, 1793-1795.

DULBECCO, R., VOIGT, M. (1954)

J. Exp. Med. 99, 167-182.

DVORAK, J. A., MILLER, L. H., WHITEHOUSE, W. C., SHIROISHI, T. (1975)

Science 187, 748-750.

DWYER, D. M. (1975)

J. Cell Sci. 19, 621-644.

DWYER, D. M. (1976)

J. Immunol. 117, 2081-2091.

DZBENSKI, T. H., MICHALAK, T., PLONKA, W. S. (1976)

Infect. Immun. 14, 1196-1201.

DZBENSKI, T. H., SIELINSKA, E. (1976).

Experienta 32, 454.

EAGLE, H. (1959)

Science 130, 342.

FAUTREZ, J. (1977)

Eléments d'Embryologie causale, Gauthiers Villars, Paris.

FAYER, R., ROMANOVSKI, R. D., VETTERLING, J. M. (1970)

J. Protozool. 17, 432 - 436.

FERPANTE, A., THONG, Y. H. (1979).

Int. J. Parasit. 9, 599 - 601.

FISHER, K. A. (1975)

Science 190, 983 - 984.

FRENKEL, J.K. (1974)

Z. Parasitenk. 45, 125-162

FRENKEL, J. K., HEYDORN, A. O., MEHLHORN, H., ROMMEL, M. (1979)

Z. Parasitenk. 58, 115 - 139.

GARNHAM, P. C. C., BIRD, R. G., BAKER, J. R. (1960)

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 54, 274 - 278.

GARNHAM, P. C. C., BIRD, R. G., BAKER, J. R., BRAY, R. S. (1961)

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 55, 98 - 102.

GASIC, G. J., BERWICK, L., SORRENTINO, M. (1968)

Lab. Invest. 18, 63 - 71.

GERSHON, N. D. (1978)

Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 75, 1257 - 1360.

GIANNINI, M. S., D'ALESSANDRO, P. A. (1978)

Science 201, 916 - 918.

GOREN, M. B. (1977)

Ann. Rev. Microbiol. 31, 507 - 533.

GRASSE, P. P. (1953)

Traité de Zoologie 1, fasc. 1, Masson, Paris.

GRIMWOOD, B. J., HECHEMY, K., STEVENS, R. W. (1979)

Exp. Parasit. 48, 282 - 286.

GRINNEL, F., HAYS, D. C. (1979)

Anal. Biochem. 97, 400 - 402.

GRINNEL, F., TOBLEMAN, M. Q., HACKENBROCK, C. R. (1975)

J. Cell Biol. 66, 470 - 479.

GUSTAFSON, P. V., AGAR, AGAR, H. D., CRAMER, D. J. (1954)

Am. J; Trop. Med. Hyg. 3, 1008 - 1021.

HAMMOND, D. M. (1973)

The Coccidia (HAMMOND, D. M., LONG, P. L., Eds)

p 46 - 79, University Park Press, Baltimore.

HANDMAN, E., CODING, J. W., REMINGTON J. S. (1980)

J. Immunol. 124, 2578 - 2583.

HELLER, G., SCHOLTYSECK, E. (1971)

Protistologica 7, 451 - 460.

HEYDORN, A. O., GESTRICH, R.; MEHLHORN, H., ROMMEL, M. (1975)

Z. Parasitenk. 48, 73 - 82.

HOWELL, S. L., TYHURST, M. (1977)

J. Cell Sci. 27, 289 - 301.

HUTCHINSON, W. M., DUNACHIE, J. F., WORK, K., SIIM, J. C. (1970)

Brit. Med. J. 5689, 142 - 144.

JACKSON, A. R. B. (1962)

Nature 194, 847 - 849.

JACOBS, L. (1967)

Adv. Parasit. 5, 1 - 45.

JENSEN, J. B., EDGAR, S. A. (1976 a)

J. Parasit. 62, 203 - 206.

JENSEN , J. B., EDGAR, S. A. (1976 b)
J. Parasit. 62, 988 - 992.

JENSEN, J. B., EDGAR, S. A. (1978)
J. Protozool. 25, 169 - 173.

JENSEN, J. B., HAMMOND, D. M. (1975)
J. Protozool. 22, 411 - 415.

JENSEN, J. B., TRAGER W. (1977)
J. Parasit. 63, 883 - 886.

JONES, T. C., HIRSCH, J. G. (1972)
J. Exp. Med. 136, 1173 - 1194.

JONES, T. C., YEH, S., HIRSCH, J. G. (1972)
J. Exp. Med. 136, 1157 - 1172.

KILEJIAN, A. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 4650 - 4655.

KILEJIAN, A (1975)
Biochim. Biophys. Acta 390, 276 - 284.

KING, C. A., PRESTON, T. M. (1977 a)
F. E. B. S. Lett. 73, 59 - 63.

KING, C. A., PRESTON, T. M. (1977 b)
J. Cell Sci. 28, 133 - 149.

LADDA, R. L., AIKAWA, M., SPRINZ, H. (1969)
J. Parasit. 55, 633 - 644.

LAEMMLI, U. K. (1970)
Nature 227, 680 - 685.

LANDAU, I., BOULARD, Y. (1978)
Rodent malaria (KILLICK-KENDRICK, R., PETERS, W., Eds)
p 21-42, Academic Press, New York.

LARSEN, B. (1977)

Molec. Cell. Biochem. 15, 117 - 123.

LASKEY, R. A., MILLS, A. D. (1975)

Eur. J. Biochem. 56, 335 - 341.

LEVINE, N. D. (1970)

J. Parasit. 56, 208 - 209.

LEVINE, N.D., IVENS, V. (1965)

The Coccidian parasites of Rodents, Illinois biological Monographs 33,
The University of Illinois Press, Urbana.

LONG, P. L., SPEER, C. A. (1977)

Parasite Invasion (TAYLOR, A. E., MULLER, R., Eds)
p 1 - 26, Blackwell, Oxford.

LOWRY, O. W., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. R., RANDALL, R. J. (1951)

J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.

LYCKE, E., CARLBERG, K., NORRBY, R. (1975)

Infect. Immun. 11, 853 - 861.

LYCKE, E., NORRBY, R. (1966)

Brit. J. Exp. Pathol. 47, 248 - 256.

MAC LAREN, D. J., BANNISTER, L. H., TRIGG, P. I., BUTCHER, G. A. (1979)

Parasitology 79, 125 - 139.

MARCHALONIS, J. J., CONE, R. E., SANTER, V. (1971)

Biochem. J. 124, 921 - 927.

MARIKOVSKI, V., INBAR, M., DANON, D., SACHS, L. (1974)

Exp. Cell Res. 89, 359 - 367.

MARQUARDT, W. C. (1966)

J. Protozool. 13, 509 - 514.

MEHLHORN, H., HEYDORN, A.O., SENAUD, J., SCHEIN, E. (1979)

Ann. Biol. 18, 98-120.

MEHLHORN, H., SENAUD, J., CHOBOTAR, B., SCHOLTYSECK, E. (1975)
Z. Parasitenk. 45, 227 - 236.

MILLER, L. H., AIKAWA, M., JOHNSON, J. G., SHIROISHI, T. (1979)
J. Exp. Med. 149, 172 - 184.

MOLLER, P. C., CHANG, J. P. (1978)
Exp. Cell Res. 114, 39 - 45.

MOSHER, D. J., VAHERI, A. (1978)
Exp. Cell Res. 112, 323 - 334.

NICOLSON, G. L. (1976)
Biochem. Biophys. Acta 457, 57 - 108.

NORRBY, R. (1970)
Infect. Immun. 2, 250 - 255.

NORRBY, R. (1971)
Infect. Immun. 3, 278 - 286.

PFEFFERKORN, E., SCHWARTZMAN, J. D. (1980)
Eur. J. Cell Biol. 22, 518.

PHILIPPE, M., FOURNET, B., CAIGNEAUX, E., SCHREVEL, J. (1979)
Biol. Cell. 35, 165 - 174.

PORCHET, E. (1972)
Ann. Biol. 11, 413 - 426.

PORCHET, E. (1975)
J. Protozool. 22, 214 - 220.

PORCHET, E. (1977)
Protistologica 13, 31 - 52.

PORCHET, E., RICHARD, A., FERREIRA, E. (1980)
J. Protozool. (sous presse)

PORCHET, E., VIVIER, E. (1971)
Ann. Biol. 10, 77 - 114.

PORCHET, E., VIVIER, E., TORPLER, G., CARON, H. (1980)
J. Protozool. 27, 88A.

PRESTON, T. M., KING, C. A. (1978)
J. Cell Sci. 34, 145 - 158.

PUCK, T. T., CIECIURA, S. J., FISHER, H. W. (1957)
J. Exp. Med. 106, 145 - 58.

ROBERTSON, J. D. (1957)
J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 1043 - 1047.

ROMMEL, M., HEYDORN, A. O., GRUBER, F. (1972)
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 85, 101 - 105.

ROUDABUSH, R. L. (1937)
IOWA State Coll. J. Sci. 2, 135 - 163.

RUDZINSKA, M., TRAGER, W., LEWENGRUB, S. T., GUBERT, E. (1976)
Cell Tissue Res. 169, 323 - 334.

RYLEY, J. F., BENTLEY, M., MANNERS, D. J., STARK J. R. (1969)
J. Parasit. 55, 839 - 845.

SCHIEFER, H. G., KRAUSS, H., BRUNNER, H., GERHARDT, U. (1976)
J. Bacteriol 127, 461 - 468.

SCHOLTYSECK, E. (1973)
The Coccidia (HAMMOND, D. M., LONG, P. L. Eds)
p 82 - 144, University Park Press, Baltimore.

SCHULMAN, S., OPPENHEIM, J. D., VANDERBERG J. P. (1980)
Exp. Parasit. 49, 420 - 429.

SCHREINER, G. F., UNANUE, E. M. (1976)
Adv. Immunol. 24, 38 - 165.

SCHREVEL, J. (1968)
J. Microscopie. 7, 391 - 410.

SEED, T. M., KREIER, J. P. (1976)

Infect. Immun. 14, 1339 - 1347.

SEGREST, J. P., GULIK KRZYWICKI, T., SARDET, C. (1974)

Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 71, 3294 - 3298.

SENAUD, J. (1967)

Protistologica 3, 167 - 232.

SENAUD, J., VENDRELY, R., TRONCHE, P. (1968)

C. R. Acad. Sci. Paris 266, 1137 - 1138.

SHERMAN, I. W., JONES, L. A. (1979)

J. Protozool 26, 489 - 501.

SINGER, S. J., NICOLSON, G. L. (1972)

Science 175, 720 - 731.

SKUTELSKI, E., DANON, D. J. (1976)

J. Cell Biol. 71, 337 - 345.

SKUTELSKI, E., HARDY, B. (1976)

Exp. Cell Res. 101, 337 - 345.

STERN, P. L., BRETSCHER, M. S. (1979)

J. Cell Biol. 82, 829 - 833.

SUBJECK, J. R., WEISS, L. J. (1975)

J. Cell Physiol. 85, 529.

SZUBINSKA, B. (1978)

Exp. Cell Res. 111, 105 - 115.

TAKEUCHI, T. (1977)

Jap. J. Parasit. 26, 75 - 85.

TAMM, S. L. (1979)

J. Cell Biol 80, 141 - 149.

TANABE, K., ASAI, T., KIMATA, I., TAKADA, S. (1979)

J. Gen. Microbiol. 118, 433 - 437.

TANABE, K., KIMATA, I., TAKADA, S. (1980)
J. Parasit. 66, 240 - 244.

TAYLOR, R. B., DUFFUS, P. H., RAFF, M. C., DE PETRIS, S. (1971)
Nature New Biol. 233, 225.

TRYON, J. C. (1979)
Exp. Parasit. 48, 198 - 205.

TRYON, J. C., WEIDNER, E., LARSON, A. D., HART, L. T. (1978)
J. Parasit. 64, 1127 - 1129.

UNANUE, E. R., AULT, K. A., KARNOVSKY, M. J. 1974
J. Exp. Med. 139, 295.

VANDERBERG, J. P. (1974)
J. Protozool. 21, 527 - 537.

VANDERBERG, J. P., NUSSENZWEIG, R. S., MOST, H. (1969)
Milič. Med. 134, 1183.

VANDERBERG, J. P., NUSSENSWEIG, P. S., SANABRIA, Y., NAWROT, R., MOST, H. (1972)
Proc. Soc. Helminth. Wash. 39, 514.

VARGHESE, T (1977)
J. Protozool. 24, 376 - 382.

VICKER, M. G. (1977)
Exp. Cell Res. 109, 127 - 138.

VIVIER, E. (1979)
Bull. Soc. Zool. France 104, 245 - 381.

VIVIER, E., DEVAUCHELLE, G., PETITPREZ, A., PORCHET - HENNERE, E., PRENSIER, G.,
SCHREVEL, J., VINCKIER, D. (1970)
Protistologica 6, 127 - 147.

VIVIER, E., PETITPREZ, A. (1969)
J. Cell. Biol. 43, 329 - 342.

VIVIER, E., PETITPREZ, A. (1972)

Protistologica 8, 199 - 222.

VIVIER, E., PROUVOST, J. (1977)

Biol. Cell. 2, 159 - 164.

WAGENBACH, G. E. (1969)

J. Parasit. 55, 833 - 838.

WANG, C. C. (1978)

Comp. Biochem. Physiol 61 B, 571 - 579.

WANG, C. C., WEPPELMAN, R. M., LOPEZ - RAMOS, B. (1975)

J. Protozool. 22, 560 - 564.

WEISS L. (1969)

Int. Rev. Cytol. 26, 63 - 105.

WESSELLS, N. K., NUTTAL, R. P., WRENN, J. T., JOHNSON, S. (1976)

Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 73, 4100 - 4104.

ANNEXE 1 : PUBLICATIONS

La Genèse des Mérozoïtes chez la Coccidie *Eimeria necatrix*. Etude Ultrastructurale*

JEAN FRANCOIS DUBREMETZ†

Laboratoire de Protistologie et de Microscopie électronique Université des Sciences et Techniques de Lille B. P. 56-59 650 -
Villeneuve D'Ascq - France

RESUME. Les schizontes de 2^{ème} génération d'*Eimeria necatrix* ont été étudiés au microscope électronique. La différenciation des mérozoïtes est associée à la dernière mitose, qui ne semble pas différer essentiellement des précédentes. Les mérozoïtes se développent à la périphérie du schizonte. Le conoïde et 22 microtubules sous pelliculaires, probablement induits par les centrioles, et le complexe membranaire interne ainsi que les précurseurs des rhoptries, qui semblent issus de l'appareil de Golgi, apparaissent auprès de chaque pôle nucléaire, sous la membrane du schizonte. Ces organites sont les premiers inclus dans les ébauches de mérozoïtes. Puis, le noyau, le dictyosome et les vésicules multimembranaires pénètrent dans les futurs mérozoïtes. Les micronèmes, probablement formés par l'appareil de Golgi, et les grains d'amylopectine sont produits plus tard, quand les mérozoïtes se séparent du reliquat cytoplasmique. Le mode de genèse de ces divers organites et les relations entre la dernière mitose et la différenciation sont discutés.

SYNOPSIS. Second generation schizonts of *Eimeria necatrix* were studied with the aid of the electron microscope. Differentiation of daughter merozoites is associated with the last mitosis, which is not significantly different from the earlier ones. The merozoites develop at the periphery of the schizont. The conoid and 22 subpellicular microtubules, probably induced by centrioles, and the inner membranes complex and the rhoptry anlagen which seem to be produced by the Golgi apparatus, appear close to each nuclear pole, just near the schizont membrane. These organelles are the first to appear in the merozoite anlagen. Then, nucleus, dictyosome and multimembranous vesicles enter the budding merozoites. Micronemes, probably originating from Golgi apparatus, and amylopectin granules are produced later, when daughter merozoites separate from the residuum. The genesis of these various organelles and the relation between the last mitosis and differentiation are discussed.

Index Key Words: *Eimeria necatrix*; chicken; schizogony; merozoites; organitogenesis; electron microscopy.

LES processus de genèse des "germes infectieux" (21) des Sporozoaires ont été étudiés chez de nombreuses espèces au cours de la schizogonie ou de la sporogénèse (19). Cependant, si dans la plupart des cas les modalités générales d'individualisation de ces mérozoïtes ou sporozoïtes ont pu être reconstituées, l'origine et le mode de genèse des organites qu'ils renferment ont beaucoup plus rarement été précisés.

L'étude ultrastructurale de la schizogonie chez la Coccidie

Eimeria necatrix (Johnson, 1930), parasite du poulet domestique, a permis, quant à ces phénomènes, des observations nouvelles que nous rapportons ici.

MATERIEL ET METHODES

Des poulets, âgés de 2 semaines, sont infestés par voie orale, par environ 250 000 oocystes sporulés d'*E. necatrix* (souche transmise par le Docteur P. Yvoré, du Centre de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Tours). Ils sont sacrifiés 5 jours plus tard, lors de la fin de la 2^{ème} schizogonie du parasite. Des fragments de l'intestin moyen sont fixés selon la méthode de Terzakis (42), déshydratés par l'acétone et inclus dans l'Epon. Les coupes sont réalisées sur Ultramicrotome

* Ce travail a bénéficié de l'aide matérielle du C. N. R. S. (E. R. A., n° 184 et A. T. P. "Différenciation cellulaire," Contrat n°439 902).

† Nous remercions Monsieur le Professeur Vivier et Madame Porchet-Henneré pour leurs conseils au cours de sa réalisation.

Porter-Blum MT 1, au moyen de couteaux de verre et de diamant; elles sont contrastées par l'acétate d'uranyle-citrate de plomb et observées sur microscope électronique Siemens Elmiskop IA et Hitachi HU 11 E. Certaines coupes subissent le traitement acide périodique-thiocarbohydrazide-protéinate d'argent pour la mise en évidence des polysaccharides (44).

RESULTATS

Apparition des organites de la région antérieure du mérozoïte.

—Pendant la phase de croissance et de multiplication nucléaire, le schizonte d'*E. necatrix* ne montre aucune différenciation particulière. Il est logé dans une vacuole de la cellule hôte et renferme des organites classiques. Les noyaux sont répartis à la périphérie du cytoplasme et se divisent selon des modalités décrites précédemment (8). Lorsque le schizonte atteint un diamètre d'environ 25 μm , des formations nouvelles apparaissent simultanément auprès de chaque diplosome, sous la membrane cytoplasmique (Figs. 1-10). Il s'agit des ébauches du conoïde et du complexe sous pelliculaire (membranes, microtubules) des futurs mérozoïtes. En ce début de différenciation, les noyaux, au nombre de 15 à 20 par section, sont généralement à un stade avancé de la mitose, munis de centrocytes extranucléaires pointant vers les centrioles (Figs. 1,7). Mais il arrive d'observer ces néoformations auprès des pôles d'un court fuseau intranucléaire représentant un stade mitotique beaucoup plus précoce (Figs. 2,3).

Le futur conoïde (Figs. 2-16) est un tronc de cône très court de diamètre 200 à 250 nm et 60 à 100 nm de hauteur (270 et 250 nm respectivement chez le mérozoïte mûr) (6) et dont la paroi est formée de fibres de 30 nm visibles sur certaines coupes (Figs. 7,14). A l'intérieur de l'organite sont souvent observés 2 microtubules de diamètre 20 nm, accolés et de hauteur égale à celle du tronc de cône (Figs. 9,10,13-16). Il y existe fréquemment une ou 2 vésicules de 60 nm limitées par une membrane unitaire et dont le centre peut être occupé par un granule osmiophile (Figs. 2,4,6,16). Sur les coupes les plus tangentielles apparaissent, au-dessus du conoïde, 2 anneaux concentriques de 0,1 et 0,2 μm (Fig. 8) dont la trace est parfois visible en coupe transversale (Fig. 7). Ces formations apicales sont situées immédiatement sous le plasmalemme. Le futur conoïde est voisin, et parfois très proche, d'une paire de centrioles vers laquelle pointe un centrocyte (Figs. 6,7,16) ou le pôle d'un fuseau (Fig. 2). Les coupes tangentielles sériées révèlent à ce stade l'existence d'une bandelette dense incurvée qui s'allonge entre les centrioles et le conoïde (Figs. 13-16). Cette formation, de nature fibrillaire, débute sous les centrioles, à proximité de l'apex du centrocyte, et se dirige vers le conoïde à l'intérieur duquel elle pénètre par dessous pour aller se terminer au voisinage des 2 microtubules accolés. Cette bandelette est, à un stade sans doute antérieur, plus courte,

moins structurée, et se termine dans une condensation annulaire préfigurant le conoïde (Figs. 4,5).

Autour du futur conoïde, et plaquées sous le plasmalemme, 2 membranes unitaires accolées s'étendent sur 0,5 μm environ (Figs. 1,6,7). Il s'agit de l'ébauche du complexe membranaire interne du futur mérozoïte, qui n'est jamais observé au-dessus du conoïde et débute au niveau de l'insertion des microtubules sous-pelliculaires. A l'extrémité distale, et parfois dans la lame elle-même les 2 membranes s'écartent puis se rejoignent pour former une petite vésicule (Figs. 6,7). Il s'agit donc de saccules très aplatis dont les parois sont accolées, sauf à la périphérie. Des lames ergastoplasmiques parallèles à la surface du schizonte peuvent venir se terminer à proximité du conoïde du futur mérozoïte. Nous n'avons jamais observé de continuité entre ces lames et le futur complexe membranaire interne. Ce dernier peut, dans sa partie distale, s'incurver vers le cytoplasme et former une ampoule de 0,2 μm surmontée d'un goulot étroit (Fig. 12).

Les microtubules sous pelliculaires naissent au niveau d'un anneau de diamètre 0,35 μm , de structure discontinue et périodique, entourant l'apex du conoïde (Figs. 9,10). Cet anneau est constitué de 11 paires de courts batonnets denses accolés répartis à intervalles réguliers (0,1 μm) sur une circonférence. Entre 2 de ces paires, on observe 3 batonnets moins osmiophiles également espacés. Les microtubules, au nombre de 22, débute à la partie supérieure de cet anneau (Figs. 9,10), insérés 2 par 2 entre chaque paire de batonnets denses. Leur diamètre est ~ 20 nm et ils rayonnent autour du conoïde, souvent très obliquement, comme les aubes d'une turbine (Fig. 9). Dans ce cas, ils sont arqués, et leur sens de courbure est identique à celui de la bandelette dense joignant centrioles et conoïde (Figs. 4,15). Les coupes transversales du schizonte montrent que les microtubules longent le complexe membranaire interne et ont une extension latérale identique à ce dernier, c'est-à-dire $\sim 0,5 \mu\text{m}$ à ce stade (Fig. 6). Sur ces mêmes coupes apparaît parfois un triangle dense dont la base est accolée à l'extrémité proximale du complexe membranaire interne, au niveau de l'anneau d'insertion. Il arrive d'observer, dans le cytoplasme de schizontes où la différenciation n'a pas encore débuté, des formations périodiques de même structure que l'anneau sur lequel s'insèrent les microtubules, mais n'affectant pas une disposition circulaire. Ces formations peuvent être voisines d'une paire de centrioles (ou diplosome) (Fig. 11).

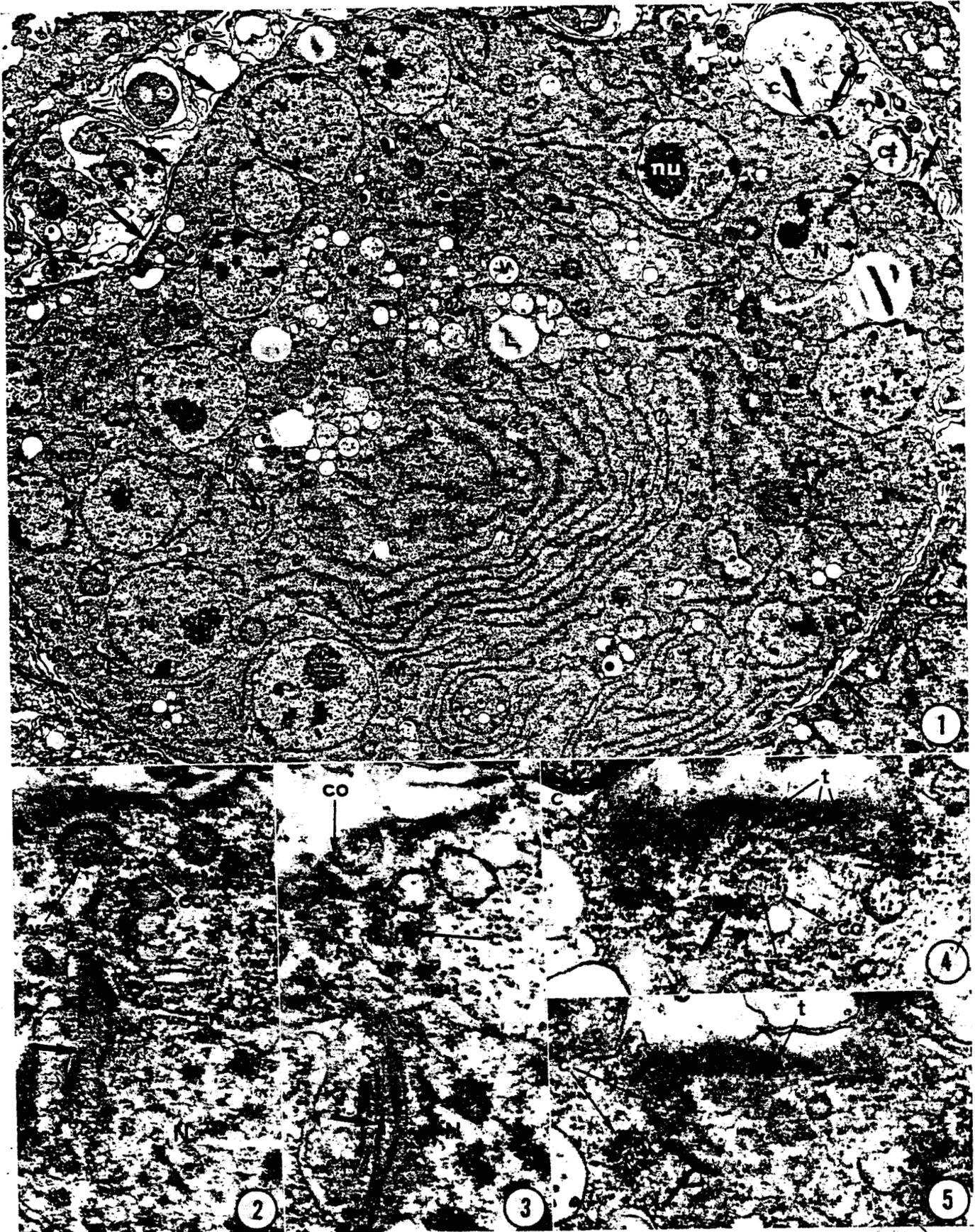
D'autres organites sont également associés à l'initiation des mérozoïtes: Contre le noyau, à proximité du centrocyte, est présent un dictyosome constitué d'un lit de vésicules de 50 nm surmonté par un petit nombre de saccules aplatis (Fig. 7): Sous le conoïde apparaît une formation arrondie, de 0,4 μm , à contenu granuleux dense et limitée par une membrane unitaire (Fig. 12): Une vacuole plurimembranaire jouxte parfois le noyau (Figs. 15,16).

Toutes les figures représentent les schizontes de 2^{ème} génération d'*Eimeria necatrix* (Johnson). Figures 1-36, micrographies électroniques. Abréviations: A, anneau d'insertion des microtubules sous pelliculaires; a, anneaux apicaux; c, centriole; cm, complexe membranaire interne; co, conoïde; ct, centrocyte; en, enveloppe nucléaire; er, ergastoplasme; G, dictyosome; H, cellule hôte; L, globule lipidique; lb, lame bimembranaire; M, mitochondrie; m, membrane cytoplasmique; mp, micropore; N, noyau; nu, nucléole; p, amylopectine; pR, pédoncule de rhoptrie; R, rhoptrie; RA, future rhoptrie; s, micronème; t, microtubule sous pelliculaire; v, vacuole; va, vésicule apicale; vm, vacuole plurimembranaire.

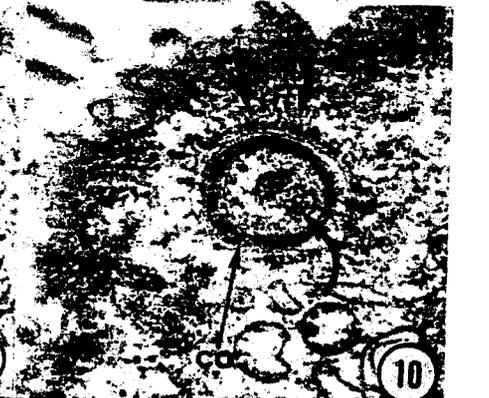
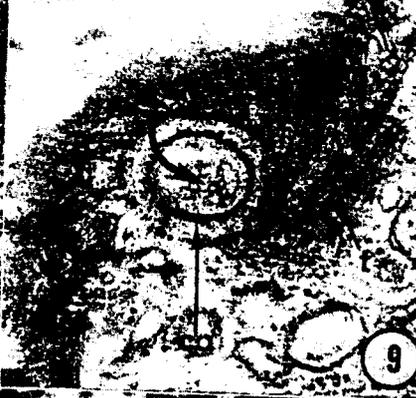
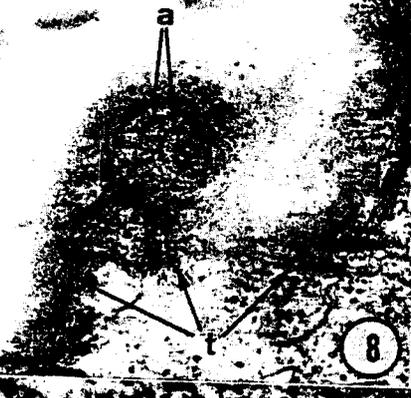
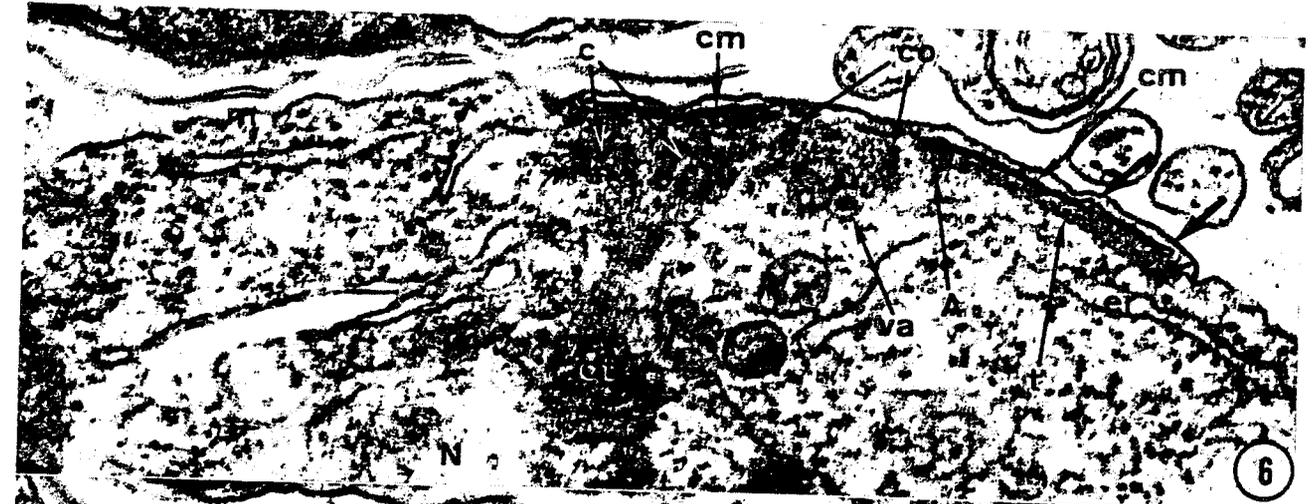
Fig. 1. Schizonte à la périphérie duquel apparaissent les ébauches des mérozoïtes (flèches). $\times 11,000$.

Figs. 2, 3. Coupes successives au niveau des formations initiales d'un mérozoïte situées face au pôle d'un noyau traversé par un court fuseau (flèche). $\times 57,000$.

Figs. 4, 5. Coupes tangentielles successives d'un stade très précoce de différenciation: une bandelette dense (flèche) s'étend entre les centrioles et le futur conoïde représenté par un anneau osmiophile centré sur une vésicule. Les microtubules sous pelliculaires rayonnent obliquement autour du conoïde. $\times 57,000$.



HJ'S
LIBRARY



RUS
LILLE

"*Perlage*" des mérozoïtes.—Lorsque les néoformations sous-pelliculaires ont atteint une extension latérale d'environ 1 μm , elles commencent à soulever la membrane du schizonte en un dôme centré sur le conoïde (Fig. 12). Puis cette protubérance s'accroît, devient un cylindre préfigurant l'apex du futur mérozoïte (Figs. 17,18).

Dans une 2^{ème} étape, le diplosome, qui était resté jusque là à la base de l'évagination cytoplasmique commence à y pénétrer tandis que celle-ci continue de s'allonger. Il entraîne à sa suite, par l'intermédiaire du centrocone, le noyau, qui est ainsi progressivement intégré dans le jeune mérozoïte (Figs. 19-32). Au cours de ce perlage, l'évolution des divers organites du futur germe peut être envisagée successivement.

Le conoïde est toujours situé à l'apex de l'évagination cytoplasmique, surmonté par les anneaux apicaux visibles sur certaines coupes (Figs. 17,31). Son diamètre varie peu, mais sa hauteur croît progressivement et il atteint sa taille définitive après le début de pénétration du noyau (Figs. 22,31). On retrouve sur certaines coupes (Figs. 28,29), les 2 microtubules accolés s'allongeant sur toute la hauteur de l'organite, et auprès desquels peut aboutir une bandelette dense incurvée comparable à celle observée lors de la phase d'initiation (Figs. 28,29).

Le complexe membranaire interne est appliqué contre le plasmalemme dans l'apex du mérozoïte en cours d'individualisation (Figs. 17,22,29). A l'extrémité antérieure, il se recourbe et s'interrompt au niveau des anneaux apicaux (Figs. 17,22). Mais dans la quasi totalité du futur germe, ce complexe présente une organisation beaucoup plus irrégulière. Les coupes transversales montrent qu'il est formé de lames bimembranaires de longueur variable ondulantes dans le cytoplasme, et dont une extrémité s'applique contre le plasmalemme en venant se glisser sous une (ou parfois plusieurs) paire de microtubules sous pelliculaires (Figs. 23-25). Certaines de ces lames peuvent venir s'accoler au dictyosome (Fig. 25). Les sections longitudinales offrent l'image classique du complexe pentalaminé juxtaposé à la membrane cytoplasmique (Figs. 19-22), mais de longues lames bimembranaires longeant la face interne des microtubules sous pelliculaires sont également visibles (Figs. 18,19). Le complexe membranaire interne s'interrompt à la base de l'évagination représentant le futur mérozoïte (Figs. 19,30). Les micropores commencent à apparaître sous leur forme classique au cours de ce "perlage" (Fig. 23).

Les 22 microtubules sous pelliculaires restent parallèles à la surface cytoplasmique pendant l'évagination du mérozoïte. Ils s'insèrent à l'apex sous l'extrémité du complexe membranaire interne (Figs. 18,26) et se terminent postérieurement au même niveau que celui-ci (Figs. 18,20). Nous n'avons pas retrouvé l'anneau antérieur de structure périodique observé chez les stades initiaux. Par contre, entre chaque microtubule est présente, à ce niveau, une petite densification cruciforme (Fig. 28). Bien qu'à l'apex les microtubules soient espacés régulièrement les uns des autres (Figures 31, 32), ils sont groupés

plus bas par paires (Figs. 23-25). Ce mode de groupement est d'autant plus net qu'à chaque paire ou presque correspond une lame du complexe membranaire interne (Fig. 24).

Les futures rhoptries sont figurées, dès le début du "perlage" des mérozoïtes, par 3 vésicules de 0,3 à 0,5 μm , limitées par une membrane unitaire, au contenu dense (Figs. 18, 24), et qui occupent la quasi totalité du volume de l'évagination (Fig. 18). Lorsque la pénétration nucléaire a commencé, un pédoncule se forme qui s'allonge vers le conoïde (Fig. 20). Le contenu de ces vésicules se condense et les rhoptries acquièrent ainsi leur morphologie définitive (Fig. 31). La pédiculation peut ne pas être orientée immédiatement vers l'apex de la cellule (Fig. 31). A proximité du conoïde existent de petites vésicules au contenu identique à celui des futures rhoptries, mais qui n'ont jamais montré de pédoncule (Figs. 18, 22).

Pendant l'individualisation de la partie antérieure du mérozoïte, les centrioles restent appliqués contre l'extrémité postérieure du complexe membranaire interne, et le pôle proximal du noyau, figuré par un centrocone, pointe vers eux (Fig. 17). Par la suite le diplosome pénètre dans l'évagination, en restant proche de la surface cytoplasmique mais nous l'avons alors très rarement observé. Il est suivi par le centrocone qui entraîne progressivement le noyau dans le futur mérozoïte dès que ce dernier dépasse une longueur de 1,5 μm (Figs. 19-22 et Ref. 7, Fig. 3). Ce centrocone diffère légèrement de ceux observés lors des mitoses schizogoniques (8) par sa base qui apparaît formée de 2 ou 3 lames denses de 5 nm séparées par des espaces clairs de même taille (Figs. 18, 21) (7, Figs. c, e), alors qu'elle a la même structure que l'enveloppe nucléaire lors de ces mitoses. Les centrioles sont cependant toujours limités latéralement par le nucléoplasme, ouvert à l'apex, et renferme une dizaine de microtubules (Figs. 18, 21, 23) (7, Figs. c-e).

Le noyau est très étranglé au début de la pénétration (Figs. 19-23) (7, Fig. 3) puis il s'introduit massivement et occupe presque toute la largeur du futur germe dont le diamètre dépasse alors 1 μm (Figs. 30, 32). Une coupe à un stade avancé montre un même noyau engagé dans 2 mérozoïtes voisins (Fig. 30); la dernière mitose n'est donc là pas encore terminée.

L'appareil de Golgi est toujours présent au voisinage du centrocone, figuré par un dictyosome séparé de l'enveloppe nucléaire par un lit de vésicules de 50 nm. Il pénètre dans les futurs mérozoïtes avec l'apex du noyau (Figs. 23, 25) puis est retrouvé ensuite appliqué contre la face supérieure de ce dernier et peut s'étendre dans le cytoplasme sus-jacent (Figs. 30, 33, 34).

Deux ou 3 vacuoles plurimembranaires, au contenu dense et limitées par 3 ou 4 membranes unitaires irrégulièrement accolées, pénètrent dans les mérozoïtes après les futures rhoptries, en même temps que l'apex du noyau (Figs. 17, 19-23, 30). Elles sont ensuite retrouvées audessus du noyau (Fig. 34). Leur taille est relativement constante (0,3 à 0,4 μm).

Figs. 6, 7. Coupes transversales successives de l'ébauche d'un mérozoïte. Le complexe membranaire interne apparaît formé de sacules aplatis (flèches). Le conoïde, très court, est proche des centrioles et du centrocone. Le dictyosome est séparé de l'enveloppe nucléaire par un lit de vésicules (flèche courbe, Fig. 7). $\times 75,000$.

Figs. 8-10. Coupes tangentielles successives de l'ébauche d'un mérozoïte. Deux anneaux concentriques surmontent le conoïde (Fig. 8). Ce dernier est entouré par un anneau de structure périodique (flèches, Fig. 10) au-dessus duquel s'insèrent, par paires, les microtubules sous pelliculaires. Dans le conoïde sont présents deux microtubules accolés (flèches courbes, Figs. 9, 10). $\times 57,000$.

Fig. 11. Coupe tangentielle de schizonte au niveau d'un diplosome associé à une formation périodique de même structure que l'anneau observé autour du jeune conoïde (flèches), mais non circulaire. $\times 80,000$.

Fig. 12. Ebauche de mérozoïte commençant à se soulever en un dôme centré sur le conoïde. Le complexe membranaire interne s'invagine en ampoule à une extrémité (flèche). Une des futures rhoptries est présente. $\times 50,000$.

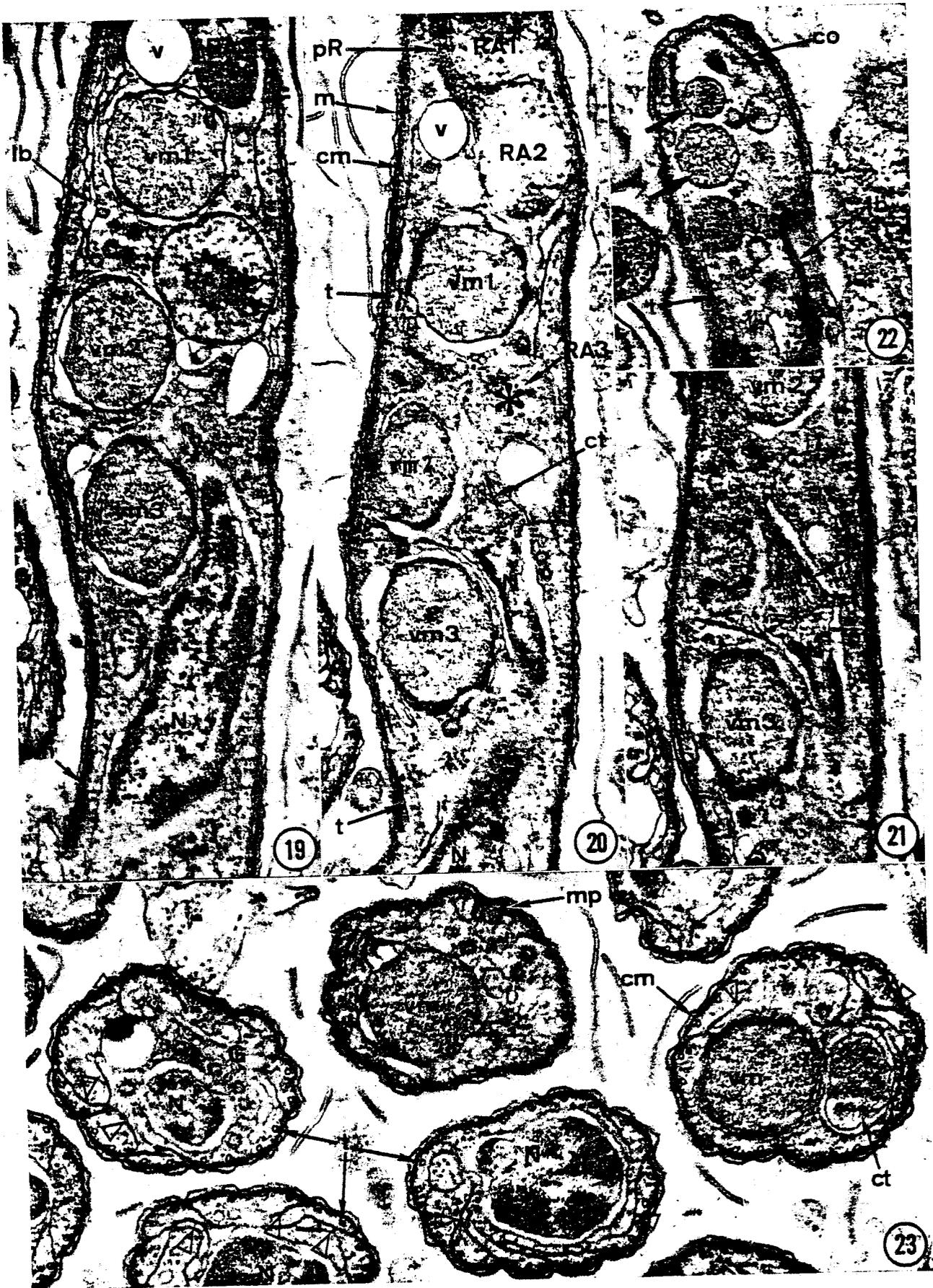


Figs. 13-16. Coupes tangentielles successives de l'ébauche d'un mérozoïte. Une bandelette dense (flèches courbes), s'étend entre la base des centrioles (c, astérisque) et l'intérieur du conoïde. Les fibres constituant ce dernier sont visibles (doubles flèches). Deux microtubules accolés s'étendent sur toute la hauteur du conoïde (flèches). $\times 66,000$.

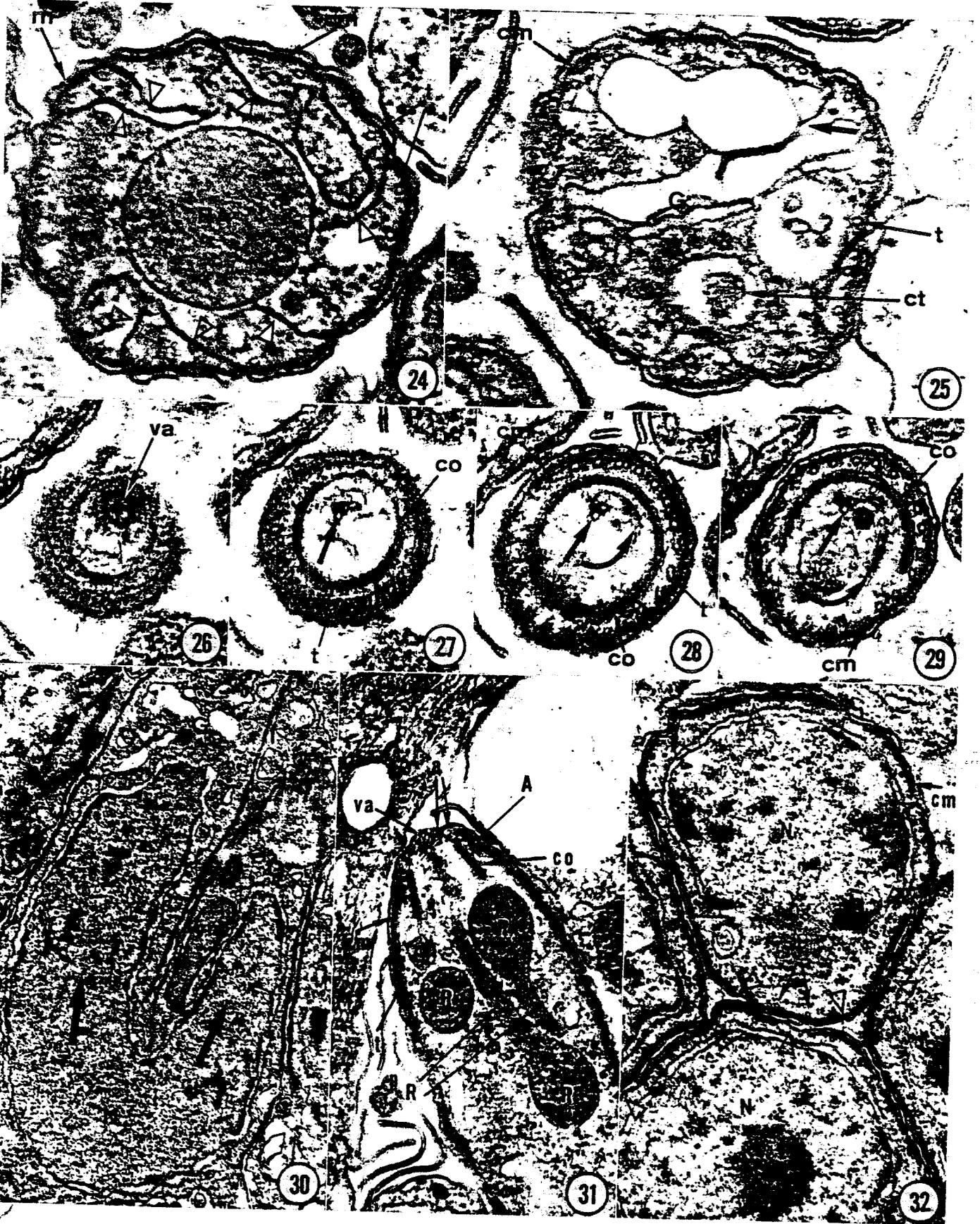
Figs. 17, 18. Coupes à 2 niveaux de l'ébauche d'un mérozoïte après le début de l'évagination. Les 3 futures rhoptries en occupent la quasi totalité. Noter la présence de lames bimembranaires contre la face interne des microtubules sous pelliculaires. Un centriole est visible à la base de l'évagination (Fig. 17). Il est entouré de vésicules à grain dense central (flèche, Fig. 17). $\times 51,000$.

Figs. 19-20. Coupes longitudinales à différents niveaux de l'ébauche d'un mérozoïte où la pénétration nucléaire a commencé. Le noyau surmonté du centrocone est très étranglé. L'une des 3 futures rhoptries émet un pédoncule vers l'apex. Auprès du conoïde sont présentes de petites vésicules denses (flèches, Fig. 22). $\times 51,000$.

Fig. 23. Coupes transversales à divers niveaux de mérozoïtes à un stade comparable au précédent (cf. Figs. 19 à 22). Noter la présence d'un micropore, et la structure du complexe membranaire interne en longues lames ondulant dans le cytoplasme (flèches). $\times 57,000$.



BUS
LILLE



Phase terminale de la différenciation.—Lorsque se termine la pénétration nucléaire dans le futur mérozoïte, vers la fin de la dernière mitose, le germe atteint une longueur de 5 μm pour un diamètre $\sim 1 \mu\text{m}$. Il continue ensuite de s'allonger et de s'épaissir. Lorsque le noyau est entièrement inclus, le centrocoène persiste momentanément (Fig. 33) (7, Fig. c). La partie postérieure du mérozoïte s'individualise; elle renferme essentiellement des mitochondries et des lames ergastoplasmiques. Puis le mérozoïte qui a atteint une taille de $11 \times 2 \mu\text{m}$ est libéré du reliquat cytoplasmique (Fig. 35).

Pendant cette phase terminale, le complexe membranaire interne acquiert sa disposition définitive: les expansions intracytoplasmiques ne sont plus observées, et les lames bimembranaires qui le constituent sont appliquées contre le plasmalemma, associées chacune à une paire de microtubules sous pelliculaires (Fig. 32).

Puis ces lames deviennent jointives, et l'on observe plus qu'une couche bimembranaire continue sous la membrane cytoplasmique du mérozoïte (Fig. 33).

Le dictyosome témoigne d'une activité importante et, au-dessus des saccules qui le constituent apparaissent 2 types de vésicules qui en semblent issues: (a) De grandes vacuoles de 0,2 à 0,5 μm au contenu hétérogène et faiblement dense, limitées par une membrane unitaire (Figs. 33-35); (b) de petites vésicules de 0,1 μm au contenu homogène et plus osmiophile que celui des précédentes, également limitées par une membrane unitaire (Fig. 33).

Cette phase terminale est surtout caractérisée par l'apparition de 2 types d'inclusions cytoplasmiques qui occuperont un volume important dans le mérozoïte mûr: les micronèmes et l'amylopectine.

Les micronèmes commencent à être observés dans la région médiane du mérozoïte à proximité des vésicules golgiennes décrites ci-dessus. Ils ont la forme de navettes denses de $\sim 200 \times 60 \text{ nm}$, de section circulaire, limitées par une membrane unitaire (Figs. 33-34). Leur nombre croît rapidement et ils se rassemblent dans le tiers antérieur du germe, qui est leur localisation définitive (Fig. 35).

L'amylopectine, absente dans le schizonte en cours de croissance, apparaît en même temps que les micronèmes sous la forme de grains clairs ovoïdes ou arrondis $\sim 0,2 \mu\text{m}$ dépourvus de membrane limitante et mis en évidence par le thiocarbohydrazide protéinate d'argent (Figs. 33, 34, 35). Ces grains s'accumulent dans la région médiane du germe (Fig. 35). Il semble que la quantité d'amylopectine, de même que celle des micronèmes puisse s'accroître encore après la séparation des mérozoïtes du reliquat cytoplasmique du schizonte.

DISCUSSION

Les modalités générales de formation des mérozoïtes chez *E. necatrix* sont caractéristiques de l'exogénèse décrite par Porchet-

Henneré (19). Le complexe membranaire interne se forme en effet à proximité immédiate de la membrane cytoplasmique dès le début de l'initiation des germes. Les ébauches de mérozoïtes apparaissent toujours à la périphérie du schizonte et nous n'avons jamais observé le découpage par invaginations du plasmalemma décrit par Hoppe chez l'espèce voisine, *Eimeria tenella* (14). Par contre, les expansions intracytoplasmiques du complexe membranaire interne présentes lors du "perlage" n'ont jamais été observées chez les autres coccidies; elles incitent à penser que, même dans l'exogénèse, ce complexe est au moins partiellement indépendant du plasmalemma. Ce type de développement exogénétique semble ici lié à la position exclusivement centrifuge des noyaux du schizonte et surtout de leurs pôles dirigés vers les centrioles toujours situés sous la membrane cytoplasmique (7, 8) et auprès desquels apparaissent les structures initiales des mérozoïtes.

Cette proximité entre les diplosomes et les futurs germes pose le problème des relations entre la dernière mitose et la différenciation. Chez les Eimeriidae à développement exogénétique, les observations à ce sujet sont jusque là limitées à l'existence d'un centrocoène à l'apex du noyau du futur mérozoïte (7, 13, 17, 18, 30, 36, 37). Chez les Toxoplasmes et organismes voisins, les résultats sont plus précis et montrent 2 cônes polaires, de structure comparable à celle des centrocoènes, pointant vers les germes fils en cours d'individualisation (35, 38, 39, 41; Dubremetz & Vivier, observations non publiées). Chez les Hémosporidies, des fuseaux de division sont observés dans des noyaux associés à l'apparition des mérozoïtes érythrocytaires (29) et des sporozoïtes (5, 15, 43). Mais c'est chez les *Eimeria* à début de développement endogénétique (4, 11, 25) et chez *E. tenella* (14) que les observations les plus nettes ont été réalisées: elles montrent un court fuseau intranucléaire accompagnant le début d'initiation des germes, et des centrocoènes ensuite. Nos résultats chez *E. necatrix* sont comparables et montrent que la différenciation des mérozoïtes peut commencer à un stade précoce de la dernière mitose schizogonique, une ébauche de germe apparaissant face à chacun des pôles nucléaires. L'initiation de ce phénomène doit suivre de peu la duplication des centrioles mais est encore mal précisée car les figures les plus précoces de l'organitogénèse sont difficilement identifiables.

Le déroulement de cette dernière mitose ne semble pas différer essentiellement de celui des précédentes. L'observation très rare du fuseau laisse penser que celui-ci disparaît rapidement et qu'ainsi les chromosomes fils sont très tôt solidaires des pôles, figurés alors par les centrocoènes (8). D'autre part, le rôle du complexe centriole-centrocoène dans l'orientation et la séparation des noyaux fils est ici encore nettement mis en évidence: les noyaux semblent entraînés par les formations polaires vers l'intérieur des germes et leur étirement au début de cette pénétration plaide en faveur de cette hypothèse.

← Fig. 24. Coupe de mérozoïte au niveau d'une future rhoptrie montrant la structure du complexe membranaire interne en lames (têtes de flèches) venant s'appliquer sous une paire de microtubules sous pelliculaires. $\times 85,000$.

Fig. 25. Coupe de mérozoïte à un stade voisin du précédent, au niveau de l'apex du centrocoène. Une lame du complexe membranaire interne vient s'accoler aux saccules golgiens (flèche). $\times 85,000$.

Figs. 26-29. Coupes successives de l'apex d'un mérozoïte au même stade que les précédents (une coupe est omise entre Figs. 27 et 28). Deux microtubules accolés sont présents dans le conoïde (flèche), de même qu'une bande dense venant se terminer à leur contact (flèches courbes Figs. 28 à 29). Entre l'apex des microtubules souspelliculaires apparaît une pièce cruciforme (petites flèches, Fig. 28). $\times 85,000$.

Fig. 30. Stade tardif de la dernière mitose: les 2 pôles du noyau pénètrent largement dans les 2 ébauches de mérozoïtes (flèches). $\times 24,000$.

Fig. 31. Coupe de l'apex d'un mérozoïte à un stade voisin de celui de la Fig. 33. Deux rhoptries émettent leur pédoncule en sens opposé. $\times 45,000$.

Fig. 32. Coupe transversale de mérozoïtes au même stade que précédemment, montrant que les lames du complexe membranaire interne sont appliquées contre le plasmalemma, et non jointives (têtes de flèches). $\times 42,000$.



Au cours de la dernière mitose se différencient progressivement les futurs mérozoïtes. La séquence d'apparition des divers organites ne peut encore être parfaitement précisée, car certains d'entre eux semblent être induits simultanément, et d'autres ont des stades précoces difficiles à caractériser. Par ailleurs, il en est qui sont issus directement du cytoplasme du schizonte. Cependant, 3 groupes de formations peuvent être distingués, qui apparaissent ou sont intégrés successivement: (a) en premier lieu le complexe membranaire interne, le conoïde, les microtubules sous-pelliculaires et les rhoptries; (b) puis les organites cytoplasmiques classiques; (c) enfin les micronèmes et l'amylopectine.

Le complexe membranaire interne des mérozoïtes d'*E. necatrix* nous est toujours apparu constitué de 2 membranes unitaires accolées, même aux stades les plus précoces de la différenciation. En outre, et cela est plus net chez les formes immatures, les interruptions de ce complexe montrent un retournement et une continuité des 2 membranes constitutives, ce qui permet d'assimiler ces formations à des vésicules aplaties, à la lumière presque totalement collapsée. Cette interprétation semble être valable chez tous les Sporozoaires (48). Les modalités de genèse du complexe membranaire interne des germes infectieux de ces Protozoaires sont mal connues. Chez *Toxoplasma* (46), il a, dans certains cas, pour origine l'infléchissement dans le cytoplasme du complexe homologue de la cellule mère. Lors des exogénèses, le complexe membranaire interne est une néoformation car il n'existe pas dans le schizonte immature; et la plupart des auteurs n'ont alors observé aux stades précoces qu'un épaississement dense plus ou moins bien résolu (19). Seul Premsier (21) a pu montrer qu'au cours de la sporogénèse chez la grégarine *Diplauxis hatti*, cette formation a pour origine l'aplatissement d'une lame ergastoplasmique contre le plasmaleme, et que son développement se poursuit par adjonction de vésicules issues de l'appareil de Golgi. Il en serait peut-être de même au cours de la schizogonie chez la Coccidie *Aggregata* (20). Chez *E. necatrix* nos images montrent que, dès l'origine, le complexe membranaire interne peut être issu de l'aplatissement de saccules. Cependant, s'il existe généralement une lame ergastoplasmique parallèle à la surface du schizonte immature, elle semble être étrangère à la naissance du jeune complexe membranaire interne avec lequel elle n'est jamais en contact. Dans les jeunes mérozoïtes en cours d'évagination, le complexe interne est sous la forme de lames bimembranaires dont une partie longe le plasmaleme. Certaines images montrent un accollement ou une convergence du bord libre de ces lames vers les saccules du dictyosome. Ce phénomène n'avait jamais été décrit chez les Coccidies; il peut cependant être rapproché des observations de Roberts et al. (25) qui montrent, chez *Eimeria callospermophili*, un complexe membranaire interne nouvellement formé discontinu, constitué de petites écailles associées chacune à une paire de microtubules sous pelliculaires, et signalent en outre la présence à proximité de vésicules issues du Golgi. Il semble que, chez *E. necatrix*, le complexe membranaire interne des mérozoïtes puisse se développer, dès l'origine, par fusion et aplatissement de vésicules issues du dictyosome suivant un processus comparable à celui montré chez *Diplauxis* (21), mais

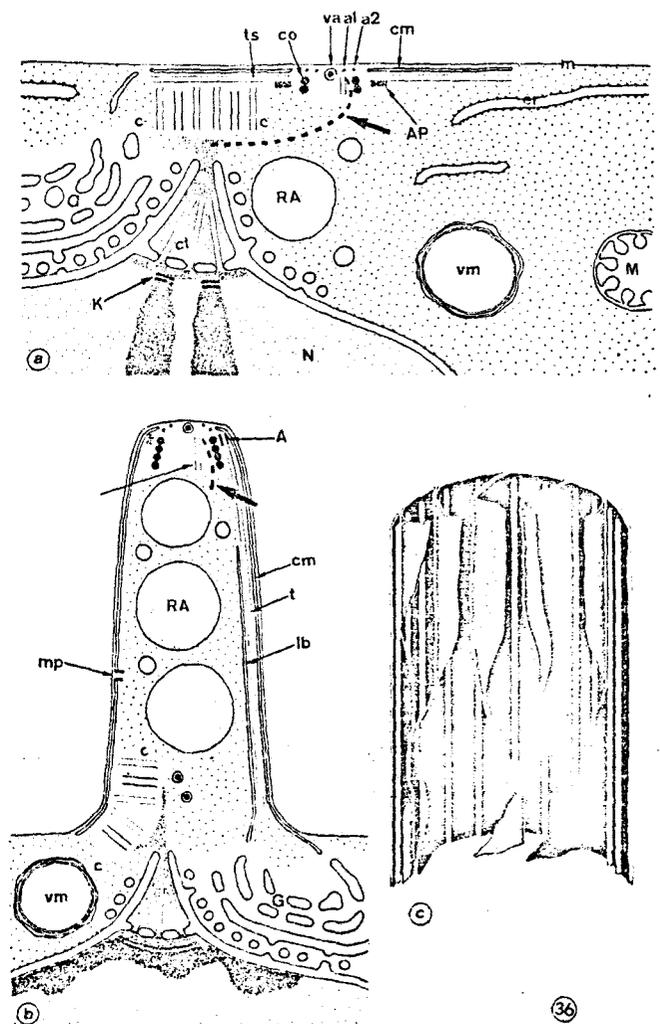


Fig. 36. [Diagrammes schématiques.] a. Apparition des ébauches du mérozoïte auprès du pôle d'un noyau et contre la membrane plasmique du schizonte. La formation dense qui joint la base des centrioles au conoïde n'est pas dans le plan du schéma et est représentée par un trait discontinu (flèche épaisse). Anneaux apicaux, al et a2; chromatine, ch; cinétochore, K; microtubules sous-pelliculaires, ts. b. Debut du "perlage" d'un mérozoïte, avant la pénétration nucléaire. Dans le conoïde, comme à la figure précédente, sont présents 2 microtubules accolés (flèche fine). c. La disposition des feuillettes du complexe membranaire interne du mérozoïte en cours d'évagination dont une partie est glissée entre le plasmaleme et une paire de microtubules sous-pelliculaires et dont l'extrémité libre ondule dans le cytoplasme.

sans intervention de l'ergastoplasme (Fig. 36). D'autre part, la synthèse des lames bimembranaires paraît plus rapide que l'accroissement de surface du futur germe, ces formations étant ultérieurement entièrement appliquées contre le plasmaleme.

Les micropores qui sont souvent présents sur les images de genèse des germes infectieux de Sporozoaires (19, 31) ont été

Fig. 33. Coupe oblique de mérozoïte à un stade proche de la libération, passant par l'apex du noyau et le dictyosome. Deux types de vésicules (têtes de flèches et astérisques) semblent issus du Golgi. Les micronèmes et les grains d'amylopectine apparaissent. $\times 45,000$.

Fig. 34. Vue partielle de schizonte lors de la libération des mérozoïtes (*, vacuoles semblant issues de Golgi). $\times 26,000$.

Fig. 35. Mise en évidence de l'amylopectine par la réaction de Thiéry (45) dans les mérozoïtes libérés du reliquat cytoplasmique (*, vacuoles semblant issues du Golgi). $\times 20,000$.

observés sous leur forme classique dès le début de l'évagination des mérozoïtes. Bien que de telles structures préexistent dans les ébauches; Senaud & Cerna (36, 37) pensent qu'à ce niveau la paroi différencie de nouveaux micropores, mais aucune image de leur genèse n'a été jusqu'à présent obtenue. La fréquente observation, chez *E. necatrix*, d'une invagination en ampoule du bord distal du complexe membranaire interne à des stades très précoces nous incite à interpréter cette formation comme le précurseur d'un micropore, qui pourrait en dériver par disparition de l'ampoule et persistance du col.

Les microtubules sous pelliculaires ont été décrits chez tous les germes infectieux des Sporozoaires, souvent au nombre d'une vingtaine (21). Leur apparition semble toujours coïncider avec celle du complexe membranaire interne (19). C'est également le cas chez *E. necatrix*; l'association étroite entre chaque paire de microtubules et une lame bimembranaire n'avait été observée antérieurement que chez *E. callospermophili* (25) et il est possible que le squelette microtubulaire serve de support dans la mise en place de ces membranes. Cela viendrait partiellement expliquer la juxtaposition constante de ces 2 types de formations quel que soit le mode de genèse des germes infectieux (19). Nos résultats montrent d'autre part que la naissance des microtubules sous-pelliculaires chez *E. necatrix* est associée à un anneau discontinu de structure périodique constitué de 11 unités correspondant aux 11 paires de microtubules. Aucun travail antérieur ne signale une telle formation dont dérive sans doute l'anneau d'insertion habituellement décrit chez les stades plus tardifs de différenciation et chez les germes infectieux des Sporozoaires, et dans lequel sont fichés les microtubules sous pelliculaires (21). Cet anneau périodique qui paraît s'organiser autour du diplosome avant l'apparition de toute autre néoformation pourrait ainsi être induit par les centrioles et être ensuite à l'origine de l'agencement et du développement du système microtubulaire dont il possède la symétrie.

Au début de la différenciation des mérozoïtes d'*Aggregata*, Porchet-Henneré & Richard (20) observent la convergence de microtubules autour d'un centriole et supposent que cet organite pourrait être responsable de leur genèse. Chez *E. necatrix*, il semble que le diplosome induise une matrice nématopoiétique (9) (cet anneau) à partir de laquelle se polymériseraient les microtubules sous pelliculaires.

Le conoïde, organite présent chez la plupart des germes infectieux de Sporozoaires excepté les Hémosporidies et les Piroplasmies (21, 32) a une structure caractéristique relativement bien connue quoiqu'incomplètement définie (45). Sa genèse a, par contre, rarement été observée avec précision, bien que de nombreux travaux montrent qu'il apparaît à proximité du centriole ou du centrocone quand ceux-ci sont décrits (19). Senaud & Černá (37) envisagent les premiers la possibilité d'un rapport entre centriole et conoïde. Cette hypothèse est souvent évoquée par la suite, et, plus récemment, par Heller (12), qui affirme que le conoïde des mérozoïtes d'*Eimeria stiedai* est formé de 18 fibres et est induit par le centriole. Nous n'avons pu, bien que le chiffre de 18 soit possible, définir exactement le nombre de fibres constituant le conoïde d'*E. necatrix* (6). Par contre nous avons pu observer que, dès l'origine, cet organite possède son diamètre apical définitif et est formé de fibres, mais que sa hauteur initiale est très réduite et croît ensuite pendant l'individualisation des mérozoïtes. Le problème se pose de savoir si le conoïde court renferme déjà tous les éléments des fibres constitutives qui s'allongent ensuite en spirale, ou s'il est élaboré progressivement par intercalation successive de fibres de longueur définitive. Nous avons pu, en

outre, déceler une relation matérielle entre le conoïde nouvellement formé et la base du diplosome (ou l'apex du centrocone), représentée par une bandelette dense venant se terminer à l'intérieur de l'organite apical (Fig. 36). Une telle formation n'a jamais été décrite antérieurement chez les Sporozoaires. Porchet-Henneré & Richard (20) montrent chez les mérozoïtes d'*Aggregata* un élément dense strié émanant de la région du conoïde et se perdant dans le cytoplasme qui est peut-être homologue de ce que nous décrivons ici, mais sans relation apparente avec les centrioles. Cette bandelette dense, chez *E. necatrix*, pourrait représenter le matériel à partir duquel s'élaborent les fibres du conoïde, qui se synthétiseraient au niveau de la base du diplosome. Cependant, il n'apparaît pas de contact immédiat entre cette formation et la paroi de l'organite, sauf peut-être au stade initial, et les modalités exactes du développement du conoïde restent à préciser. Il serait ainsi possible que le centriole n'induisse qu'un "germe" capable ensuite de se développer de manière indépendante, hypothèse émise par Hammond & Danforth (10) à propos d'*Eimeria magna* et la bandelette dense que nous observons pourrait être un reliquat de cette intervention précoce (mais aussi avoir une toute autre signification).

Certains structures associées au conoïde peuvent être distinguées, parfois très tôt, chez *E. necatrix*, et ont déjà été décrites chez d'autres Sporozoaires. C'est le cas des 2 anneaux apicaux ("préconoïdal rings") (32), anneaux denses superposés surmontant le conoïde, et qui pourraient n'être que des arrangements circulaires de granules (47). Au cours de la genèse des mérozoïtes, il semble que ces 2 formations soient d'abord concentriques et qu'ensuite le cercle intérieur s'accroisse pour former l'anneau le plus antérieur. Une vésicule de 60 nm, au centre généralement occupé par un grain dense, est souvent présente entre les anneaux précités, parfois dès l'initiation. Une telle vésicule apicale existe chez de nombreuses Coccidies (2, 12, 25, 33, 40). Nous ne connaissons rien de son rôle, mais elle pourrait provenir d'une activité centriolaire car on observe fréquemment des vésicules similaires auprès du diplosome (Fig. 17). Une 3ème formation associée au conoïde est représentée par 2 microtubules accolés s'étendant parallèlement à l'axe de l'organite sur toute sa hauteur (Fig. 36). Ceux-ci pourraient correspondre aux baguettes axiales observées en coloration négative dans le conoïde de certaines *Eimeria* (6, 24, 26), de *Toxoplasma* (47), de *Sarcocystis* (Porchet-Henneré, communication personnelle) et également aux fibres denses présentes entre les pédoncules des rhoptries chez diverses Coccidies (3, 6, 37, 40). Nous ne savons rien de la signification de cette paire de microtubules, mais il faut remarquer que la bandelette dense reliant la base des centrioles à l'intérieur du conoïde se termine généralement au contact de leur extrémité et que des rapports fonctionnels existent peut-être entre ces 2 formations.

Les rhoptries, présentes chez tous les germes infectieux des Sporozoaires (21) ont une origine mal connue. Elles semblent dériver de vésicules denses apparaissant dans la région antérieure et se pédiculisant ensuite vers l'apex (19). Seul, Heller (12) pense que chez *E. stiedai*, elles se développent à partir de l'intérieur du conoïde vers le cytoplasme. Prensier (23) suggère une origine golgienne pour ces organites et Vivier & Petitprez évoquent également une telle hypothèse (47, 49, 50). Nos observations sur *E. necatrix* montrent que les vésicules denses préfigurant les rhoptries apparaissent dès les stades précoces de l'initiation des mérozoïtes à proximité du centrocone, c'est-à-dire auprès du dictyosome. Une origine golgienne peut ainsi être suggérée pour ces organites mais les modalités de leur genèse restent à préciser car nous n'avons pas observé de stade

antérieur à une grosse vésicule de 0,4 à 0,5 μm . L'évolution du contenu des rhoptries d'abord uniforme, puis hétérogène et se condensant par place pour devenir enfin homogène et très osmiophile leur fait présenter divers aspects déjà observés par ailleurs (31, 47) et qui étaient déjà considérés comme appartenant à des stades différents de leur genèse. Cette évolution vers la condensation est ici très nette. Les rhoptries sont généralement décrites au nombre de deux chez les *Eimeria* et *Plasmodium* (31); le fait d'observer habituellement, chez le mérozoïte immature, 3 vésicules nous incite à penser qu'elles pourraient toutes se pédiculiser et persister ainsi dans le germe mûr, dans lequel elles sont plus difficiles à dénombrer.

L'appareil de Golgi, associé aux pôles du noyau pendant les divisions nucléaires (8) pourrait se dédoubler lors de la mitose, comme cela est suggéré par Sheffield & Melton (41) et apparaît chez certaines *Eimeria* (4, 16, 28). L'intégration du dictyosome dans les mérozoïtes pourrait ainsi être une conséquence de sa dépendance envers l'apex du noyau. Le rôle du Golgi dans la genèse de certains organites (rhoptries, micronèmes, complexe membranaire interne) est probablement important, mais reste à préciser.

Les vacuoles plurimembranaires ("Golgi adjunct") (41), maintes fois observées chez les Sporozoaires et à l'origine très discutée (1, 19, 21, 41, 48, 47, 49, 50) préexistent dans le schizonte immature d'*E. necatrix*. Nous ne savons pas si elles se multiplient au cours des mitoses; elles ne semblent généralement pas situées à proximité des noyaux avant le début de la différenciation des mérozoïtes. Elles pénètrent après les futures rhoptries (Fig. 37), souvent au nombre de 3, mais nous ne savons pas si elles proviennent de la division d'une formation unique, ou si elles préexistent et sont attirées au voisinage du centrocone lors de l'initiation. Une meilleure connaissance de la nature et du rôle de ces vacuoles est nécessaire pour mieux comprendre leur comportement. Le fait qu'elles soient intégrées dans les mérozoïtes nous les font considérer comme des organites indispensables et non comme le résidu d'évolution d'une structure préexistante.

Les micronèmes, qui existent en abondance dans les germes infectieux de nombreux Coccidiomorphes (21, 31) ont parfois été confondus chez certaines espèces avec les rhoptries (47). Certains auteurs suggèrent une relation fonctionnelle entre ces 2 types d'organites (31), et Heller leur attribue, chez *E. stiedai*, une origine commune à partir de l'allongement d'une formation unique apparaissant très tôt à l'intérieur du conoïde (12). Ce n'est pas le cas chez *E. necatrix* où la genèse des rhoptries précède de beaucoup celle des micronèmes, qui semblent plutôt issus de la transformation de petites vésicules denses naissant au niveau du dictyosome et qui pourraient s'allonger et migrer vers l'apex de la cellule (Fig. 37). La vérification de cette hypothèse nécessiterait une étude dynamique du phénomène, qui ne peut être réalisée par la simple observation ultrastructurale.

L'amylopectine (27) est présente chez tous les germes infectieux de Sporozoaires, sauf les Hémosporidies et les Piroplasmes (21). Son apparition, comme celle des micronèmes, est pourtant rarement signalée dans les études concernant la genèse des mérozoïtes. Porchet-Henneré & Richard (20) observent de petits granules polysaccharidiques accolés aux mitochondries dans les schizontes immatures d'*Aggregata* et supposent qu'il pourrait s'agir de grains de amylopectine en formation. Ces auteurs remarquent en outre que le germe infectieux ne reçoit pas cette réserve du schizonte, mais doit la synthétiser lui-même. Il semble en être ainsi également chez *E. necatrix*, mais nous n'avons pas observé la relation

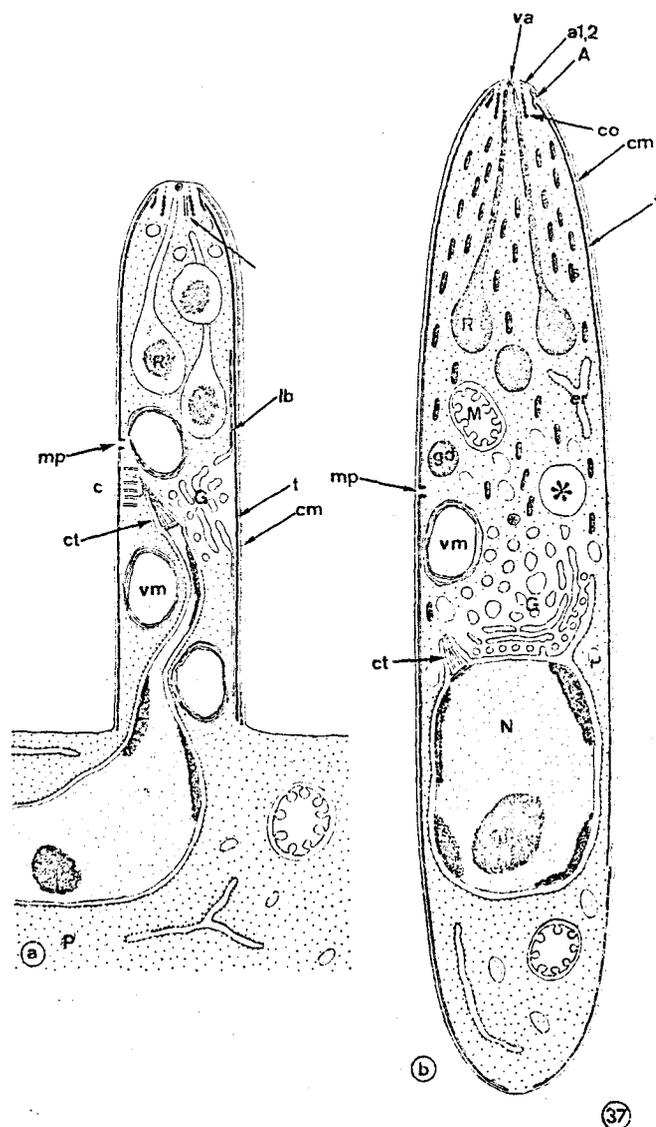


Fig. 37. a. Ebauche de mérozoïte lors de la pénétration nucléaire (la dernière mitose n'est pas terminée). Les rhoptries forment leur pédoncule. b. Mérozoïte venant d'être libéré par pincement postérieur. Au niveau du dictyosome sont présentes de petites vésicules à contenu osmiophile (petit *) dont dérivent peut-être les micronèmes, et quelques vésicules de plus grande taille (grand *). Le centrocone est encore présent à l'apex du noyau.

avec les mitochondries chez cette Coccidie. Le mode d'élaboration des grains de amylopectine n'a pu être déterminé; Il n'est d'ailleurs pas mieux élucidé dans les autres stades du cycle des Sporozoaires, et leur synthèse attribuée avec aucun organe cytoplasmique (34).

REFERENCES

1. Aikawa M. 1971. *Plasmodium*: the fine structure of malarial parasites. *Exp. Parasit.* 30, 284-320.
2. Andreassen, J. & Behnke, O. 1968. Fine structure of merozoites of a rat coccidian *Eimeria miyairii* with a comparison of the fine structure of other Sporozoa. *J. Parasit.* 54, 150-63.
3. Colley, F. C. 1968. Fine structure of schizont and merozoites of *Eimeria nieschulzi*. *J. Protozool.* 15, 374-82.
4. Danforth, H. D. & Hammond, D. M. 1972. Stages of merogony in multinucleate merozoites of *Eimeria magna* Pérard 1925. *J. Protozool.* 19, 454-7.

5. Desser, S. S. 1972. The fine structure of *Leucocytozoon simondi*. V. The Oocyst. *Can. J. Zool.* **50**, 707-12.
6. Dubremetz, J. F. 1971. Le conoïde et les microtubules sous pelliculaires du mérozoïte d'*Eimeria necatrix* (Sporozoaire, Coccidiomorphe). Etude au microscope électronique. *C. R. Acad. Sci. Paris, ser. D* **272**, 600-3.
7. ——— 1971. L'ultrastructure du centriole et du centrocyône chez la Coccidie *Eimeria necatrix*; étude au cours de la schizogonie. *J. Micros.* **12**, 453-8.
8. ——— 1973. Etude ultrastructurale de la mitose schizogonique chez la coccidie *Eimeria necatrix* (Johnson 1930). *J. Ultrastruct. Res.* **42**, 354-76.
9. Faure-Fremiet, E. 1970. Microtubules et mécanismes morphopoiétiques. *Ann. Biol.* **9**, 1-61.
10. Hammond, D. M. & Danforth, H. D. 1973. Abnormal development of conoids in *Eimeria magna*. *J. Parasit.* **59**, 585-6.
11. ———, Roberts, W. L., Youssef, N. N. & Danforth, H. D. 1973. Fine structure of the intranuclear spindle pole in *Eimeria callospermophili* and *Eimeria magna*. *J. Parasit.* **59**, 581-3.
12. Heller, G. 1972. Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Bildung und Struktur von Conoid. Rhoptrien und Mikronemen bei *Eimeria stiedae* (Sporozoa-Coccidia). *Protistologica* **8**, 43-51.
13. ——— & Scholtyseck, E. 1971. Feinstrukturuntersuchungen zur Merozoitenbildung bei *Eimeria stiedae* (Sporozoa, Coccidia). *Protistologica* **7**, 451-60.
14. Hoppe, G. 1973. Elektronen-mikroskopische Untersuchungen an Entwicklungsstadien von *Eimeria tenella* (Railliet und Lucet, 1891) bei Hühnerküken. Inaugural-dissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Universität Bonn.
15. Howells, R. E. & Davies, E. E. 1971. Nuclear division in the oocyst of *Plasmodium berghei*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* **65**, 451-60.
16. Kelley, G. L. & Hammond, D. M. 1972. Fine structural aspects of early development of *Eimeria ninakohlyakimovae* in cultured cells. *Z. Parasitenk.* **38**, 271-84.
17. Mehlhorn, H., Senaud, J. & Scholtyseck, E. 1972. Sur l'ultrastructure des organites liés à la division nucléaire chez les Coccidies *Eimeria falciformis* (EIMER 1870) et *Eimeria maxima* (TYZZER 1929) au cours de la schizogonie et de la microgamétogénèse. *C. R. Acad. Sci. Paris, ser. D* **275**, 835-7.
18. ——— & ——— 1973. La schizogonie chez *Eimeria falciformis* (EIMER 1870) Coccidie Eimeriidae parasite de l'épithélium intestinal de la souris (*Mus musculus*). Etude au microscope électronique des mérozoïtes et de leur développement au cours d'infections expérimentales. *Protistologica* **9**, 269-91.
19. Porchet-Henneré, E. 1972. Considérations générales sur les processus de schizogonie chez les Sporozoaires à la lumière des données de la microscopie électronique. *Ann. Biol.* **11**, 413-26.
20. ——— & Richard, A. 1971. La schizogonie chez *Aggregata eberthi*. Etude en microscopie électronique. *Protistologica* **7**, 227-60.
21. ——— & Vivier, E. 1971. Ultrastructure comparée des germes infectieux (sporozoïtes, mérozoïtes, schizozoïtes, endozoïtes, etc. . .) chez les Sporozoaires. *Ann. Biol.* **10**, 77-114.
22. Prensier, G. 1970. Structure de la paroi du sporoblaste et origine du complexe membranaire interne du sporozoïte de *Diplauxis hatti* (Grégarine monocystidée) démontrées par la microscopie électronique. *C. R. Acad. Sci. Paris, ser. D* **271**, 2329-31.
23. ——— 1971. Contribution à l'étude ultrastructurale des différents stades du cycle de *Diplauxis hatti* (Grégarine monocystidée) parasite de *Peromyscus cultrifera* GRUBE. Thèse de 3e cycle, Université de Lille.
24. Roberts, W. L. & Hammond, D. M. 1970. Ultrastructural and cytologic studies of the sporozoites of four *Eimeria* species. *J. Protozool.* **17**, 76-86.
25. ———, ———, Anderson, L. C. & Speer, C. A. 1970. Ultrastructural study of schizogony in *Eimeria callospermophili*. *J. Protozool.* **17**, 584-92.
26. Ryley, J. F. 1969. Ultrastructural studies on the sporozoite of *Eimeria tenella*. *Parasitology* **59**, 67-72.
27. ———, Bentley, M., Manners, D. J. & Stark, J. R. 1969. Amylopectin, the storage polysaccharide of the Coccidia *Eimeria brunetti* and *E. tenella*. *J. Parasit.* **55**, 839-45.
28. Sampson, J. R. & Hammond, D. M. 1972. Fine structural aspect of development of *Eimeria alabamensis* schizonts in cell cultures. *J. Parasit.* **58**, 311-22.
29. Scalzi, H. A. & Bahr, G. F. 1968. An electron microscope examination of erythrocytic stages of two rodent malarial parasites, *Plasmodium chabaudii* and *P. vinckei*. *J. Ultrastruct. Res.* **24**, 116-33.
30. Schmidt, K., Johnston, M. R. L. & Stehbens, W. E. 1967. Fine structure of the schizont and merozoite of *Isospora* sp. (Sporozoa: Eimeriidae) parasitic in *Gehyra variegata* (Dumeril and Bibron, 1836) (Reptilia: Gekkonidae). *J. Protozool.* **14**, 602-8.
31. Scholtyseck, E. & Mehlhorn, H. 1970. Ultrastructural study of characteristic organelles (paired organelles, micronemes, micropores) of Sporozoa and related organisms. *Z. Parasitenk.* **34**, 97-127.
32. ———, ——— & Friedhoff, K. 1970. The fine structure of the conoid of Sporozoa and related organisms. *Z. Parasitenk.* **34**, 68-94.
33. ——— & Pickarski, G. 1965. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Merozoiten von Eimerien (*Eimeria perforans*, *E. stiedae*) & *Toxoplasma gondii*. *Z. Parasitenk.* **26**, 91-115.
34. Schrével, J. 1971. Les polysaccharides de réserve chez les Sporozoaires. *Ann. Biol.* **10**, 31-52.
35. Senaud, J. 1967. Contribution à l'étude des Sarcosporidies et des Toxoplasmes. *Protistologica* **3**, 167-232.
36. ——— & Černá, Z. 1968. Etude en microscopie électronique des mérozoïtes et de la mérogonie chez *Eimeria fragensis* (Černá et Senaud, 1968), Coccidie parasite de l'intestin de la souris (*Mus musculus*). *Ann. Sta. Biol. Besse en Chandesse* **3**, 221-41.
37. ——— & ——— 1969. Etude ultrastructurale des mérozoïtes et de la schizogonie des Coccidies (*Eimeriina*): *Eimeria magna* (Perard 1925) de l'intestin des lapins et *E. tenella* (Railliet et Lucet, 1891) des coccums des poulets. *J. Protozool.* **16**, 155-65.
38. Sheffield, H. G. 1966. Electron microscope study of the proliferation form of *Besnoitia jellisoni*. *J. Parasit.* **52**, 583-94.
39. ——— 1970. Schizogony in *Toxoplasma gondii*: an electron microscope study. *Proc. Helm. Soc. Wash.* **37**, 237-42.
40. ——— & Hammond, D. M. 1966. Fine structure of first generation merozoites of *Eimeria bovis*. *J. Parasit.* **52**, 593-606.
41. ——— & Melton, M. L. 1968. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasit.* **54**, 209-26.
42. Terzakis, J. A. 1968. Uranyl acetate, a stain and a fixative. *J. Ultrastruct. Res.* **22**, 168-84.
43. ——— 1971. Transformation of the *Plasmodium cynomolgi* oocyst. *J. Protozool.* **18**, 62-72.
44. Thiery, J. P. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes ultrafines en microscopie électronique. *J. Micros.* **6**, 987-1018.
45. Vivier, E. 1972. Examen critique de quelques problèmes relatifs à la morphologie du conoïde. Etude sur *Toxoplasma*. *J. Protozool.* **19**, (Suppl.), 74.
46. ——— & Petitprez, A. 1969. Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus fils chez *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Biol.* **43**, 329-42.
47. ——— & ——— 1972. Données ultrastructurales complémentaires morphologiques et cytochimiques sur *Toxoplasma gondii*. *Protistologica* **8**, 199-222.
48. ———, Devauchelle, G., Petitprez, A., Porchet-Henneré, E., Prensier, G., Schrével, J. & Vinckier, D. 1970. Observations de cytologie comparée chez les Sporozoaires. I. Les structures superficielles chez les formes végétatives. *Protistologica* **6**, 127-47.
49. ———, Petitprez, A. & Landau, I. 1973. Observations ultrastructurales sur la sporoblastogénèse de l'Hémogrégarine *Hepatozoon domerguei*, Coccidie Adeleidea. *Protistologica* **8**, 315-33.
50. ——— & Ponchel, G. 1974. Multiplication nucléaire et schizogonie chez *Anthemiosoma* (Piroplasma). Etude à l'aide de la microscopie électronique et des coupes sériées. *Protistologica*, sous presse.

Ultrastructural Study of Schizogony of *Eimeria bovis* in Cell Cultures*

JEAN F. DUBREMETZ† and YOKO Y. ELSNER‡

†Laboratoire de Biologie Animale, Université de Lille I, BP 36, 59650, and ‡Veterinary Science Department, Utah State University, Logan, Utah 84322, USA

SYNOPSIS. First-generation schizogony of *Eimeria bovis* in bovine cell culture was studied by electron microscopy. The intracellular sporozoite retained its structure for at least 6 days at which time it rounded up and lost its apical complex. Although the refractile body underwent certain morphologic changes, it was retained throughout the parasite's growth. The beginning of mitosis was marked by the formation of a cytoplasmic funnel which traversed the nucleus opening on each side toward a pair of centrioles. Subsequently, there developed an intranuclear spindle. Separation of the daughter nuclei was preceded by the formation of typical centrocones. Differentiation of merozoites was accomplished by exogenesis during the last mitotic division. A dense fiber, interpreted as a link connecting the merozoite anlage with its nucleus, extended from the developing apical complex to the nearest division pole. In the anlage, the inner membrane complex was at first composed of patches associated with pairs of subpellicular microtubules. Rhoptries appeared early in merogenesis, whereas micronemes formed at the time the merozoites detached from the residuum. The level of amylopectin, low in schizonts, rose at the beginning of merozoite formation.

Index Key Words: *Eimeria bovis*; schizogony, merogenesis; fine structure.

EIMERIA bovis (Züblin) was one of the first mammalian coccidia to be studied by electron microscopy (30, 31). Since then, much information about coccidian ultrastructure has been accumulated. Furthermore, *in vitro* cultivation of coccidia has been extended to a large number of species, *E. bovis* being one of the first grown successfully *in vitro* (8, 14). This species has a large first-generation schizont, providing material of choice for studies of mitosis and merogenesis. It was used by us for analyzing, at the fine structural level, the events occurring in the course of schizogony and merogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Freshly sporulated oocysts of *Eimeria bovis* used in this study were kindly provided by Drs. M. Miner and J. B. Jensen. *In vitro* cultivation methods were as described previously (8). The vertebrate cells used were Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) and Embryonic Bovine Trachea (EBTr) grown in monolayers on plastic coverslips (Thermanox, Lux Corporation) in Leighton tubes. Each tube received 150,000 sporozoites. Coverslips were removed daily between days 6 and 18, and the cells fixed *in situ* for 3 h in 0.1 M phosphate-buffered 2.5% (v/v) glutaraldehyde. They were washed 3 times in 0.1 M phosphate buffer and postfixed for 2 h in 2% (w/v) OsO₄ in the same buffer. The material was dehydrated through a series of ethanols and propylene oxide. It was then stained overnight "en bloc" in 0.5% (w/v) uranyl acetate and 0.5% (w/v) phosphotungstic acid in 70% ethanol, and flat-embedded in Epon. Selected parasitized cells, identified by phase-contrast microscopy, were stamped out, glued on Epon blocks, and sectioned with a diamond knife on a Reichert OMU 2 ultramicrotome. After lead citrate staining, thin sections were examined in a Hitachi HU IIE electron microscope.

RESULTS

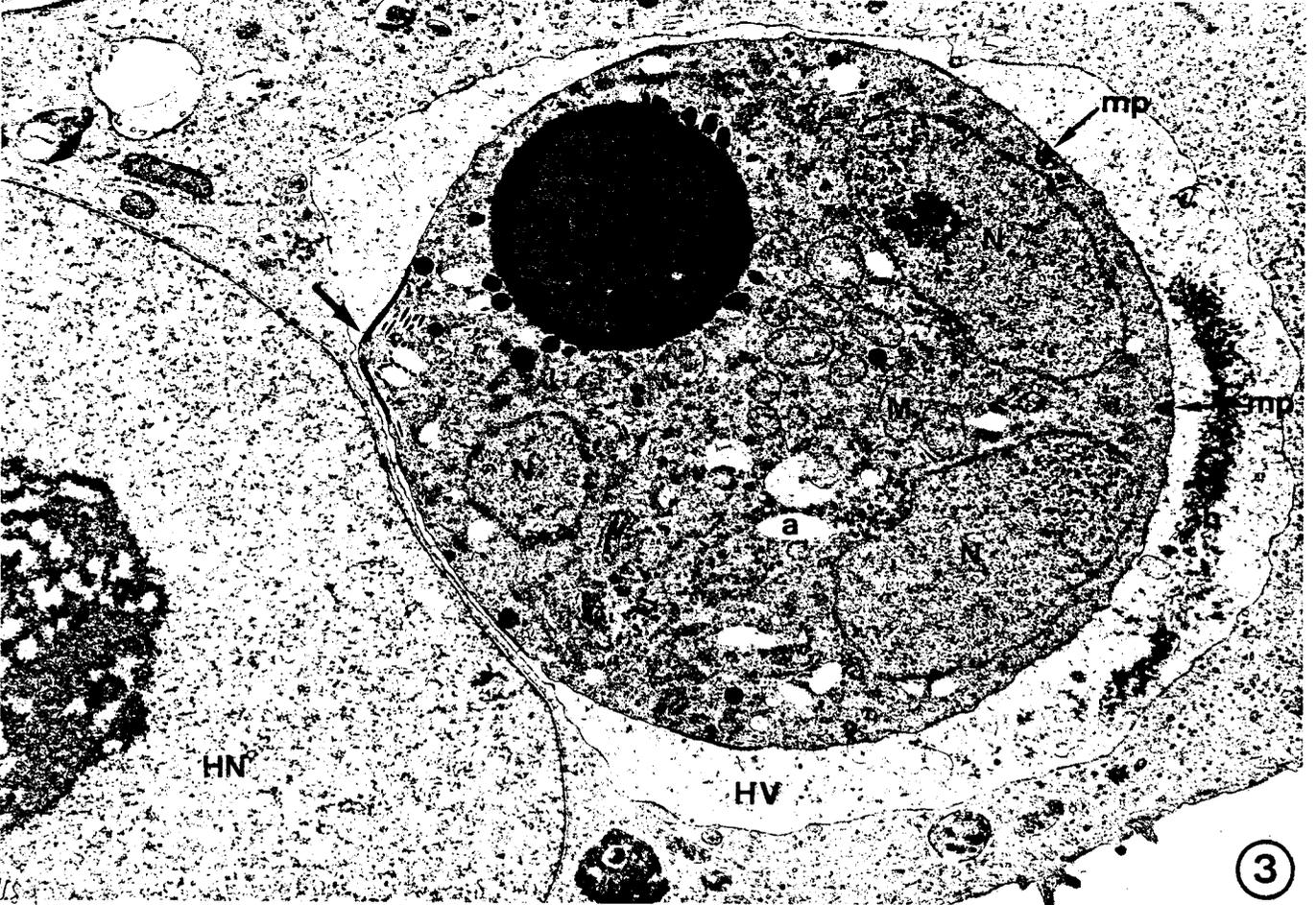
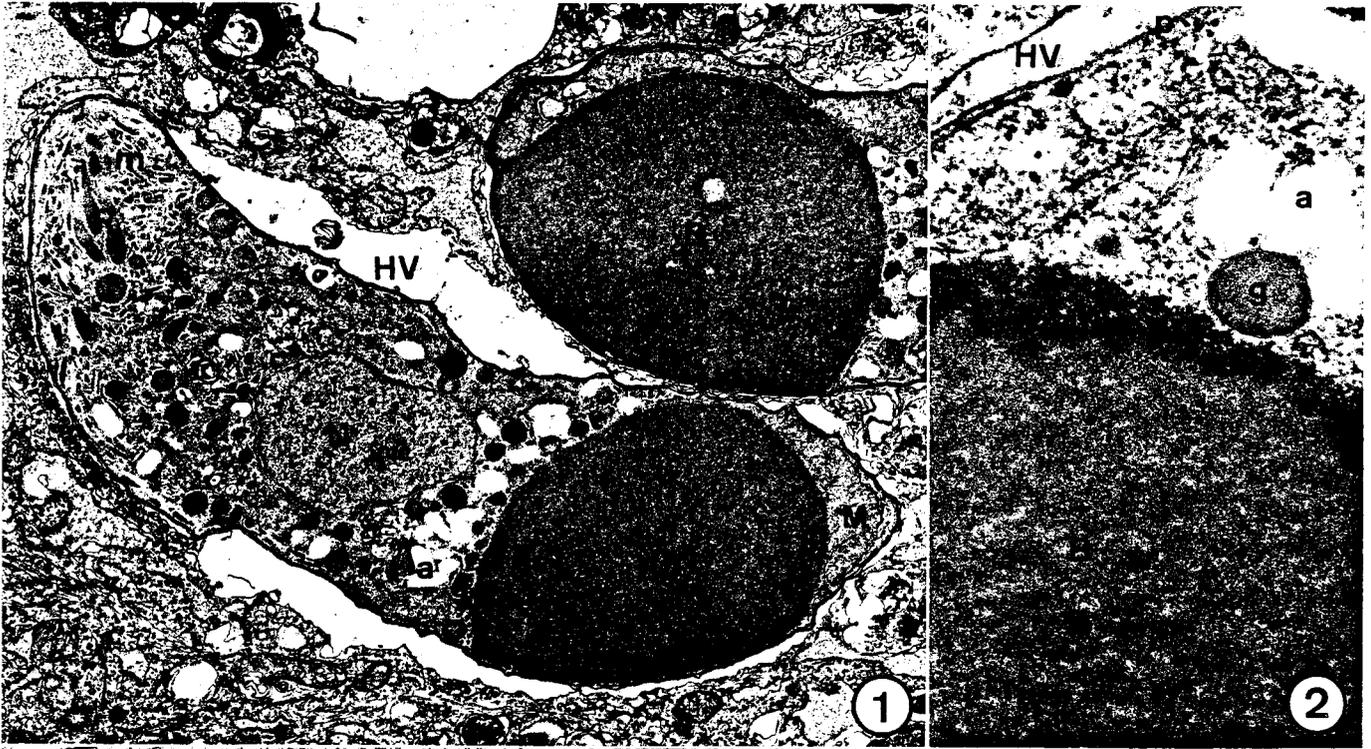
Sporozoite to Schizont Transformation.—Intracellular sporozoites retained their shape and typical organelles at least 6 days after entering the cells (Fig. 1). They usually had one prominent posterior refractile body surrounded by dense granules and amylopectin (Fig. 1). On day 8, small multinucleate schizonts were observed. Some of them still contained remnants of the apical part of the sporozoite, usually represented

by a few micronemes situated under the residual apical complex (Fig. 3). The schizont was surrounded by a unit membrane, still covered in some places by parts of the inner complex of the sporozoite pellicle (Figs. 2, 3). The posterior refractile body persisted, often having a denser layer at the periphery; it was surrounded by membrane-bounded dense granules (Figs. 2, 3).

Mitosis.—The earliest stages observed were nuclei with an eccentric cylindrical funnel opened on both sides toward centrioles and filled with a fibrillar material (Fig. 4). The nuclear envelope was intact and continuous with the walls of the funnel. A section through the centrioles at that stage contained 2 typical eimerian centrioles, each with a dense small companion, a putative pro-centriole (Fig. 5). The next step in mitosis was characterized by an intranuclear strip of fibrillar material joining 2 conical caps made of the invaginated nuclear envelope (Fig. 6), each of which opened toward a pair of centrioles (Fig. 7). Subsequently an intranuclear microtubular spindle was observed between the 2 caps which became separated by a progressively larger space (Fig. 8). Dense 3-layered structures of ~70 × 30 nm were situated in the middle part of the spindle (Figs. 8, 9). As in other species of *Eimeria*, they have been interpreted as kinetochores (Fig. 3). The intact nuclear envelope was open and invaginated at the 2 polar caps (Fig. 8). Subsequently the nucleus elongated, becoming crescent-shaped; the spindle bent, probably dividing into 2 half spindles (Fig. 10). By that time, the polar caps were closed at their base and formed typical centrocones lined on the nuclear side with dense material (Fig. 12). Some microtubules traversed the centrocone wall and entered the nucleoplasm. Very elongate nuclei were observed (Figs. 11, 13), with occasional microtubules in their middle part (13). The separation of daughter nuclei was not seen. In one case, a pair of centrioles with a spindle pole was found away from the poles of an elongated nucleus (Fig. 11). The nucleolus remained undivided until the nuclear elongation took place (Fig. 10). All the centrioles observed had a "9 + 1" microtubule structure and were associated in pairs parallel to each other. They were almost always adjacent to the plasmalemma or to plasmalemma-derived vacuoles in older schizonts (Fig. 14), and were often found associated with 20-nm cytoplasmic microtubules, either solitary or grouped in small bundles which traversed the cytoplasm (Figs. 6-9). Most of these microtubules seemed to originate in the vicinity of the centrioles.

The Schizont (Fig. 14).—Cytoplasmic growth occurred during the successive mitoses. The nuclei were scattered throughout the cytoplasm, but their poles were almost always adjacent

* This investigation was suggested to us by the late Professor D. M. Hammond, to whose memory we dedicate this report. It is Utah Agriculture Experimental Station Journal Article #2464.



BUS
LILLE



Figs. 4-7. [Day 13. Early stages of mitosis. Ce, centriole; en, nuclear envelope.] 4. Cytoplasmic funnel (*) is seen extending between the centrioles. Note the extranuclear tubule (O). HV, parasitophorous vacuole; N, parasite nucleus. $\times 63,000$. 5. Duplication of centrioles. The pro-centrioles are indicated by arrows. $\times 56,000$. 6. Tangential section through a nucleus immediately after opening of the funnel, the ends of which form the polar caps (arrows). A fibrillar structure (*) extends between the caps; extranuclear microtubules (O) are also evident. N, parasite nucleus. $\times 50,000$. 7. Early stage of separation of the division poles. Extranuclear microtubules are seen in the vicinity of centrioles. $\times 57,000$.

←

All figures are electronmicrographs of *Eimeria bovis* cultivated in EBTr cell cultures. "Day" indicates day postinoculation on which the preparations were fixed.

Fig. 1. Day 6. Intracellular sporozoite. a, amylopectin; B, refractile body; HV, parasitophorous vacuole; M, mitochondrion; m, micronemes; N, parasite nucleus. $\times 11,000$.

Figs. 2, 3. [Day 8. Young schizonts. a, amylopectin; HV, parasitophorous vacuole.] 2. Denser peripheral area of a refractile body as seen in a highly magnified part of a parasite. $\times 58,000$. 3. Multinucleate schizont. Note the still present sporozoite apex (arrow). b, crescent body; HN, host cell nucleus; M, mitochondrion; mp, micropore; N, parasite nucleus. $\times 11,000$.

to the cytoplasmic membrane or to vacuoles filled with the same material as the parasitophorous vacuole and containing micropores (Fig. 14). Dictyosomes were closely associated with the nuclear envelope (Figs. 3, 11). Large dense refractile bodies persisted in the cytoplasm during the entire process of schizogony (Figs. 14, 15). A few amylopectin granules were present (Figs. 3, 8, 10), their number increasing considerably at the onset of merogony (Fig. 15). The parasitophorous vacuole was filled with "granulo-fibrillar" material, and often contained a denser crescent-shaped area (Fig. 3) or a dense structure with a clear center (Fig. 11). The limiting membrane was almost smooth.

Merogony.—Merozoite formation occurred during the last mitosis which was clearly recognizable by the presence of intranuclear spindles (Figs. 16, 17). A characteristic feature of merozoite budding was the more clustered appearance of chromatin and its condensation on the inner face of the nuclear envelope (Figs. 15, 17, 24-26). Merozoites developed typically at the periphery of the schizont. However, they developed also inside, in invaginations of the plasmalemma or in vesicles filled with a "fibrillo-granular" material identical to that found in the parasitophorous vacuole (Figs. 15-17, 26). The conoid, inner membrane complex, and subpellicular microtubules were found in young merozoite anlagen in close vicinity of a nuclear pole and the associated dictyosome (Figs. 16, 17). In transverse sections, pairs of microtubules were seen in associations with elements of the discontinuous inner complex (Fig. 18). A dense fiber was observed joining the inside of the conoid in the vicinity of the centriole (Figs. 19, 20, 23). Membrane-bounded dense bodies were present in the anlagen (Figs. 16, 19). Many amylopectin granules were present in the cytoplasm of the schizont. The nucleus, still containing some microtubules and with the cone at its anterior end, entered the merozoite (Fig. 25). Dictyosomes were located near the upper part of the nucleus. In this stage, typical rhoptries were formed and amylopectin granules appeared in the young merozoites (Figs. 24, 25). The residual cytoplasm was filled with mitochondria, amylopectin, and rare nuclei (Fig. 24). In the last step of merogony, mitochondria entered the merozoites and micronemes appeared in the anterior part of these stages (Fig. 26).

DISCUSSION

The sporozoite-to-schizont transformation in *E. bovis* *in vitro* was similar to this process as reported from other Coccidia in the gradual disappearance of the organelles specific to the motile stage (13). However, the long period (at least 6 days) pre-

ceding transformation during which no important change occurred in the sporozoite was unusual, except for the disintegration of the anterior refractile body during the first 24 h (10). The long persistence of the posterior refractile body was described previously by Fayer & Hammond (9), who interpreted it as reserve material gradually used up during the development of the schizont. Additional information brought out by electron microscopy was the demonstration of a denser peripheral layer in the refractile body in young schizonts. This layer, not previously described from *Eimeria*, can be related to the variations observed in the staining properties of the refractile body of *Isopora felis* Wenyon during an *in vitro* system reproduction (8). Some changes in this body thus seem to occur at the beginning of schizogony, which might reflect a functional process; however, as long as we know almost nothing of the chemical nature of the body, the actual meaning of the changes remains obscure. The association with dense granules and amylopectin is common in sporozoites (20, 28), even before host cell penetration, and is thus difficult to relate to any metabolic event.

Mitosis.—The mitotic phenomena observed during this study fit into the scheme proposed by one of us for *Eimeria necatrix* Johnson (4). It was of interest to find here again the eccentric cytoplasmic funnel coursing through the nucleus. This unusual structure was found also in *Eimeria tenella* (Railliet & Lucet) (unpublished observation) and is evident in some pictures of *Sarcocystis* development (18). The small size and rarity of this structure, which probably represents a transitory step of mitosis, may explain why it was not observed in other studies of schizogony in eimeriids in which only the much more common spindle stage was described. As suggested previously (4), the funnel might be formed from a lateral stretching of the centrosome of the preceding mitosis, although this could not be demonstrated. This step would correspond with that of centriole duplication which we think we have observed in the present study and which does not significantly differ from the duplication of typical centrioles (27) in being characterized by the appearance of a small companion close to each centriole of the parent pair.

The "9 + 1" structure of the centriole, which was observed previously in this species (31), was also found. Although until recently described only from some Coccidia, it has now been reported from a gregarine (19) and a myxomycete (7). This similarity among such unrelated organisms suggests a parallel simplification of the original triplet structure.

An unusual finding for *Eimeria* was the occurrence of ex-

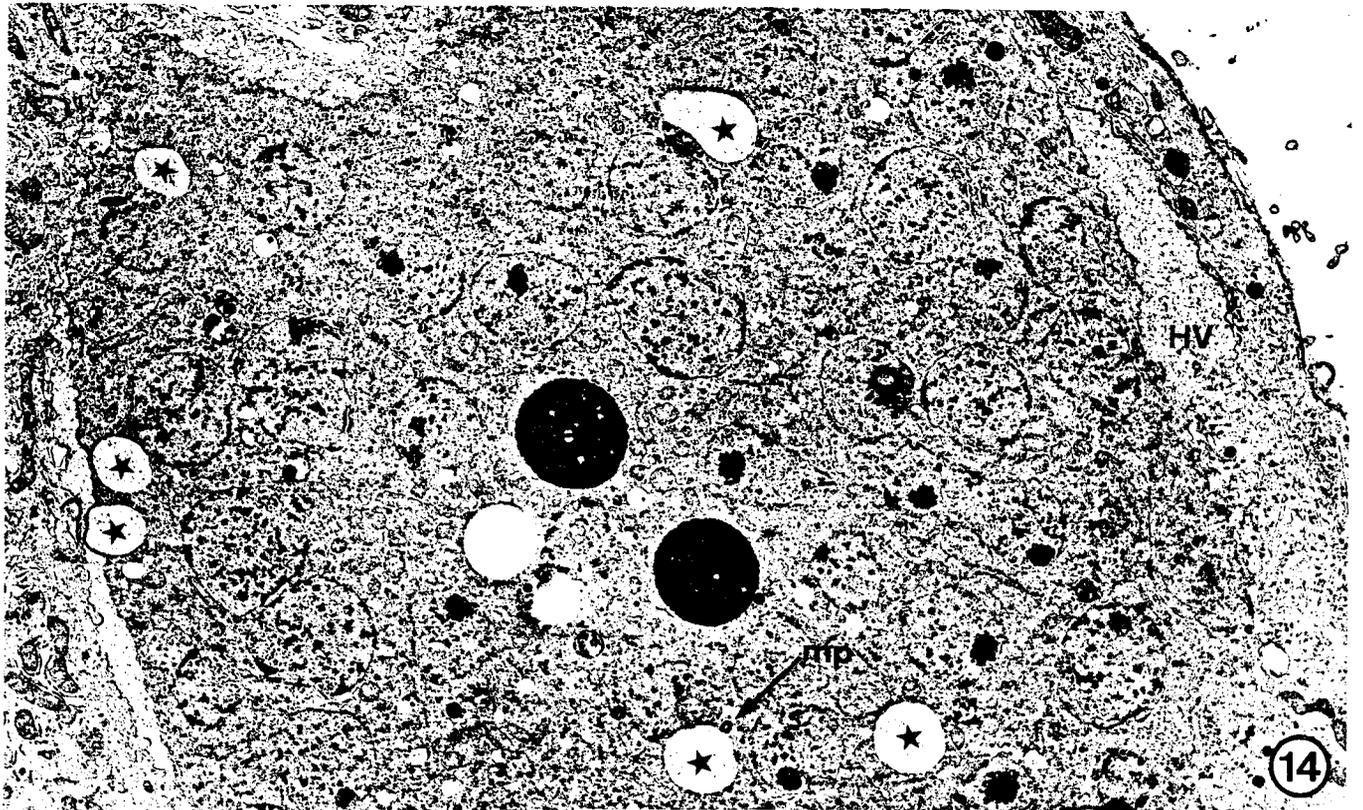
Figs. 8-13. [Various aspects of mitosis, especially of the spindle.] 8. Day 14. Intranuclear spindle. Extranuclear microtubules (○) are also evident. K, kinetochore; N, parasite nucleus. $\times 61,000$. 9. Day 13. Two sets of kinetochores (arrows) in a metaphase plate-like arrangement are seen in a division spindle. Note also the extranuclear microtubules (○). Ce, centriole. $\times 33,000$. 10. Day 8. Elongated spindle. nu, nucleolus. $\times 18,000$. 11. Day 8. Elongated nucleus, with a kinetic center (arrow) situated at a distance from the poles. b, crescent body; G, Golgi apparatus; nu, nucleolus. $\times 21,000$. 12. Day 10. Centrocone (ct) with its inner face lined by an electron-dense layer (arrow). Ce, centriole. $\times 45,000$. 13. Day 10. Part of a very elongated nucleus, containing a nucleolus (nu). An extranuclear fiber (○) is also evident. $\times 20,000$.

Fig. 14. Day 13. Part of a schizont before initiation of merogony. Note that certain vacuoles (*) in the parasite cytoplasm are filled with material that appears to be identical with that in the parasitophorous vacuole (HV) surrounding the schizont. mp, micropore. $\times 7,600$.

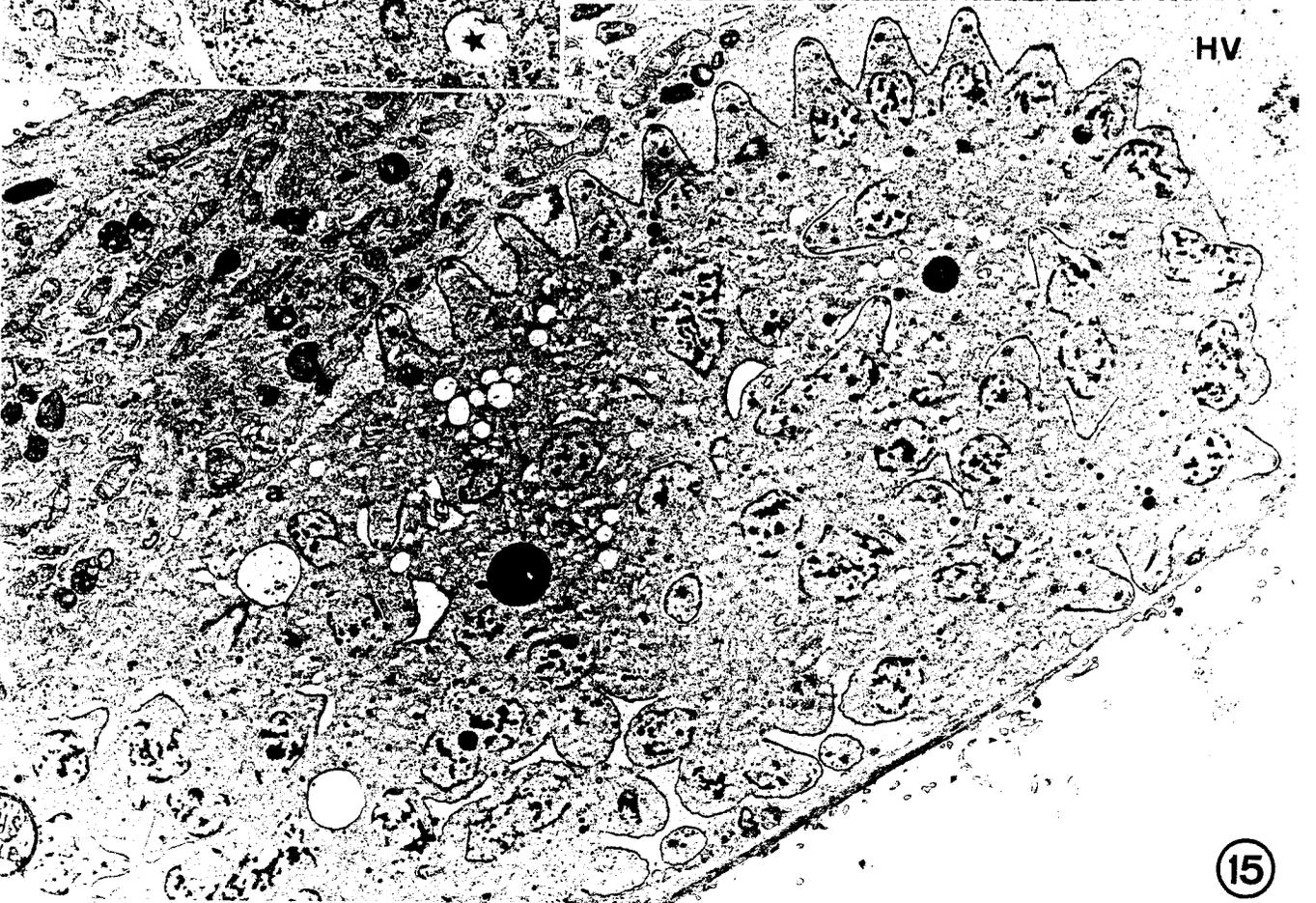
Fig. 15. Day 13. Formation of merozoites on the surface of a schizont. Note the separation of daughter nuclei, some of which are seen at the bases of the budding merozoites. $\times 5,700$.

Figs. 16-20. [Details of merogony. Figs. 16-18, day 14; Figs. 19 and 20, day 13.] 16, 17. Formation of merozoites. The developmental stages correspond to the one shown in Fig. 15. Note that the nuclei are in different phases of mitosis. Ce, centriole; co, conoid; G, Golgi apparatus; K, kinetochore; N, parasite nucleus; R, rhoptry. $\times 36,000$. 18. In a part of a budding merozoite note pairs of subpellicular microtubules (arrowheads) associated with parts of the inner membrane complex (ic). p, plasmalemma. $\times 66,000$. 19. Electron-dense fiber (arrow) connecting the areas of the conoid (co) and centriole (Ce). $\times 57,000$. 20. Anterior terminal segment (arrow) of the electron-dense fiber (see Fig. 19) within the conoid (co). The inner membrane complex (ic) and the subpellicular microtubules (tb) are also evident. $\times 58,000$.





14

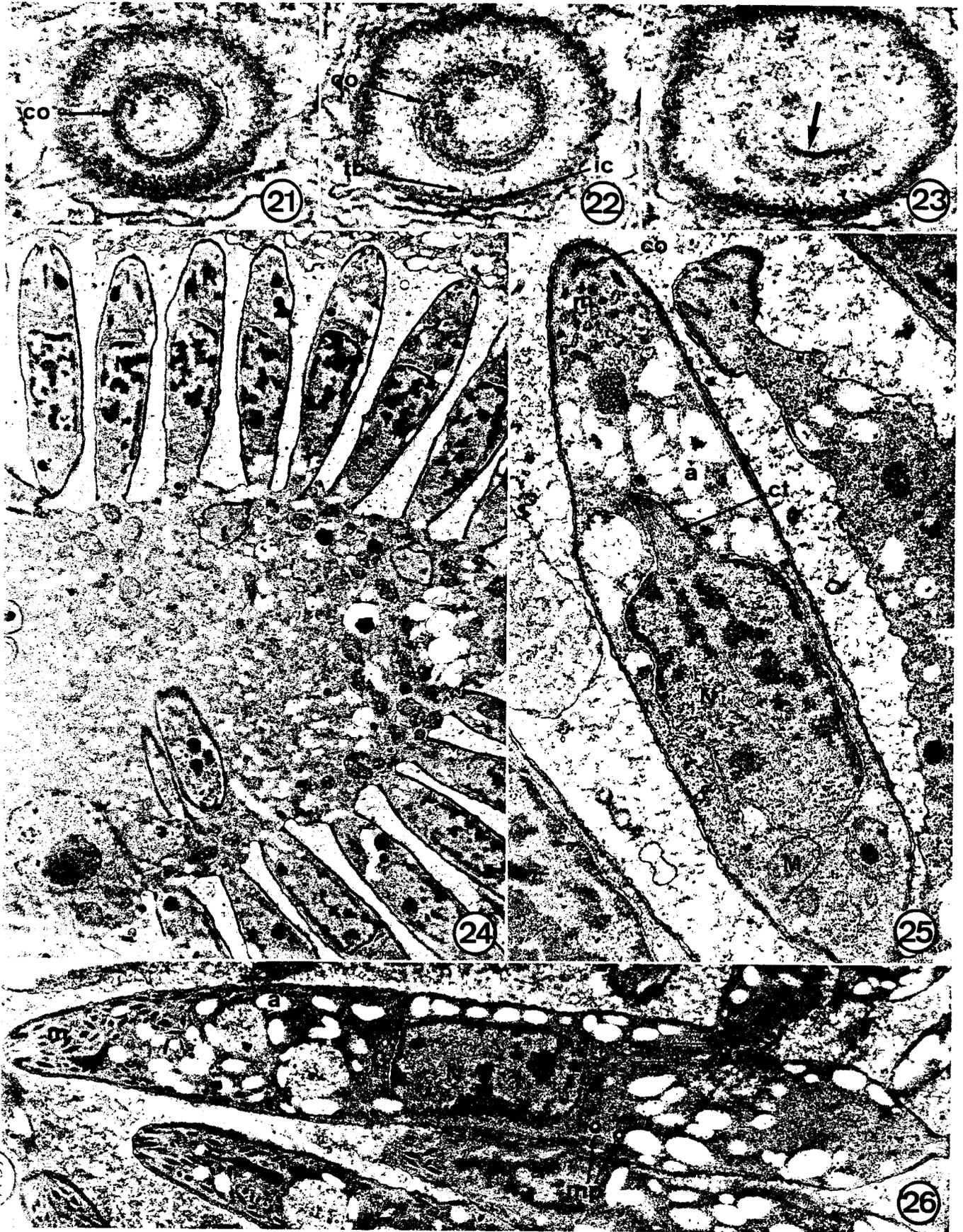


HV

15

BUS
LILLE





tranuclear microtubules associated with the centrioles. The only previous observation of such an association was reported from *Eimeria ninakohlyakimovae* Yakimoff & Rastegaieff grown in cell cultures (17). We have also observed cytoplasmic microtubules in *E. necatrix*, *E. tenella*, and *Eimeria nieschulzi* Dieben schizonts developing in an *in vitro* system (unpublished data). No one has ever observed such microtubules in *in vivo* grown *Eimeria*. It is difficult to know if this is a specific feature of *Eimeria* grown in cell cultures or if demonstration of extranuclear microtubules was due to the improvement in fixation methods. Furthermore, it was difficult to assign any functional significance to the microtubules, as they never formed a spindle between the poles. If they were not an artifactual polymerization of tubulin due to cell culture conditions, they might be involved in the lateral spacing of centrioles during the next successive mitosis. Extra-nuclear microtubules are rather common in other Coccidiomorpha (24, 25, 33), but in those cases the mitotic processes are not completely understood and seem to differ from the type found in eimeriids. Long microtubules are present in *Leucocytozoon* oocysts (34), but they are supposed to participate in wall formation, which does not occur in *Eimeria*.

Although difficult to find, the kinetochores were apparent in some electronmicrographs. Their structure was the same as that of the homologous organelles in other species of *Eimeria*. In some instances, their arrangement resembled a metaphase plate which was not clearly evident in *E. necatrix* but could be inferred from electronmicrographs of *E. ninakohlyakimovae* (17). We did not find incontestable evidence of the occurrence of kinetochores close to the initial funnel, as observed previously (4), but their presence in the early spindle was consistent with the hypothesis of the persistence of their relationship with the centrocone during its transformation into a funnel. The kinetochores probably divide and send chromosomal fibers toward the poles as soon as the spindle forms, i.e. when the nuclear envelope breaks down. The spindle then seems to act as in classical mitosis to separate the daughter chromatids; however, as soon as the chromatids reach the poles, the centrocones form; against their base the kinetochores fuse into a dense layer. The elongation and separation of daughter nuclei do not seem to rely on a microtubular mechanism, as was previously suggested for *E. necatrix* (4). This duality in the mechanisms of chromosome and nuclear division was used to explain how a new mitosis could start before the termination of the preceding one. The same seems to hold true for *E. bovis* (Fig. 11).

It is interesting to note the tendency of large eimerian schizonts for multipolar mitosis, as recently demonstrated in *Sarcocystis* (2). Would this mean that the synchrony between genome duplication and karyokinesis is progressively lost in the group (to culminate in Hemosporina where there is no synchrony)? If this were true, the mitotic mechanism of Coccidia might have evolved from a classical one (which is still found as

part of eimerian mitotic spindle) toward a more long-lasting attachment of chromosomes to the nuclear poles, which seems to be almost permanent in Hemosporina (1, 12, 16).

Merogenesis.—(A) The general process of merozoite formation in *E. bovis* is exogenesis, best observed in large species (e.g. *E. bovis* or *E. necatrix*), i.e. formation originally associated with the plasmalemma. In endogenesis it proceeds for a long time at a distance from the plasmalemma. In both cases the merozoite is finally enveloped by the mother cell plasmalemma. The major difference between the 2 processes is in the relationships between the mitotic poles and the plasmalemma. It has been observed that the formation of merozoites takes place close to the kinetic centers (centrioles when present) and that morphogenesis conforms to the same pattern in both types of development (5, 13, 15, 21). When the kinetic centers are associated with the plasmalemma during the successive mitoses (e.g. in *E. bovis*), the merozoites form by exogenesis; when the merozoites are distant from plasmalemma [e.g. as in *Toxoplasma* (32) or *Eimeria callospermophili* Henry (29)], they form by endogenesis.

(B) The association between merogenesis and the last mitosis is a general phenomenon in schizogony (21). As in other Coccidia, in *E. bovis* the initiation of the apical complex occurs close to each nuclear pole, at an early stage of mitosis. It was evident from the present study of large schizonts that there was synchrony of this initiation among the merozoites formed in a parent cell (Fig. 15). However, this synchrony might be due to the nuclear division, since it was observed also during the preceding mitosis (Fig. 14). Nothing is known about the triggering mechanism which controls differentiation. The fact that mature schizonts may vary in size and thus in merozoite number in cell cultures (14) suggests that the number of successive schizogonic mitoses is not absolutely fixed. Environmental factors might influence this process. The initiation of the apical complex probably starts soon after the onset of mitosis, but then the 2 phenomena do not seem to be perfectly synchronous, as different stages of spindle development were found associated with the same stage of merogenesis (Figs. 15-17). The last mitosis did not seem to differ from the previous ones, the only difference being the clustering of chromatin on the nuclear envelope, previously described from *E. tenella* (20).

(C) The major importance of kinetic centers (centrioles in *E. bovis*) in differentiation is suggested by the electron-dense fiber joining the conoid area to the nuclear poles during early merogenesis. A similar situation was observed in *E. necatrix* (5), and apparently also in *Aggregata* (25) and *Globidium* (23). It was interpreted in *E. necatrix* (5) as an expression of the control of centrioles over formation of conoids. The recent finding of the fiber in *Plasmodium* (12), which does not have either organelle, leads us to broaden the significance of the dense fiber which actually might represent a link between the apex of the merozoite and the kinetic center, these structures becoming separated by progressively greater distances during the differ-

←
Figs. 21-23. Day 13. Successive transverse sections through a budding merozoite. The following structures can be seen in these sections: the conoid (co), the inner membrane complex (ic), the subpellicular microtubules and, at the lowest level, the terminal segment (arrow) of the electron dense fiber extending between the conoid and the centriole. $\times 60,000$.

Figs. 24-26. [Final stages of merogenesis. Day 13.] 24. Part of a schizont with merozoites in an advanced stage of development. Each merozoite contains a nucleus and rhoptries (R) differentiated into the club-shaped, posterior, and the narrow anterior parts. Some merozoites still remain within the residuum. $\times 10,000$. 25. Merozoite in the same stage as those shown in Fig. 24. Note the conoid (co), centrocone (ct), residual microtubule (o) in the area of the nucleus (N), mitochondria (M), and amylopectin granules (a); micronemes (m) also start appearing. $\times 24,000$. 26. Merozoite free of the residuum. A rhoptry (R) and micronemes (m) are evident in the apical region. Note the 2 micropores (mp) in the area posterior to the nucleus (N). a, amylopectin; G, Golgi complex. $\times 14,000$.

entiation. Such a link would be needed to preserve the unity of the future gem. Some abnormal development might be caused by the loss of this linkage soon after the beginning of merogenesis when the rudimentary apexes are not associated with nuclei (3, 22).

(D) The association between the developing inner complex and pairs of subpellicular microtubules has been observed in some *Eimeria* (5, 11, 29, 30). It has to be related to the recent finding, with the aid of freeze fracture studies, of the structure of the inner membrane complex in various coccidian zoites (6, 26). It became evident from these studies that the inner complex of *E. nieschulzi* and *Sarcocystis tenella* Railliet merozoites is made of as many longitudinal strips as half the number of subpellicular microtubules and that the microtubules are probably situated along alignments of intramembranous particles of the inner complex.

The areas of inner complex observed by us in *E. bovis* (Fig. 18) were probably strips that had not achieved their lateral extension. On the basis of the present study and of that on *E. necatrix* (5) it is tempting to conclude that the positioning of the growing inner complex is likely to depend on its association with the microtubules. The lateral continuity of the inner complex in the apex of the merozoite (Fig. 20) corresponds to the apical cap shown in freeze fracture electronmicrographs (6, 26).

(E) Differences in the time of the origin of rhoptries and micronemes seen in *E. bovis* were reported previously in *E. necatrix* and *Aggregata eberthi* (Labbé). The former organelle appeared simultaneously with the apex and the latter formed when the merozoite was freed from the residuum. Elucidation of the chemical nature of rhoptries and micronemes is needed to establish functional differences between these organelles.

(F) The amylopectin granules present in the schizont increased in number with the onset of merogenesis. This appears to be a manifestation of the metabolic change known to take place when the cell metabolism starts supporting the differentiation of organelles and the formulation of energetic reserves for the merozoites. The only differences between merogenesis as seen in *in vitro* and *in vivo* conditions are: (a) the early appearance of amylopectin and its partial incorporation into the forming merozoites under the former, and the formation of amylopectin granules after the merozoites are pinched off the residuum under the latter conditions (5, 23, 25); (b) the appearance of extranuclear microtubules in organisms cultivated *in vitro* but not in those developing *in vivo*. In view of this, the mechanism that triggers merogenesis can probably be elucidated by studies of *Eimeria* schizogy in an *in vitro* system.

LITERATURE CITED

- Canning EU, Sinden RE. 1973. The organization of the ookinete and observations on nuclear division in oocysts of *Plasmodium berghei*. *Parasitology* 67, 29-40.
- Cerna Z, Senaud J. 1977. Sur un type nouveau de multiplication asexuée d'une Sarcosporidie, dans le foie de souris. *C. R. Acad. Sci.* 285, 347-9.
- Danforth HD, Hammond DM. 1973. Abnormal development of conoids in *Eimeria magna*. *J. Parasitol.* 59, 585-7.
- Dubremetz JF. 1973. Etude ultrastructurale de la mitose schizogonique chez la coccidie *Eimeria necatrix* (Johnson 1930). *J. Ultrastruct. Res.* 42, 354-76.
- . 1975. La genèse des merozoites chez la coccidie *Eimeria necatrix*. Etude ultrastructurale. *J. Protozool.* 22, 71-84.
- , Torpier G. 1978. Freeze fracture study on the pellicle of an eimerian sporozoite (Protozoa, Coccidia). *J. Ultrastruct. Res.* 62, 94-109.
- Dykstra MJ. 1976. Nuclear and cell division in *Sorodiplophys stercorea*, a labyrinthid-like protist. *Protozoa* 87, 347-59.
- Fayer R, Hammond DM. 1967. Development of first-generation schizonts of *Eimeria bovis* in cultured bovine cells. *J. Protozool.* 14, 764-72.
- , ———. 1969. Morphological changes in *Eimeria bovis* sporozoites during their first day in cultured mammalian cells. *J. Parasitol.* 55, 398-401.
- , Thompson DE. 1974. *Isospora felis*: development in cultured cells with some cytological observations. *J. Parasitol.* 60, 160-8.
- Ferguson DJP, Birch-Andersen A, Hutchinson WM, Siim JC. 1976. Ultrastructural studies on the endogenous development of *Eimeria brunetti*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* B84, 401-13.
- Foucher G. 1974. Etude ultrastructurale des mitoses et de la différenciation des sporozoites au cours de la schizogonie du Protozoaire parasite *Plasmodium berghei berghei*. Thèse 3e cycle, University of Poitiers.
- Hammond DM. 1973. Life cycle and development of Coccidia, in Hammond DM, Long PL, eds., *The Coccidia*, University Park Press, Baltimore, pp. 45-80.
- , Fayer R. 1968. Cultivation of *Eimeria bovis* in three established cell lines and in bovine tracheal cell line cultures. *J. Parasitol.* 54, 559-68.
- Hoppe G. 1974. La formation des merozoites chez la coccidie *Eimeria tenella* (Railliet et Lucet, 1891). Etude au microscope électronique. *Protistologica* 10, 185-205.
- Howells RE, Davies EE. 1971. Nuclear division in the oocyst of *Plasmodium berghei*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 65, 451-9.
- Kelley GL, Hammond DM. 1973. Fine structural aspects of nuclear division and merogony of *Eimeria ninakohlyakimovae* in cultured cells. *J. Parasitol.* 59, 1071-9.
- Mehlhorn H, Scholtyssek E. 1973. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cystenstadien von *Sarcocystis tenella* aus der Oesophagus. Muskulatur des Schafes. *Z. Parasitenk.* 41, 291-310.
- Molon-Noblot S. 1976. Ultrastructure du centriole chez la grégarine *Grebnickiella gracilis* (Sporozoaire). *Protistologica* 12, 431-4.
- Pacheco ND, Vetterling JB, Doran DJ. 1975. Ultrastructure of cytoplasmic and nuclear changes in *Eimeria tenella* during first-generation schizogony in cell culture. *J. Parasitol.* 61, 31-42.
- Porchet Henneré E. 1972. Considérations générales sur les processus de schizogonie chez les Sporozoaires à la lumière des données de la microscopie électronique. *Ann. Biol.* 11, 413-26.
- . 1976. Formation d'organites apicaux anormaux lors de la schizogonie de *Globidium gilruthi*. *Protistologica* 13, 53-6.
- . 1977. Etude ultrastructurale de la schizogonie chez la Coccidie *Globidium gilruthi*. *Protistologica* 13, 31-52.
- , Ormières R. 1973. Etude ultrastructurale des stades "hépatiques" (gamontes) de *Grasseella microcosmi* Coccidie parasite du Tunicier *Pyura microcosmus*. *Protistologica* 9, 187-211.
- , Richard A. 1971. La schizogonie chez *Aggregata eberthi*. Etude en microscopie électronique. *Protistologica* 7, 227-59.
- , Torpier G. 1977. Etude du germe infectieux de *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii* par la technique du cryodécapage. *Z. Parasitenk.* 54, 101-24.
- Ratner JB. 1972. Observations of centriole formation in male meiosis. *J. Cell Biol.* 54, 20-9.
- Roberts WL, Hammond DM. 1970. Ultrastructural and cytologic studies of the sporozoites of four *Eimeria* species. *J. Protozool.* 17, 76-86.
- , ———, Anderson LC, Speer CA. 1970. Ultrastructural study of schizogony in *Eimeria callospermophilii*. *J. Protozool.* 17, 584-92.
- Sheffield HG, Hammond DM. 1966. Fine structure of first generation merozoites of *Eimeria bovis*. *J. Parasitol.* 52, 595-606.
- , ———. 1967. Electron microscope observations on the development of first generation merozoites of *Eimeria bovis*. *J. Parasitol.* 53, 831-40.
- Vivier E. 1970. Observations nouvelles sur la reproduction asexuée de *Toxoplasma gondii* et considérations sur la notion d'endogenèse. *C. R. Acad. Sci.* 271, 2121-6.
- , Petitprez A, Landau I. 1972. Observations ultrastructurales sur la sporoblastogenèse de l'Hémogrégarine *Hepatozoon domerguei*, Coccidie Adeleidea. *Protistologica* 8, 315-33.
- Wong TC, Desser SS. 1976. Fine structure of oocyst transformation and the sporozoites of *Leucocytozoon dubreuilii*. *J. Protozool.* 23, 115-26.

Freeze Fracture Study of the Pellicle of an Eimerian Sporozoite (Protozoa, Coccidia)¹

J. F. DUBREMETZ AND G. TORPIER

Laboratoire de Biologie animale, Université de Lille I, B.P. 36, 59650-Villeneuve d'Ascq and Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, 20, Bd Louis XIV, 59012-Lille Cédex, France

Received April 5, 1977, and in revised form, December 20, 1977

Freeze fracture of *Eimeria nieschulzi* sporozoites reveals the structure of their three-membranous pellicle. The plasmalemma has an almost completely random distribution of intramembranous particles (IMP) but shows an apical rosette which may have a function in host cell penetration. The inner membrane complex is made of 13 longitudinal strips inserted on an apical truncated conical cap. Transverse sutures are present in the strips, as well as micropores. The two membranes have a similar, but back-to-back organization, which confirms the vesicular origin of the complex. The P faces bear very regular parallel alignments of IMP, with two dense lines per strip which might correspond with the underlying subpellicular microtubules (the number of which is twice the one of strips). The E faces are almost devoid of particles. The structural and functional significance of those findings are discussed.

The electron microscope study of the motile stages of Sporozoa has demonstrated their very uniform scheme of organization. All these zoites share several specific organelles and cytologic peculiarities which give them a very characteristic structure (29). Among these features is a three-membranous pellicle, the two inner layers of which are believed to issue from the flattening of cytoplasmic vesicles during zoite genesis (23). With the aim of better understanding the significance of such a pellicle, it was decided to investigate its structure by the freeze fracture technique. By providing both a three-dimensional view and a macromolecular approach to this membrane system, this technique has given very original information which is reported herein.

MATERIALS AND METHODS

Sporozoites of the rat Coccidia *Eimeria nieschulzi* were prepared from sporulated oocysts by mechanical grinding and trypsin excystation (12). They were rinsed in PBS at room temperature and then fixed in 2% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 1 hr at 4°C. After fixation, the specimens were rinsed in buffer and kept for 2 hr at 4°C in a 30% (v/v) glycerol solution. Freeze fracturing was per-

formed in a Balzers BAF 300 apparatus equipped with an electron-beam evaporation device and a quartz crystal thin-film monitor. Cells were mounted between two gold disks, frozen in melting nitrogen, and stored in liquid nitrogen. Fracturing was done at -120°C using the double replicas hinge device, followed by Pt-C shadowing. Replicas were cleaned with sodium hypochlorite for 3 hr, washed in distilled water, and mounted on 250-mesh copper grids for examination in Hitachi HU IIE and HU12 electron microscopes.

Particle density measurements. Micrographs were enlarged on photographic paper covered with a transparent grid to make the particle counting per unit area easier. Data corresponding to the counting of at least 0.5 μm^2 of each membrane were statistically processed by two-way variance analysis. Ten pictures of each type of fracture face were analyzed in this way.

Terminology. The nomenclature of Branton *et al.* (6) has been used, and thus the half-membranes adjacent to cytoplasm are designated as P faces and their complementary halves as E faces. The sporozoite pellicle is made of three successive membranes (22) which are referred to as e (external, plasmalemma), m (medium), i (inner). Furthermore, the two inner membranes (inner membrane complex) thought to be derived from a flattening of vesicles (23) are considered to be the walls of a cisternae and have been given opposite fracture face designation (see Fig. 1).

RESULTS

The *Eimeria nieschulzi* sporozoite is a banana-shaped cell of about $14 \times 2 \mu\text{m}$. Our replicas show three preferential fracture planes in its pellicle. The outermost is in-

¹Supported by INSERM (CRL No. 75.5.098) and CNRS (ERA No. 184).

side the plasmalemma, the other two occurring, respectively, in the two layers of the inner membrane complex (Fig. 1). The antero-posterior orientation of the sporozoite is allowed by the observation of the rhoptries when the fracture plane runs across the cell (Fig. 14). These organelles are known to occur only in the anterior part of Eimerian zoites (38). The distribution, size, and partition coefficient of intramembrane particles (IMP) are reported in table 1.

1. Plasmalemma (Fracture Faces *Pe* and *Ee*)

This outer fracture plane reveals a rather uniform structure with a random distribution of IMP on both faces. The density is lower in the E face (Figs. 3, 4, 18, and 19).

Two special features occur on the P face. First are alignments of 5 to 20 IMP which are almost always on the axis of the sporozoite and very often on the same lines as

the underlying sutures between the strips of the inner complex (Figs. 2 and 5). The E face is devoid of such structures (Figs. 2, 6, and 8). Second is a 60-nm-diameter rosette of (8 + 1) 10-nm IMP, surrounded with an irregular, often asymmetric, 200- to 250-nm-diameter ring of almost identically sized particles (Fig. 6). That differentiation is located at the apex of the sporozoite, which is itself a short circular protrusion of 500-nm diameter. The rosette is always present but sometimes lacks some of its IMP.

2. Inner Membrane Complex (Fractures Faces *Pm*, *Pi* and *Em*, *Ei*)

Contrasting with the rather uniform aspect of the plasmalemma, both fracture planes through the inner complex reveal a series of contiguous strips running along the sporozoite (Figs. 2-5, 16). The sutures between those strips join at the posterior end in a turbine-like fashion (Figs. 13-15). At the apex, the strips end on a truncated cone 0.5 to 1 μm high which we will name

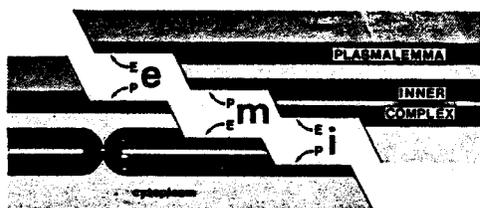


FIG. 1. (a) Diagram of the fracture faces occurring in the sporozoite pellicle, with their denominations. (b) Transverse section of a sporozoite showing the three membranes of the pellicle and subpellicular microtubules (tb). $\times 200\ 000$.

TABLE 1
PARTICLE DISTRIBUTION IN THE PELLICLE OF THE
E. nieschulzi SPOROZOITE*

Membrane designation	Fracture face		Partition coefficient (P/E)
	E	P	
e	218 \pm 21	648 \pm 73	3
m	29 \pm 7	2360 \pm 133	81
i	146 \pm 31	1780 \pm 97	12

* Per square micrometer. The size of IMP is in the range 6-14 nm.

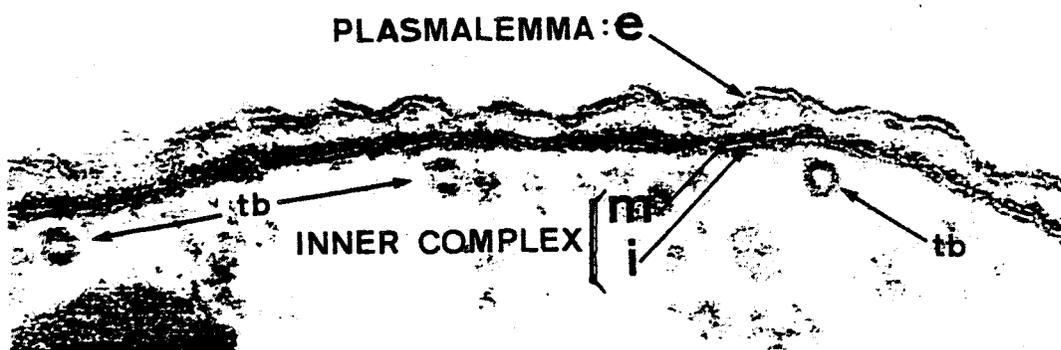
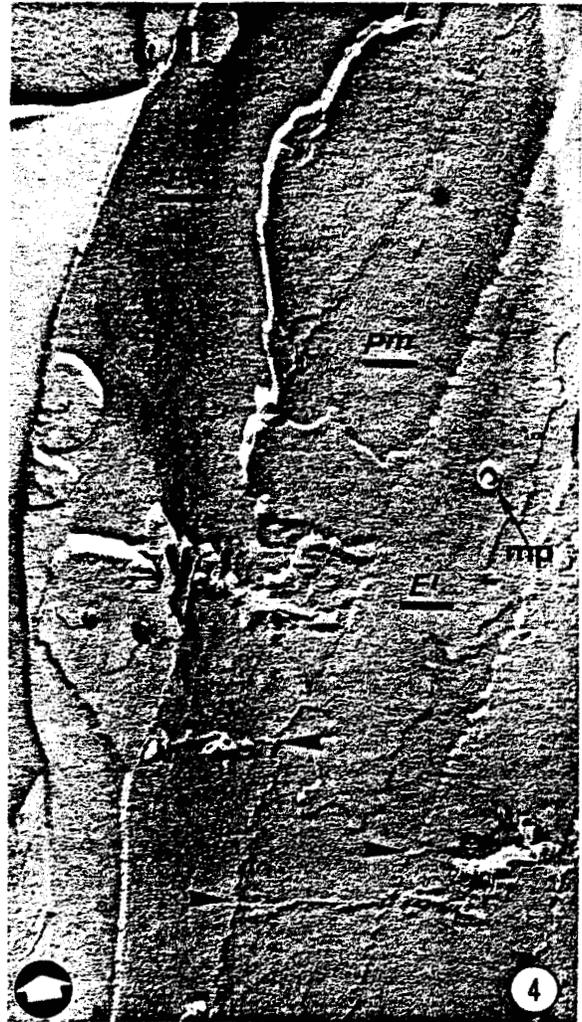
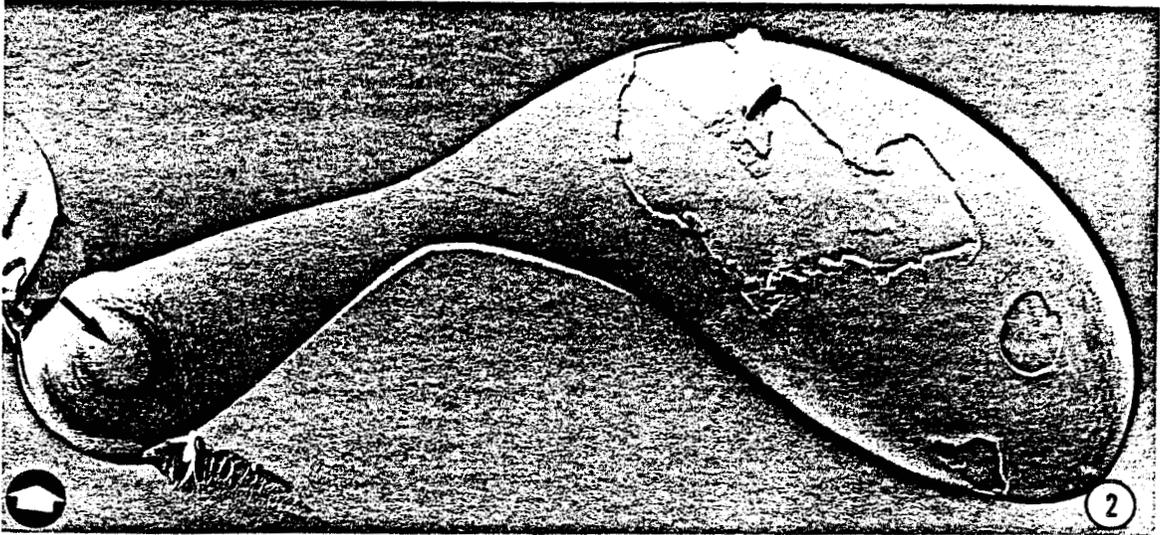


FIG. 1B



100'S
11.11.11

the *apical cap* (Figs. 8–12). Whenever it is possible to count (at the posterior end), one finds 13 strips covering the zoite (Figs. 13 and 15). Their individual width in the middle part of the cell is about 0.6 μm (0.55–0.70). At their anterior end, they are 0.3 to 0.4 μm wide, this giving a diameter of 1.2 to 1.5 μm for the base of the cap. The cap is itself open anteriorly by a circle of 0.3 μm (Fig. 7).

Some replicas show transverse interruptions in the strips, which sometimes run from one strip to its neighbor, but are often shifted in a stair-like fashion (Figs. 3, 4, and 16). When two successive interruptions are observed in one strip, they are from 2 to 3 μm apart (Fig. 3).

Both membranes of the inner complex have a comparable arrangement of IMP and thus are described together.

(a) *P faces*. The most striking feature of these fracture faces is the very regular alignment of IMP running parallel to the edges of the strips (Fig. 3, 4, 18, and 19). The interline spacing is constant and close to 30 nm (Table 2), thus the number of lines per strip depends on the width of this one. It is about 20 lines in the middle of the cell (Figs. 2, 3, and 15–18), and it decreases toward the ends (Figs. 9, 10, 13, and 15). Although most of these lines are made of one set of rather uniformly sized particles, each strip has two "main lines" where the number of IMP per unit length is about twice that in the others (Table 2). These special lines are symmetrical about the axis of the strip and lie half a strip width apart (Figs. 3 and 16–19). The lines are continuous across the transverse interruptions of the strips (Fig. 16), but they do not go into

the apical cap where the main lines are replaced by a smooth 30-nm path bordered on each side by one line (Fig. 12, Pi) or one band of IMP (Fig. 11, Pm); elsewhere in the cap, a random distribution seems to occur (Figs. 11 and 12).

Although both Pm and Pi faces show a similar structure, a difference has been noted in the sizes of IMP, and in their densities (Tables 1 and 2). As a rule, the Pm face has less distinct features compared to Pi.

(b) *E faces*. On all replicas the very smooth aspect of E faces contrasts with the P faces. Very few IMP occur on Em either in the strips or on the apical cap. Ei has a few more particles. In a few cases, a very discrete longitudinal striation is visible on Em strips (Fig. 10), and the apical cap has parallel ridges 30 nm apart in the axis of the Pi main lines (Figs. 9 and 10).

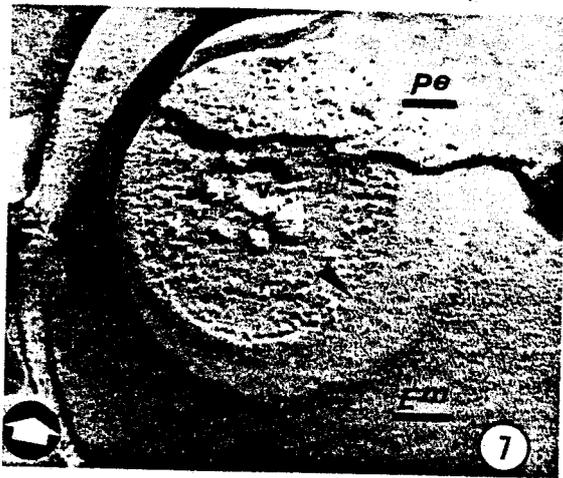
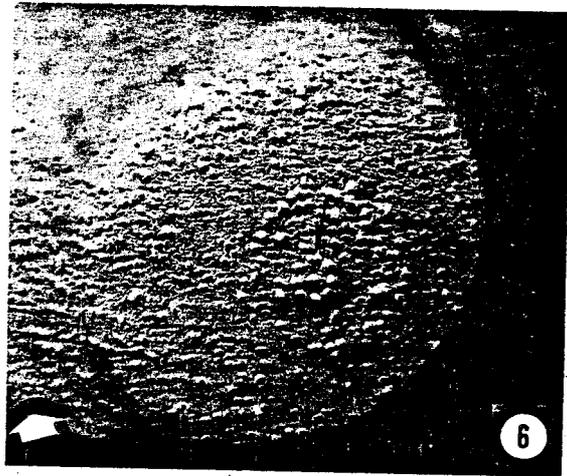
(c) "*Sutures*" between strips. When viewed in the E faces, sutures form a more or less sinuous groove with a few IMP scattered from place to place (Figs. 3–5, 8–10, 13, and 16). At the posterior end, the groove is less visible, covered with a wide band of more or less clustered particles (Fig. 13). When viewed between P faces, the suture is made of irregular lines of almost-joining 8–12-nm IMP. The posterior end also has clustered particles (Fig. 13). When the suture is between an E and a P face, the number of IMP observed is intermediate between both previous cases, and a thin dark line or a groove followed by a very thin ridge delineates the junction (Figs. 3 and 16).

The transverse sutures and the junction with the apical cap do not show any signif-

FIGS. 2–19. Electron micrographs of freeze fracture replicas of *Eimeria nieschulzi* sporozoites. The arrow at the bottom of each picture shows the angle of Pt shadowing.

FIG. 2. General view of a twisted organism. The apical zone with its rosette is visible (large arrow). A line of intramembranous particles (IMP) occurs on the Pe face (small arrow). The strips of the inner complex are apparent. $\times 16\ 000$.

FIGS. 3 AND 4. Complementary faces of the pellicle (Fig. 3, convex; Fig. 4, concave). The m and i membranes are divided into strips with transverse interruptions (arrowheads). Their P faces bear parallel rows of IMP with two main lines per strip (arrows). mp, micropore. $\times 36\ 000$.



815
LILLE

TABLE 2
LINEAR DISTRIBUTION OF IMP IN THE INNER
COMPLEX P FACES^a

Fracture face	Regular lines	Main lines	Interline spacing (nm)
Pm	66 ± 7	140 ± 9	30 ± 2.8
Pi	47 ± 5	93 ± 12	31.5 ± 2.5

^a Per micrometer.

ificant differences from the longitudinal ones.

(d) *Other features of the inner membrane complex.* These are either zones of preferential "adhesiveness" of the plasmalemma on the underlying complex or little depressions of the membranes toward the cytoplasm.

In the Em faces, the places where the sutures join the apical cap are often hidden by a remnant of the plasmalemma which has an irregular ovoid shape, being on the order of 0.1 to 0.2 μm wide (Figs. 9 and 12).

Toward the bottom of the apical cap, in Em faces, one can find little circular depressions 40 nm wide (Figs. 8, 9, and 12). No regular repetition of those sites has been noted. Little elevations of similar size occur on the complementary Pm face (Fig. 11).

On the axis of the strips are frequently found circular structures which may be pits (Fig. 3), humps, or more often moon crater-like organelles (Figs. 4, 16, and 17). A careful study of the micrographs shows that all represent a circular pit made by the invagination of the two membranes of the inner complex toward the cytoplasm. They are micropores. The diameter of the organelle is about 70 nm in the m membrane (but may be larger, Fig. 16) and 90 nm in the inner membrane.

In some cases, smaller pits were observed (Fig. 16). The center of the micropore is always smooth. No more than one of these organelles has been observed per closed area of strip (limited by two transverse sutures), but we do not know whether each closed area bears one such structure.

DISCUSSION

The three-layered structure of the Sporozoan pellicle was first recognized by Vivier (44) in a Protococcidia and has proven to be a very common feature of many stages of the life cycle of these parasitic Protozoa (46). Another advance was made when Reger (32), followed by Vivier and Petitprez (47) interpreted the two inner membranes as the walls of vesicles flattened under the plasmalemma. This view received further support from the observations of Prensier (30) on the genesis of sporozoites of the Gregarin *Diplauxis hatti* where the inner membrane complex originates from the endoplasmic reticulum.

During the schizogony of *Eimeria*, Roberts *et al.* (33) and Dubremetz (13) showed an association between pairs of subpellicular microtubules and crescent-shaped patches of the growing inner complex. The negative staining technique also provided information on the pellicle although one could not distinguish which layer was responsible for the sometimes delicate features observed (1, 24, 34).

The present results enable us to reconsider all those previous findings with the advantage of observing the structural differentiations of each membrane of the pellicle. Although a few papers have already

FIG. 5. Lines of IMP (arrows) occur in the P face of the plasmalemma, most of which are parallel with the sutures of the inner complex. $\times 42\ 000$.

FIG. 6. Apical rosette of 8 + 1 IMP in the plasmalemma P face, surrounded with an irregular ring. One particle of the rosette appears as two subunits (arrow). $\times 100\ 000$.

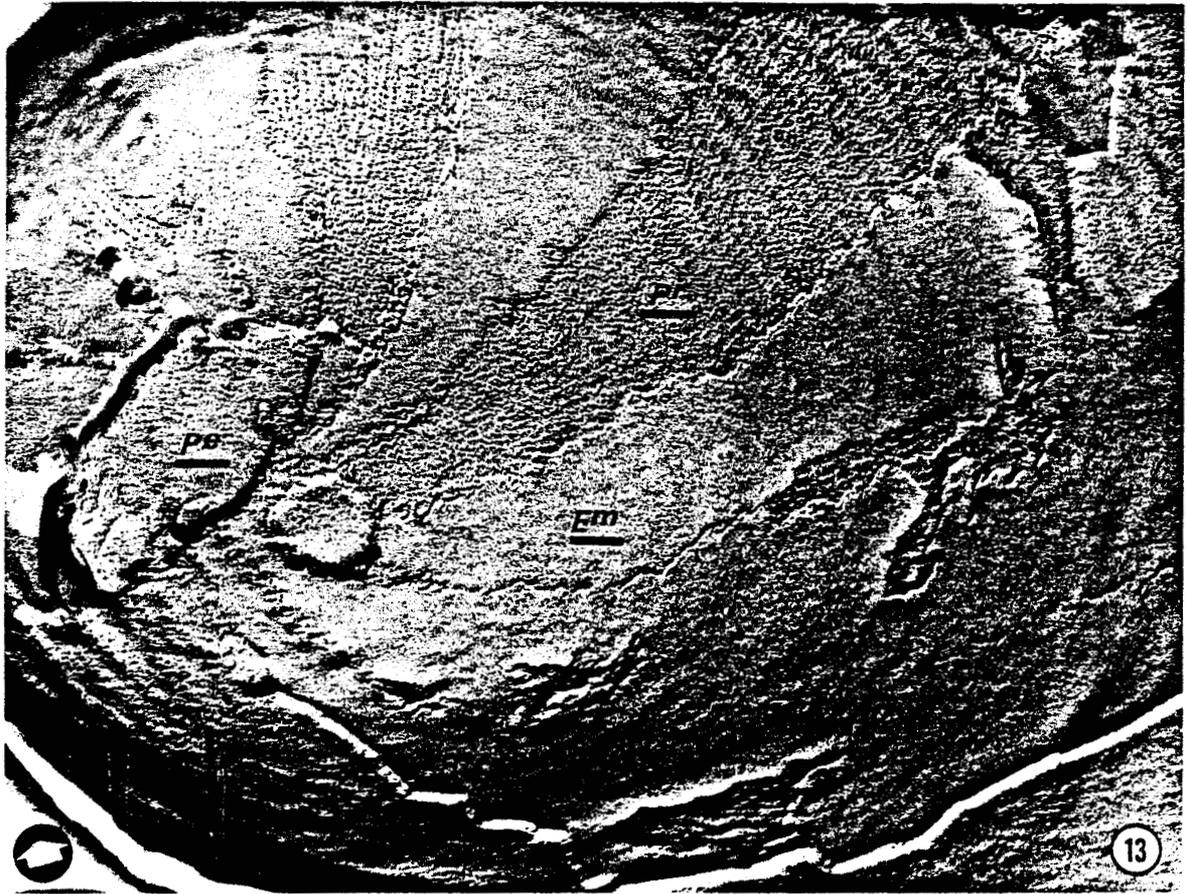
FIG. 7. This replica shows the circular interruption of the inner complex (arrowhead) at the apex and the vesicle (v) underlying the rosette, surrounded with smaller vesicular structures. $\times 100\ 000$.

FIG. 8. Anterior view of the sporozoite inner complex showing the insertion of the strips on the apical cap (C). One suture is covered with a remnant of the Pe face (arrowhead). Two small pits occur in the cap (arrows). $\times 45\ 000$.



FIGS. 9-12. Anterior part of the sporozoite. The Em face of the cap is smooth (Figs. 9, 10, and 12) except for little pits (arrows, Fig. 9) and double ridges (arrows, Fig. 10). At the same location, the P faces in m (Fig. 11) or i (Fig. 12) show clear paths bordered with lines of IMP (arrows, Figs. 11 and 12). Remnants of the Pe face stay on the junction of sutures with the cap (arrowheads, Figs. 9 and 12). $\times 60\ 000$.

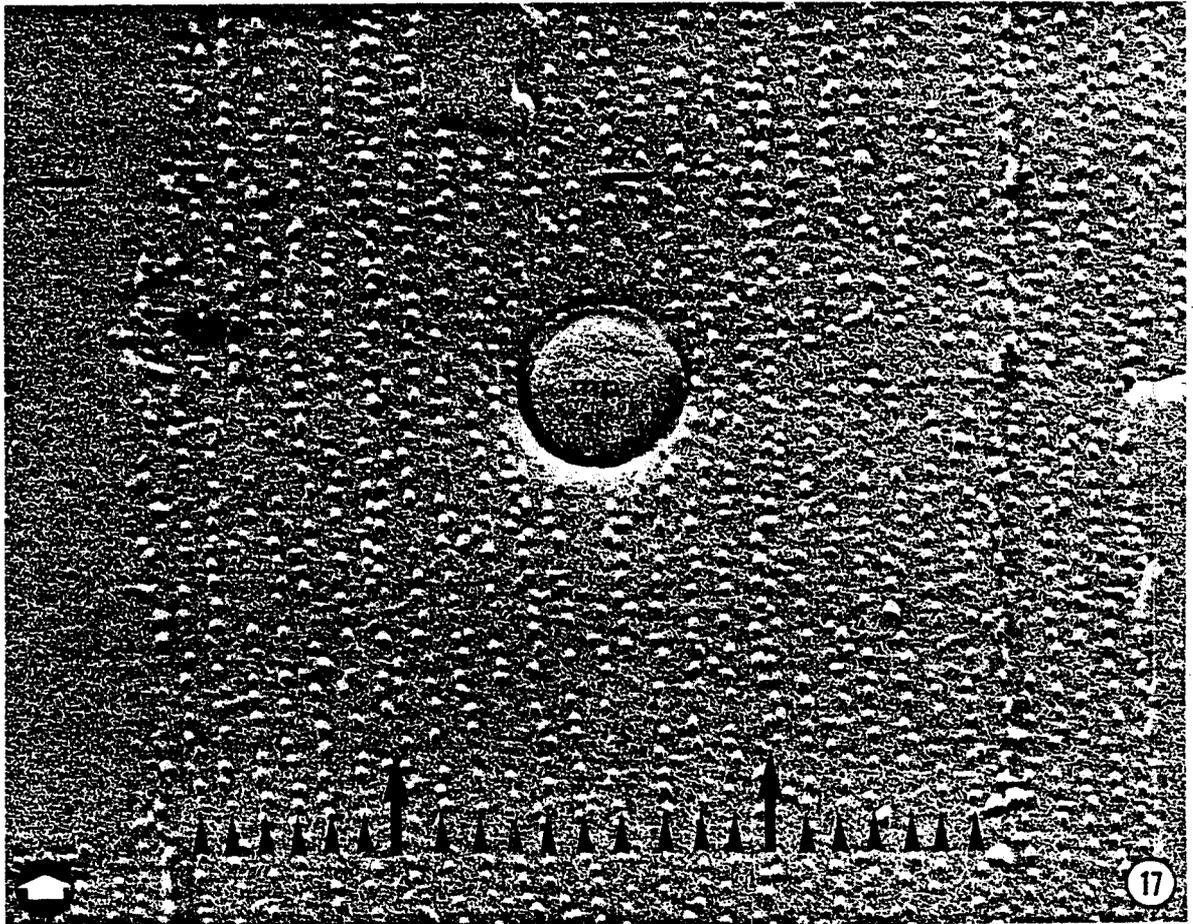
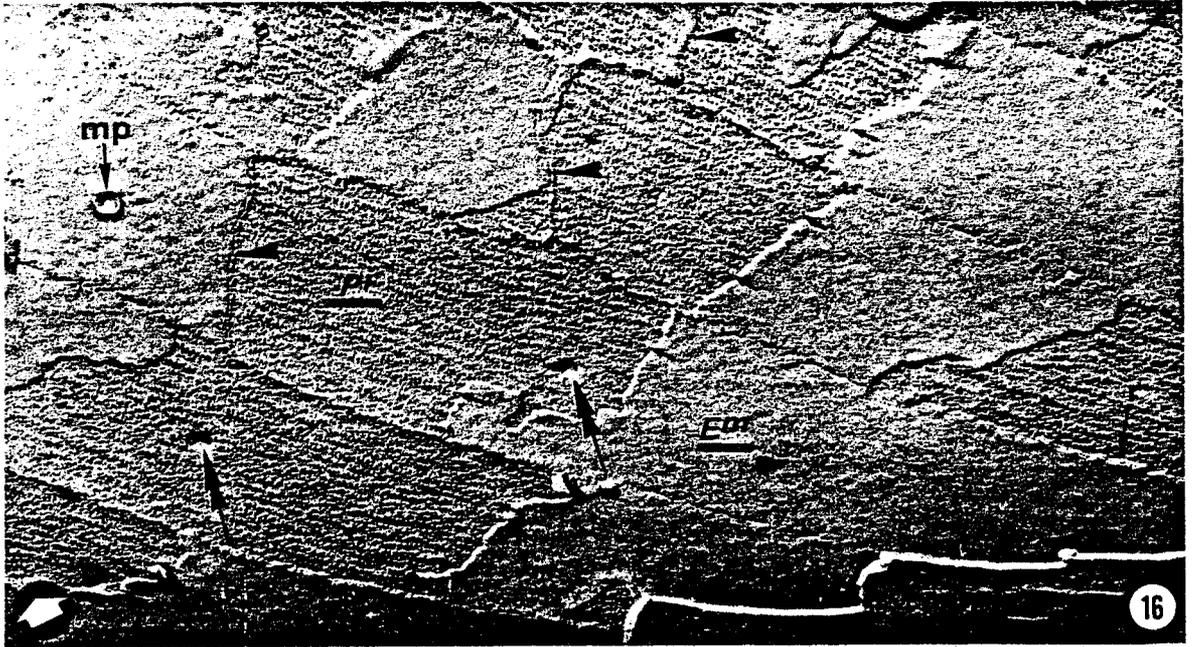
BUS
LILLE



FIGS. 13 AND 15. Complementary fracture faces (Fig. 13, convex; Fig. 15, concave) of the posterior extremity of the sporozoite. The sutures converge in a turbine-like fashion. On both replicas, the number of strips can be estimated to be $13 \times 60\ 000$.

FIG. 14. General view showing the rhoptries (R), thus defining the posterior side (arrowhead). $\times 10\ 000$.

BUS
LILLE



SIMS
LILLE

appeared on the freeze fracture of Sporozoa, they have either dealt with intracellular stages (17, 20, 40) or have given few data (43), and thus most of the pictures we obtained show a previously unknown aspect of the coccidian sporozoite. A parallel study of *Toxoplasma* and *Sarcocystis* zoites (28) confirms most of the results on *Eimeria*.

Two levels of investigation are involved in this study: first, the general structure of the pellicle, to be compared with the previous cytological findings; and second, the structure of the membranes, to be discussed in a larger view, with respect to our present knowledge on cell membranes.

1. Pellicle

The three-membranous structure of the pellicle is confirmed, as well as the circular opening of the inner complex at the apical level, where sections show apical rings (9). More original is the observation of an ordered structure of the inner membrane complex. This gives a shape to the "collapsed vesicles" of Vivier and Petitprez (46) in demonstrating that they are in fact plates organized in a system of longitudinal strips and of an anterior truncated conical cap. This is also observed in *Toxoplasma* and *Sarcocystis* (28) and is probably the explanation for the ancient descriptions of an "argyrome" (silver impregnation) in various Sporozoan zoites (8, 14, 19, 31, 41). These authors demonstrated at the surface of these organisms a delicate net of longitudinal fibrils joined by transverse bridges. They could not decide which structure was responsible for the silver-induced ornamentation, and thus could not explain its exact meaning; however, de Puytorac (31) described it as possible junctions between

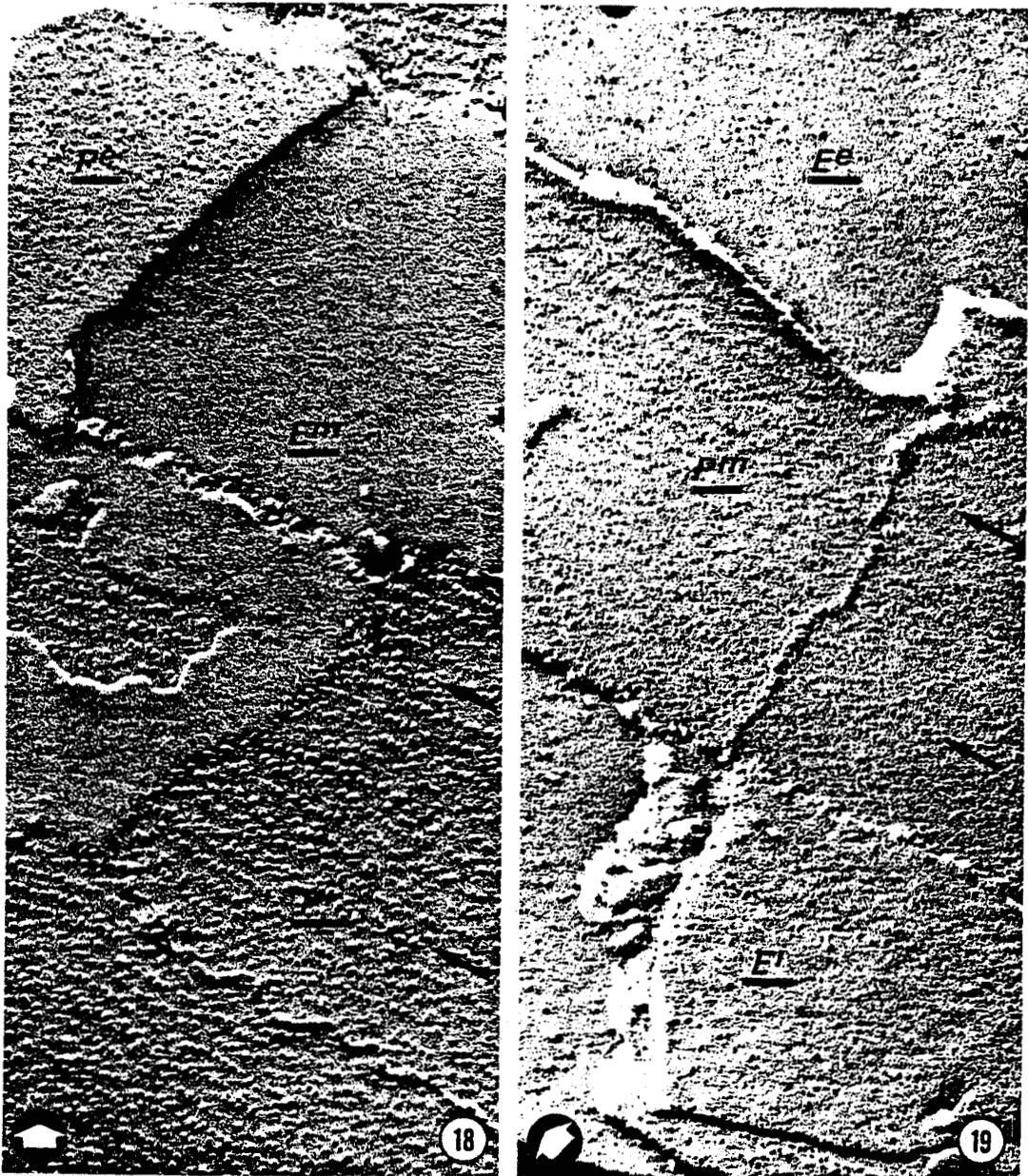
subpellicular vesicles, by analogy with the Ciliates where the argyrome occurs and where a system of endoplasmic cisterns underlining the plasmalemma is known. We have tried the silver impregnation technique on *Eimeria nieschulzi* sporozoites and obtained an argyrome: The very small size did not allow a very accurate count of the lines with the light microscope, but we obtained an estimate close to 13, which is the number of sutures on replicas.

Another set of previous observations is consistent with the present findings and gives an idea of how the inner complex might be built. It comes from the works on Eimerian schizogony (13, 33) where the association between each pair of subpellicular microtubules and a crescent-shaped patch of the inner membrane complex during the genesis of merozoites is described. These patches then flatten under the plasmalemma and join together as the zoite matures. The coincidence between the number of strips (13), and half the number of microtubules (which is 26 in *Eimeria nieschulzi* sporozoites, unpublished observations) is also found here, and thus a similar method of genesis of the sporozoite IMC may be expected. Furthermore, the relative positions of subpellicular microtubules in the merozoites of *Eimeria necatrix* [Dubremetz, (13), Fig. 32] are exactly the same as those of main lines of IMP and strips on the replicas observed here, and thus each of these main lines is very likely to overlay a subpellicular microtubule. This probable association will be discussed later.

The twisting of strips recalls the turbine-like pattern of the microtubules during schizogony (13). It is also observed with silver impregnation. Its variable degree led us to think that the twisting movements

FIG. 16. Large fracture through the inner complex showing the alignments of IMP in the Pi face and the regularly spaced main lines (arrows). Various aspect of fractures of the sutures are observed (note the small ridge, r, between Em and Pi). One micropore (mp) and two presumptive ones (double arrows) are observed, as well as transverse sutures (arrowheads). $\times 45\ 000$.

FIG. 17. Detail of the Pi face in one strip demonstrating the high order of IMP distribution and the location of a micropore; this strip has 23 lines (arrowheads), two of which have twice as many IMP as the others (arrows). $\times 150\ 000$.



FIGS. 18 AND 19. Complementary replicas of the three membranes of the pellicle to show the relative particle distribution in the fracture faces. The less distinct appearance of the Pm compared to Pi is evident although both have alignments and main lines (arrows). $\times 100\ 000$.

frequently observed on living sporozoites might be at least in part responsible for the helical disposition.

Micropores are observed rather often although their number per zoite is currently considered to be very low (1 or 2, 29, 38).

Recent works, however, give higher estimates for these structures in Eimerian motile stages (42). The present study demonstrates their constant localization in the axis of the strips; their frequency may be as high as one per strip (Fig. 16). However, some of



the pits observed are smaller than true micropores and might be sites where these structures develop only after the penetration of the host cell [when these supposed cytostomes are believed to start functioning (42)]. If this is true, the pits observed in the apical cap might have the same significance, as suggested during the genesis of *Eimeria necatrix* merozoites (13, Fig. 12).

No relationship or junction is known between the plasmalemma and the inner complex of Sporozoa. However, some kind of adhesiveness seems to occur between the Pe and m layers over the places where the sutures between strips join the apical cap, although no specialized structure can be detected at this level in the fracture faces. This phenomena might be due to differentiation of the membrane surfaces not revealed by the present technique. They would correspond with the subcircular structures observed at the same level in negatively stained *Sarcocystis* zoites (24) where similar formations occur in freeze fracture preparations (28).

2. Membranes

(A) *Plasmalemma*. The size and almost random distribution of IMP in both fracture faces of the sporozoite plasmalemma and their comparatively higher density in the P face are not significantly different from those observed with most eukaryotic cells. The even distribution is only disturbed by the short lines of IMP running parallel with the underlying plates. This indicates a common preferred orientation for the three layers of the pellicle. However, the irregular occurrence length and localization of these rows contrast with the perfect ordering of the inner complex. We are inclined to consider them as the fixed expression of a dynamic process (aggregation and movement of those IMP within the bilayer) whereas the regular lines of the underlying layers would represent a more permanent design. A connection between these rows and the gliding motion of the

sporozoite may exist and needs to be further investigated.

The apical rosette is the other departure from the random distribution of IMP in the plasmalemma. A very similar structure has been described in Ciliates at the attachment site of mucocysts (35) or trichocysts (36, 22) on the plasma membrane. More recently, the haptocysts of Suctorians (4) and the extrusomes of some Actinopoda (10) have proven to be associated with comparable particle arrays. In all these Protozoa, the rosette is the place where the membrane of a specialized cytoplasmic vesicle fuses with the plasmalemma to discharge its contents into the external medium. Finding such an organelle at the very apex of the sporozoite, i.e., where the underlying rhoptries are supposed to expell some kind of material to help in penetrating the host cell (38), calls very strongly for the same interpretation. The accumulating evidence for a secretory function of rhoptries (16) lends further support to this view. However, some points still must be elucidated before this hypothesis can be accepted. First, sporozoites are well known for possessing more than one rhoptry (38) and thus should possess more than one rosette unless the rhoptries can successively come into contact with it. Second, the rosette is located exactly over a small vesicle of 40 nm which is very often (and probably always) present at the very apex of Sporozoan zoites, although most authors have not given very much attention to it (see 13). This structure is observed in some replicas (Fig. 7), surrounded with a irregular circle of what might be either the tips of rhoptry ducts or vesicles such as those occurring in *Toxoplasma* (47). The irregular ring of IMP which surrounds the rosette might thus also account for an eventual zone of apposition between secretory formations and the plasmalemma; it does exist over the trichocysts where it is believed to be the limit for membrane fusion (5), although it is not essential for exocytosis. As already proposed for the rosettes (36), this differentia-

tion might be regarded as multifunctional and could be a receptor processor system which allows the parasite to recognize a potential host cell and to initiate the eventual rhoptry secretion or any other process involved in host cell penetration. Our knowledge of sporozoite physiology is still too rudimentary to allow further speculations on the observed structures. Among many other possibilities, freeze fracture of other sporozoan zoites and of organisms during and after penetration of the host might help in solving those questions.

(b) *Inner membrane complex.* The extreme order of IMP distribution in the inner membranes is a very unusual feature. Among the previous observations of zoites, only the lattice occurring in negatively stained *Sarcocystis* (24) or the alignment of ribosomal particles along the inner membrane complex of developing sporozoites of the gregarin *Diplauxis* (26, 30) recalls such a degree of organization. The lateral period of the *Sarcocystis* lattice seem to be of the same order as the spacing between IMP rows in the P faces (about 30 nm). A homology has sometimes been observed between negative staining lattices and freeze fracture IMP distribution in synaptic plates (7, 21); it might be the case here, but a more precise study of the *Sarcocystis* staining and replicas is needed to make valuable comparisons. The same holds true for the *Diplauxis* alignments, which might also reflect an intramembranous order, yet to be described in Gregarins. In Eimerian zoites, no previous observation can account for these rows. A parallel orientation with the subpellicular microtubules is, however, very likely to occur, as well as some kind of relationship between the latter and the main lines of IMP. In cilia, linear arrays of IMP are described, which are thought to be linkers of underlying doublets of microtubules playing a role in the beating pattern (37). Although less ordered, a similar relationship occurs in *Trypanosoma* (15), where other studies have demonstrated that the association between plasmalemma

and microtubules persist after lysis of the cell (11); *Eimeria* sporozoites behave the same way when ghosts are produced (unpublished observations). Thus the main lines might be the intramembranous expression of an association between the inner membrane complex and the subpellicular microtubules. Except on rare occasions, thin sectioning has not shown bridges between these two entities. This is not surprising since the same occurs in *Trypanosome* (11), and as observed by Allen (2), linkage may be due to filamentous material which is far more difficult to observe. In the anterior part of zoites, some authors have found lateral "horns" on microtubules (13, 27) which might be related with the two lines which replace every main line in the apical cap. Their spacing of 30 nm fits well with this interpretation.

For all the linear arrays occurring between the main lines, it is far more difficult to assign significance, as nothing outside the membrane is known to correspond with them. The rather uniform size of IMP, at least in the Pi face might mean that they all represent the same integral macromolecule. Their very unusual partition coefficient shows an almost exclusive affinity of these IMP for the P faces, thus toward the exterior of the "collapsed vesicle." Linear arrays occur in blue-green algae chloroplast membranes, but they are related to phycobilisomes aligned on the outer surface (18); plaques of aligned particles have been observed in the plasmalemma of *Paramecium* (3) where they are given a sensory more than a structural function. In *Eimeria*, among the possible meanings for these arrays is a structural role, first proposed for the inner membrane complex by Schrevel (39): They might act as linkers between both membranes of the complex. Their longitudinal disposition calls also for a possible participation in the gliding motion of the zoite, being a directional reference for the as yet unknown mechanism involved.

The observed differences between both membranes of the inner complex in IMP

size as well as in partition coefficient (Tables 1 and 2) are explainable in terms of the relative association of integral proteins with the lipid bilayer. The particles of the medium membrane would be more deeply anchored in the P face than those in the inner membrane; they thus would look smaller and less of them would be kept by the E face during the fracture. An unequal level of cleavage through the bilayer would also explain that situation. In both cases, a structural difference seem to occur between these two membranes, which is not surprising, according to their asymmetrical status between the plasmalemma and cytoplasm.

Another difference has been found, which concerns the IMP density in Pm and Pi; however, the difficulty of distinguishing the IMP in the Pm face, where they often barely emerge from a pebbly surface, leads us to be very cautious with the results of these counts. Background noise might be the only reason for the differences observed. Further studies and comparison with other species are still necessary to

clarify this point.

The apical cap does not show the same internal structure as the strips. This seems to be related mainly to different relationships between the inner membrane complex and the subpellicular microtubules in the two domains. The observation of living sporozoites, especially during the penetration process, shows that the anterior part of the organism is able to undergo successive elongations and retractions. That part of the zoite might be more flexible than the remainder of the body. A sliding of the microtubule system along the main lines might stretch the apical cap. Freeze fracture of penetrating sporozoites is needed to help clarify this point. The genesis of the organisms might also be responsible for differences, as the orientation of the cap does not need as many guides as are required for the positioning of the growing strips with respect to the elongating microtubules. A two-step mechanism would be involved, which needs to be further investigated.

Although the strips are perfectly joined

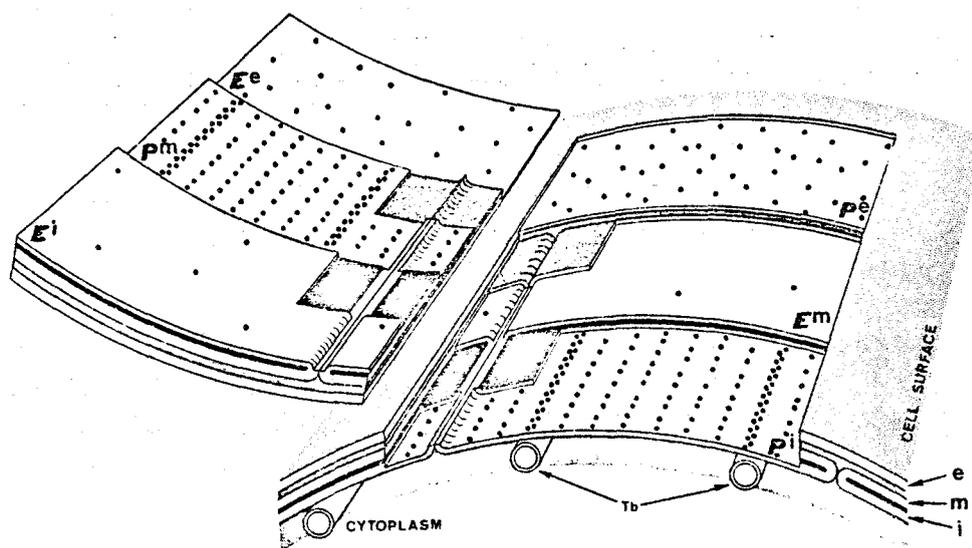


FIG. 20. Summarizing diagram of the sporozoite pellicle in the strip area as revealed by freeze fracture. The complementary fracture faces are shown, with their possible relationships with the subpellicular microtubules (tb). The structure of the inner complex in the apical cap area differs in some details from the one shown here (see text). Some membrane surfaces not revealed by the technique have been artificially exposed to help in the understanding of the diagram.

together, no membrane fusion seems to occur between them. At least a continuity between the hydrophobic layers of two adjacent strips can be excluded: The fracture between an E and a P face would never give the thin dense ridge often observed (Figs. 2 and 15). On the contrary, the width of this ridge (about 6 nm) is a good thickness for two half-membranes. The line of almost joined IMP occurring at the suture level might represent a primitive kind of membrane "junction." The accumulation of larger aggregates at the posterior extremity is probably the radiating spokes present at the same level on negative stainings (24, 25, 34).

The highly complex organization of this pellicle has thus been demonstrated. A schematic interpretation is given in Fig. 2C. As is true for many of the other aspects of the Sporozoan zoite ultrastructure, this has still to be ascribed a functional significance. The progress in the understanding of the structure of these organisms which has been achieved by the present technique raises more questions than answers and calls for investigations. Whereas most of the previous studies have dealt with the internal organelles of the sporozoite, freeze fracture focuses attention on the membranes, which probably have very important functions in parasite biology still waiting to be discovered.

REFERENCES

1. AIKAWA, M., *J. Cell Biol.* **35**, 103 (1967).
2. ALLEN, R. D., *J. Cell Biol.* **64**, 497 (1975).
3. ALLEN, R. D., *J. Protozool.* **23** (2), 10A (1976).
4. BARDELE, C. F., *J. Protozool.* **23** (2), 32A (1976).
5. BEISSON, J., LEFORT-TRAN, M., POUPHILE, M., ROSSIGNOL, M., AND SATIR, B., *J. Cell Biol.* **69**, 126 (1976).
6. BRANTON, D., BULLIVANT, S., GILULA, N., KARNOVSKI, M. J., MOOR, H., MUHLETHALER, K., NORTHCOTE, D. H., PACKER, L., SATIR, B., SATIR, B., SPETH, V., STAHELIN, L. A., STEERE, R., AND WEINSTEIN, R. S., *Science* **190**, 54 (1975).
7. CARTAUD, J., BENEDETTI, F. L., COHEN, J. B., MEUNIER, J. C., AND CHANGEUX, J. P., *FEBS Lett.* **33**, 109 (1973).
8. CHATTON, E., *C.R.H. Acad. Sci. Ser. D* **204**, 633 (1937).
9. COLLEY, F. C., *J. Protozool.* **14**, 217 (1967).
10. DAVIDSON, L. A., *Cell Tissue Res.* **170**, 353 (1976).
11. DE SOUZA, W., *J. Microsc. Biol. Cell.* **25**, 189 (1976).
12. DORAN, D. J., AND FARR, M. M., *J. Protozool.* **9**, 154 (1962).
13. DUBREMETZ, J. F., *J. Protozool.* **22**, 71 (1975).
14. HENNERE, E., *Arch. Zool. Exp. Gen.* **105**, 179 (1965).
15. HOGAN, J. C., AND PATTON, C. L., *J. Protozool.* **23**, 205 (1976).
16. JENSEN, J. B., AND EDGAR, S. A., *J. Parasitol.* **62**, 988 (1976).
17. KREIER, J. P., GRAVELY, S. M., SEED, T. M., SMUCKER, R., AND PFISTER, R. M., *Tropenmed. Parasitol.* **26**, 9 (1975).
18. LEFORT-TRAN, M., COHEN, G., AND POUPHILE, M., *J. Ultrastruct. Res.* **44**, 199 (1973).
19. LUDVIK, J., *Z. Parasitenk.* **19**, 311 (1959).
20. MESZOEI, C. A. M., STEERE, R. L., AND BAIER, G. F., *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* **39**, 149 (1972).
21. ORCI, L., PERRELET, A., AND DUNANT, Y., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 307 (1974).
22. PLATTNER, H., MILLER, F., AND BACHMANN, L., *J. Cell Sci.* **13**, 687 (1973).
23. PORCHET, E., *Ann. Biol.* **11**, 413 (1972).
24. PORCHET, E., *J. Protozool.* **22**, 214 (1975).
25. PORCHET, E., *Protistologica* **12**, 613 (1976).
26. PORCHET, E., AND FISHER, A., *Protistologica* **9**, 437 (1973).
27. PORCHET, E., AND RICHARD, A., *Protistologica* **7**, 227 (1971).
28. PORCHET, E., AND TORPIER, G., *Z. Parasitenk.* **54**, 101 (1977).
29. PORCHET, E., AND VIVIER, E., *Ann. Biol.* **10**, 77 (1971).
30. PRENSIER, G., *C.R.H. Acad. Sci. Ser. D* **271**, 2329 (1971).
31. PUYTORAC, P. DE, *C.R.H. Acad. Sci. Ser. D* **240**, 2447 (1955).
32. REGER, J. F., *J. Protozool.* **14**, 488 (1967).
33. ROBERTS, W. L., HAMMOND, D. M., ANDERSON, L., AND SPEER, C. A., *J. Protozool.* **17**, 584 (1970).
34. RYLEY, J. F., *Parasitology* **59**, 67 (1969).
35. SATIR, B., SCHOOLEY, C., AND SATIR, P., *Nature (London)* **235**, 53 (1972).
36. SATIR, B., SCHOOLEY, C., AND SATIR, P., *J. Cell Biol.* **56**, 153 (1973).
37. SATTLER, C. A., AND STAHELIN, L. A., *J. Cell Biol.* **62**, 473 (1974).
38. SCHOLTYSECK, E., AND MEHLHORN, H., *Z. Parasitenk.* **34**, 97 (1970).
39. SCHREVEL, J., *C.R.H. Acad. Sci. Ser. D* **267**, 746 (1968).

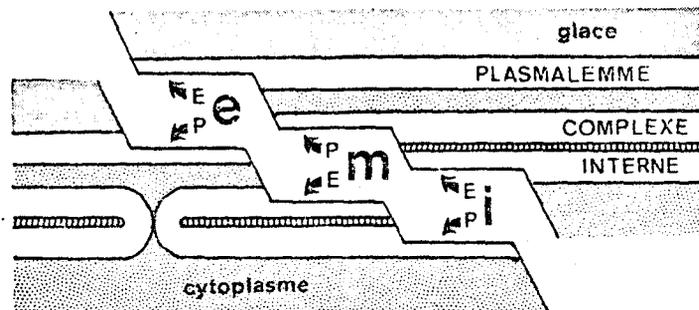
40. SEED, T., PFISTER, R., KREIER, J., AND JOHNSON, A., *Exp. Parasitol.* **30**, 73 (1971).
41. SENAUD, J., *Protistologica* **3**, 167 (1967).
42. SENAUD, J., CHOBOTAR, B., AND SCHOLTYSECK, E., *Tropenmed. Parasitol.* **27**, 145 (1976).
43. SULZER, A. J., STROBEL, P. L., SPRINGER, E. L., ROTH, I. L., AND CALLAWAY, C. S., *J. Protozool.* **21**, 710 (1974).
44. VIVIER, E., *Ann. Inst. Pasteur Lille* **14**, 217 (1963).
45. VIVIER, E., DEVAUCHELLE, G., PETITPREZ, A., PORCHET, E., PRENSIER, G., SCHREVEL, J., AND VINCKIER, D., *Protistologica* **6**, 127 (1970).
46. VIVIER, E., AND PETITPREZ, A., *J. Cell Biol.* **43**, 329 (1969).
47. VIVIER, E., AND PETITPREZ, A., *Protistologica* **3**, 199 (1972).

PROTISTOLOGIE. — *Structure de la pellicule du sporozoïte de Plasmodium yoelii : étude par cryofracture.* Note (*) de Jean-François Dubremetz, Gérard Torpier, Pierre Maurois, Gérard Prensier et Robert Sinden, présentée par Pierre-Paul Grassé.

La cryofracture des sporozoïtes de *Plasmodium* révèle la structure des trois membranes constituant leur pellicule. Le plasmalemme est de type classique; la densité en particules intramembranaires (P.I.M.) y est plus grande dans les formes des glandes salivaires que dans celles des oocystes. Une rosette apicale est présente. Le complexe membranaire interne comporte une seule suture longitudinale. Il montre un alignement régulier des P.I.M. avec des lignes plus denses à l'emplacement des microtubules sous pelliculaires.

Freeze fracturing of Plasmodium sporozoites reveals the structure of their triple membraned pellicle. The plasmalemma is of classical appearance; its intramembranous particle (I.M.P.) density is higher in the salivary glands than in the oocyst forms. An apical rosette is present. The inner membrane complex has only one longitudinal suture; it shows a regular alignment of I.M.P.s with lines of higher particle density along the underlying subpellicular microtubules.

Le sporozoïte de *Plasmodium*, comme la plupart des germes infectieux des Sporozoaires, possède une pellicule trimembranaire composée d'un plasmalemme et d'un complexe membranaire interne, ce dernier étant issu de l'aplatissement de vésicules [1]. Chez plusieurs zoïtes de Coccidies, la cryofracture a mis en évidence au sein de cette pellicule des différenciations remarquables en révélant à ce niveau une grande unité de structure entre les divers organismes étudiés ([2], [3]).



Dénomination des faces de fracture dans la pellicule des germes infectieux de Sporozoaires.

Nous avons voulu savoir dans quelle mesure cette unité serait retrouvée chez le sporozoïte de *Plasmodium* afin de pouvoir mieux dégager les traits fondamentaux de la pellicule des Coccidiomorphes.

Nous avons utilisé *Plasmodium yoelii nigeriensis* entretenu sur *Anopheles stephensi* et Souris C 57 BL. Les organes parasités (estomacs, glandes salivaires) ont été prélevés dans le glutaraldéhyde 2,5 % en tampon cacodylate de sodium 0,1 molaire, 14 à 16 jours après le repas sanguin. Les conditions de cryofracture ont été identiques à celles décrites pour *Eimeria* [3].

L'observation des répliques obtenues permet de reconnaître les trois membranes de la pellicule fracturées selon trois plans de clivage préférentiels (fig. 1, 2). Nous les décrivons selon la terminologie adoptée pour *Eimeria* [3] : les membranes sont désignées par *e* (externe, plasmalemme), *m* (moyenne), *i* (interne), et les faces de fracture par *P* ou *E* selon la nomenclature de Branton et coll. [4] (voir schéma). La désignation des faces tient compte de l'origine vésiculaire du complexe membranaire interne.

Les sporozoïtes ont été observés soit dans les oocystes, au cours de leur développement, soit dans les glandes salivaires, en situation intracellulaire. Dans ce dernier cas, aucune vacuole parasitophore n'a pu être mise en évidence, ce qui confirme les observations antérieures sur coupes [5].

Le plasmalemm (faces P_e et E_e) présente une distribution homogène de particules intramembranaires (P.I.M.), plus abondantes sur la face P comme c'est le cas chez *Eimeria* et *Toxoplasma* ([2], [3]). L'extrémité antérieure du sporozoïte est tronquée en un biseau (*fig. 5*) au centre duquel peut être discerné dans la face P_e un groupe de particules de plus grande taille arrangé en une rosette de diamètre 60 nm (*fig. 4*). Il pourrait s'agir d'un équivalent de la rosette apicale observée à cet endroit chez les autres Coccidies ([2], [3]). Son observation est rendue ici plus difficile par la présence des autres P.I.M. alors que cette zone est plus dégagée dans les genres étudiés antérieurement.

La numération des P.I.M. dans les faces de fracture du plasmalemm (au moyen d'un analyseur d'images M.O.P., Kontron) met en évidence une différence significative entre les deux populations de sporozoïtes (tableau).

TABLEAU

Nombre de P.I.M. par micromètre carré dans le plasmalemm des sporozoïtes de *Plasmodium yoelii nigeriensis* (chaque mesure concerne une surface supérieure à $0,5 \mu\text{m}^2$ répartie sur plus de 10 échantillons).

Faces de fracture..... Origine	P_e	E_e
Oocystes.....	$1\ 390 \pm 280$	183 ± 63
Glandes salivaires.....	$2\ 700 \pm 270$	340 ± 105

Cette modification du plasmalemm au cours du cheminement du sporozoïte à travers l'hôte vecteur constitue un nouveau critère de différenciation qui vient s'ajouter à l'évolution déjà connue du système rhoptries micronèmes [6] et à la variation des caractères antigéniques des sporozoïtes [7] au cours de la même phase du cycle. Bien que leur signification précise reste à définir, ces modifications morphologiques pourraient être en relation avec la maturation du pouvoir infectieux des sporozoïtes, beaucoup plus grand pour les formes salivaires que pour celles des oocystes [8].

Le complexe membranaire interne est remarquable par l'agencement linéaire très régulier des P.I.M. sur les faces P_m et P_i , suivant l'axe du sporozoïte (*fig. 1*). Les particules sont de taille homogène sur chacune de ces faces, mais plus petites (ou moins proéminentes) sur P_m . Les faces E_m et E_i sont presque totalement dépourvues de P.I.M. (*fig. 3*).

EXPLICATIONS DES PLANCHES

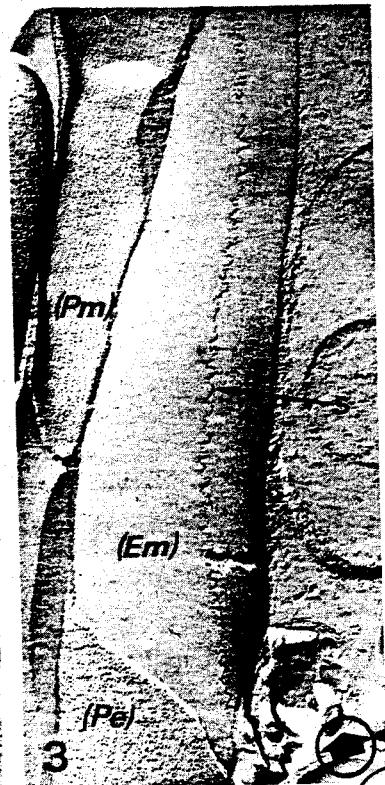
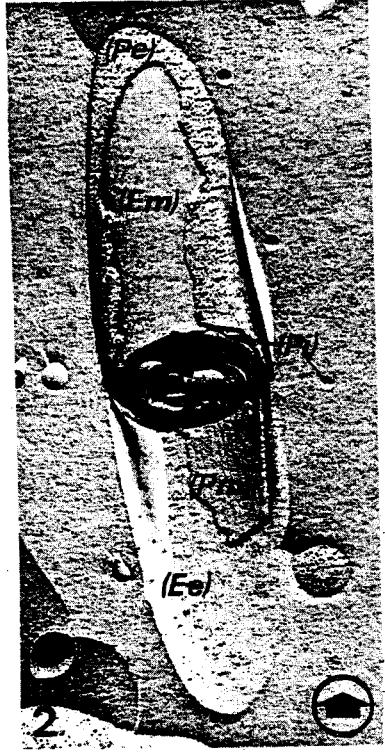
Répliques de cryofracture de sporozoïtes de *Plasmodium yoelii nigeriensis*. La flèche en bas à droite de chaque figure indique la direction d'ombrage (1 à 5 : oocystes; 6 : glandes salivaires).

Planche I

Fig. 1. — Groupe de sporozoïtes où sont représentés les 6 faces de fracture de la pellicule. La suture (s) du complexe membranaire interne est révélée dans deux cellules ($G \times 45\ 000$).

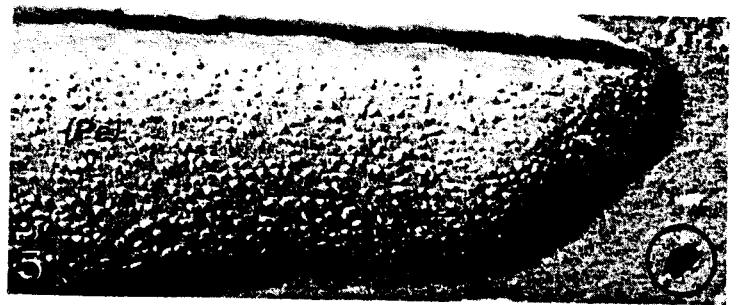
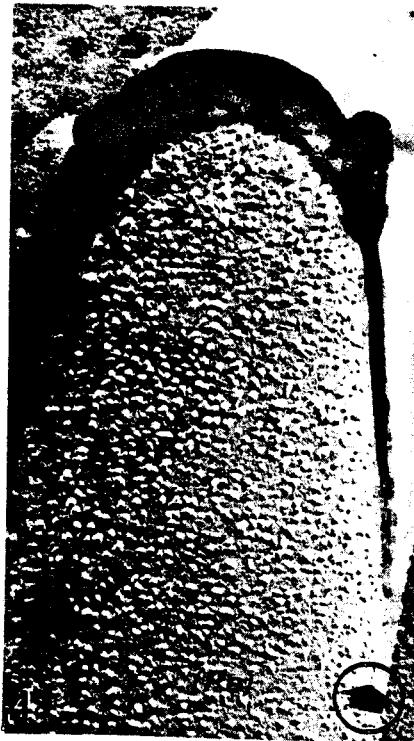
Fig. 2. — Cinq faces de fracture sont exposées chez ce sporozoïte ($G \times 36\ 000$).

Fig. 3. — Fracture de la membrane moyenne montrant la suture du complexe interne, sinuose et semée de particules, s'allongeant selon l'axe du sporozoïte ($G \times 36\ 000$).



BUS
LILLE

PLANCHE II



RIIS
LILLE

Planche II

Fig. 4. — Au centre du biseau peut être distinguée une rosette de 8 + 1 particules de plus grand diamètre (flèches) ($G \times 100\ 000$).

Fig. 5. — L'extrémité antérieure du sporozoïte est tronquée en biseau ($G \times 100\ 000$).

Fig. 6. — Certaines lignes régulièrement disposées de la face P_i sont plus riches en P.I.M. (flèches) ($G \times 100\ 000$).

Fig. 7. — Sporozoïtes (S) intracellulaires dans une glande salivaire ($G \times 20\ 000$).

L'observation détaillée de certaines fractures et la numération des particules permet de mettre en évidence dans la face P_i des lignes de plus grande densité (de l'ordre de 90 P.I.M. par micromètre linéaire, contre 55 environ pour les autres), régulièrement disposées (toutes les trois lignes, dont l'espacement moyen est de 25 nm) sur une partie seulement de la circonférence (certaines zones montrent des alignements de densité uniforme) (fig. 6). Par analogie avec ce qui a été décrit chez les autres Coccidiomorphes, nous pensons que ces lignes particulières pourraient correspondre aux microtubules sous-pelliculaires sous-jacents : l'espacement est de même ordre de grandeur et, par ailleurs, tous les microtubules sauf un sont répartis sur les 2/3 de la circonférence. La moins bonne définition des répliques de la face P_m (déjà signalée lors de l'étude des sporozoïtes d'*Eimeria*) n'a pas permis d'en effectuer une étude aussi précise, et la présence éventuelle d'alignements particuliers dans cette face reste à élucider.

Une autre caractéristique remarquable du complexe membranaire interne est le nombre très réduit des sutures qu'il renferme en comparaison de celui existant chez les autres Coccidies ([2], [3]). Ces sutures semblent correspondre à l'apposition des bords des vésicules aplaties qui sont à l'origine du complexe interne. Il semble en fait que le sporozoïte de *Plasmodium yoelii nigeriensis* ne possède qu'une seule suture, parallèle aux alignements de P.I.M. des faces P_m et P_i (fig. 3).

Le complexe membranaire interne serait donc, chez cette espèce, formé d'une seule plaque enroulée en cylindre sous le plasmalemme. La présence d'une structure de type « cape apicale » identique à celle décrite dans la zone antérieure du complexe interne des autres Coccidies ([2], [3]) n'a pu être mise en évidence.

La schizogonie de *Plasmodium* a déjà été étudiée par cryofracture ([9], [10], [11]). Il est difficile de comparer les images publiées à celles que nous présentons car il s'agit plutôt de trophozoïtes ou de schizontes et peu de mérozoïtes ont été observés. Il semble toutefois que ceux-ci présentent certaines des caractéristiques exposées ici, en particulier une répartition comparable des densités en particules intramembranaires sur les faces de fracture [11], et des alignements dans le complexe interne bien que ceux-ci aient été assimilés à des microtubules [9]. Rien ne rappelle toutefois le réseau hexagonal décrit dans ce complexe chez *Plasmodium gallinaceum* par Seed et coll. [10] ; mais ces auteurs utilisaient un matériel non fixé sur lequel l'action du glycérol avant congélation n'a pas été évaluée.

Ces observations préliminaires mettent en évidence au niveau de la pellicule l'étroite similitude déjà connue pour les autres structures des zoïtes de Coccidiomorphes. Outre la rosette apicale, dont le rôle dans l'interaction avec la cellule hôte reste à élucider, la caractéristique la plus originale de cette pellicule est l'alignement des P.I.M. parallèlement à l'axe du zoïte dans les feuilletts protoplasmiques du complexe membranaire interne. Il s'agit là d'une particularité cytologique intéressante, d'autant plus que la taille homogène des particules permet de penser à une unité répétitive. On peut s'interroger sur la signification fonctionnelle d'un tel agencement : la direction préférentielle ainsi définie correspond à celle des mouvements de glissement du sporozoïte, mode de déplacement exclusif de ces

organismes qui suppose une interaction entre la pellicule et le support. Certaines structures révélées par cryofracture pourraient ainsi intervenir dans le mécanisme encore inconnu de cette motilité originale.

D'autre part, la mise en évidence d'un remaniement du plasmalemme accompagnant la maturation du pouvoir infectieux des sporozoïtes évoque la possibilité d'une intervention membranaire dans ce processus encore mal compris et renforce l'intérêt de l'étude de la pellicule de ces parasites et de son rôle lors de la pénétration dans la cellule hôte.

(*) Remise le 29 janvier 1979.

- [1] E. PORCHET et E. VIVIER, *Ann. Biol.*, 10, 1970, p. 77.
- [2] E. PORCHET et G. TORPIER, *Z. Parasitenk.*, 54, 1977, p. 101.
- [3] J. F. DUBREMETZ et G. TORPIER, *J. Ultrastruct. Res.*, 62, 1978, p. 94.
- [4] D. BRANTON et coll., *Science*, 190, 1975, p. 54.
- [5] C. R. STERLING, M. AIKAWA et J. P. VANDERBERG, *J. Parasitol.*, 59, 1973, p. 593.
- [6] R. E. SINDEN et P. C. C. GARNHAM, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 67, 1973, p. 631.
- [7] J. P. VANDERBERG, R. S. NUSSENZWEIG, Y. SANABRIA, R. NAWROT et H. MOST, *Proc. Helminth. Soc. Washington*, 39, 1972, p. 514.
- [8] J. P. VANDERBERG, *J. Parasitol.*, 21, 1975, p. 43.
- [9] C. A. M. MESZOELY, R. L. STEERE et G. F. BAHR, *Proc. Helminth. Soc. Washington*, 39, 1972, p. 149.
- [10] T. M. SEED, M. AIKAWA, R. B. PRIOR, J. P. KREIER et R. M. PFISTER, *Z. Tropenmed. Parasitol.*, 24, 1973, p. 525.
- [11] D. J. MCLAREN, L. H. BANNISTER, P. I. TRIGG et G. A. BUTCHER, *Bull. O.M.S.*, 55, 1977, p. 197.

J. F. D. et G. P. : E.R.A. n° 184, C.N.R.S., Université de Lille-I,
Biologie, S.N. 3, B.P. n° 36, 59650 Villeneuve-d'Ascq;

G. T. : U. n° 167, I.N.S.E.R.M., Institut Pasteur, 59012 Lille;

P. M. : U. n° 42, I.N.S.E.R.M., C.E.R.T.I.A., 59650 Villeneuve-d'Ascq;

R. E. S. : Imperial College Field Stn, Ascot Berks, SL5 7DE, G.-B.

ANNEXE 2 : PLANCHES

PLANCHE 1 :

1. 2. 3. : Suspensions de zoïtes purifiés.

(contraste de phase, X 250)

1 - bradyzoïtes de *Sarcocystis tenella*.

2 - tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*.

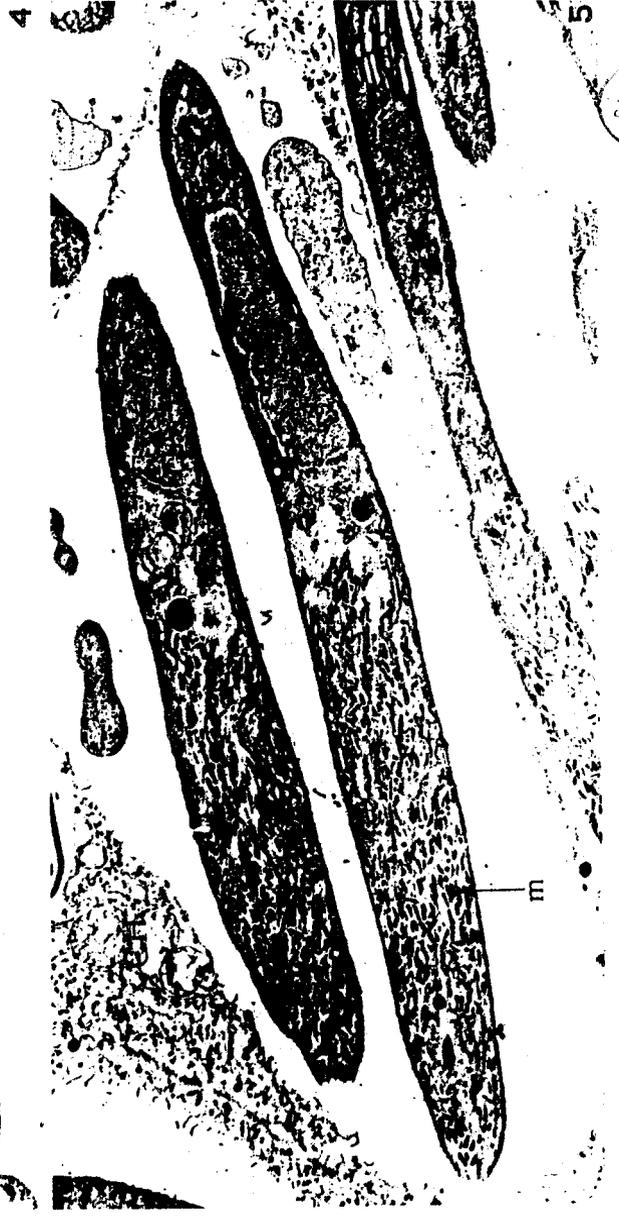
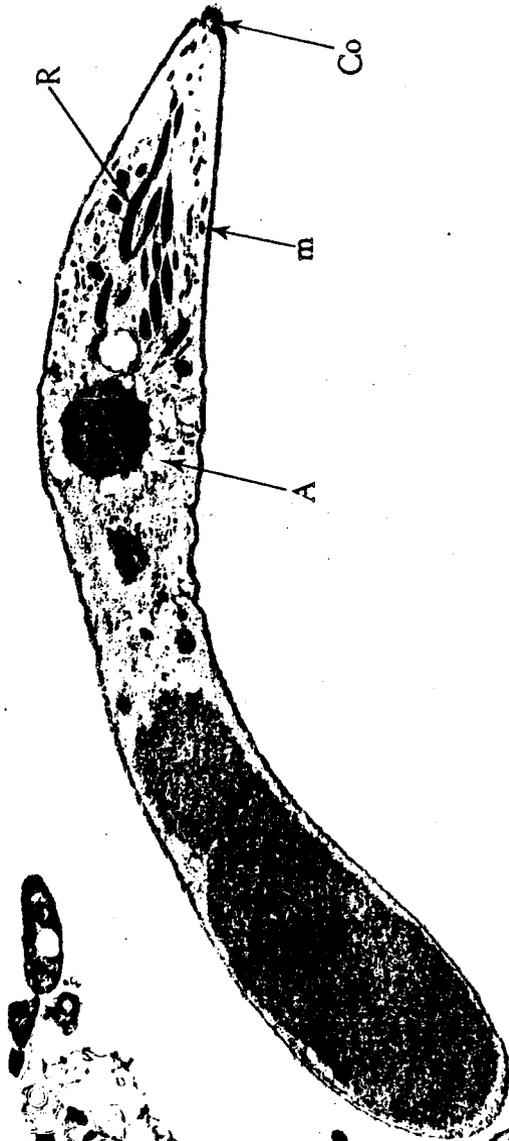
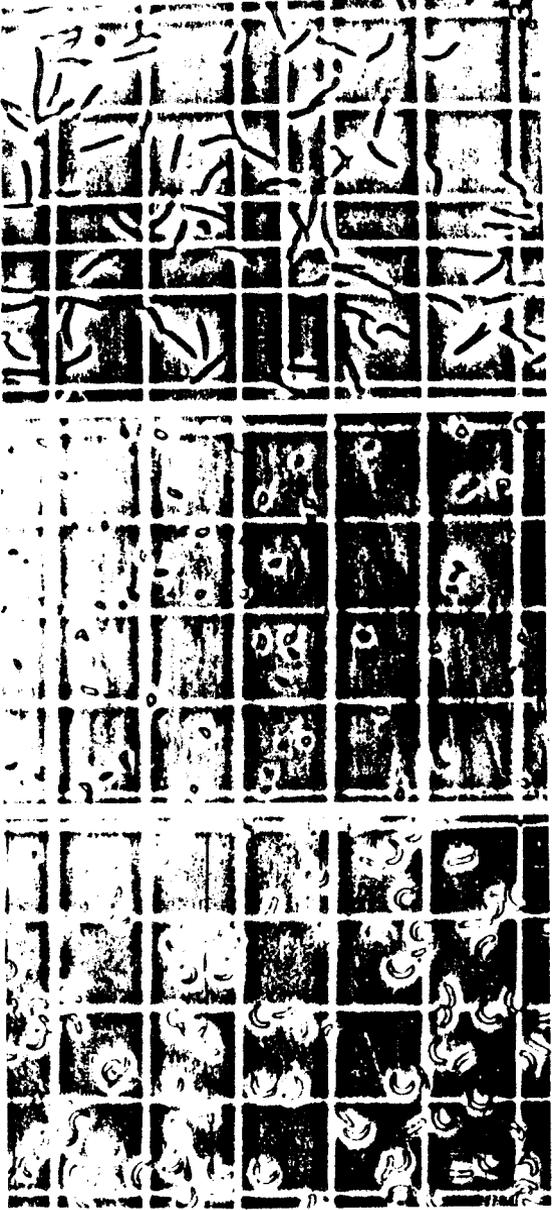
3 - Mérozoïtes III d'*Eimeria nieschulzi*.

4. Sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi*, coupe parasagittale.

(X 13 000)

5. Mérozoïtes III d'*Eimeria nieschulzi* dans l'épithélium intestinal de rat.

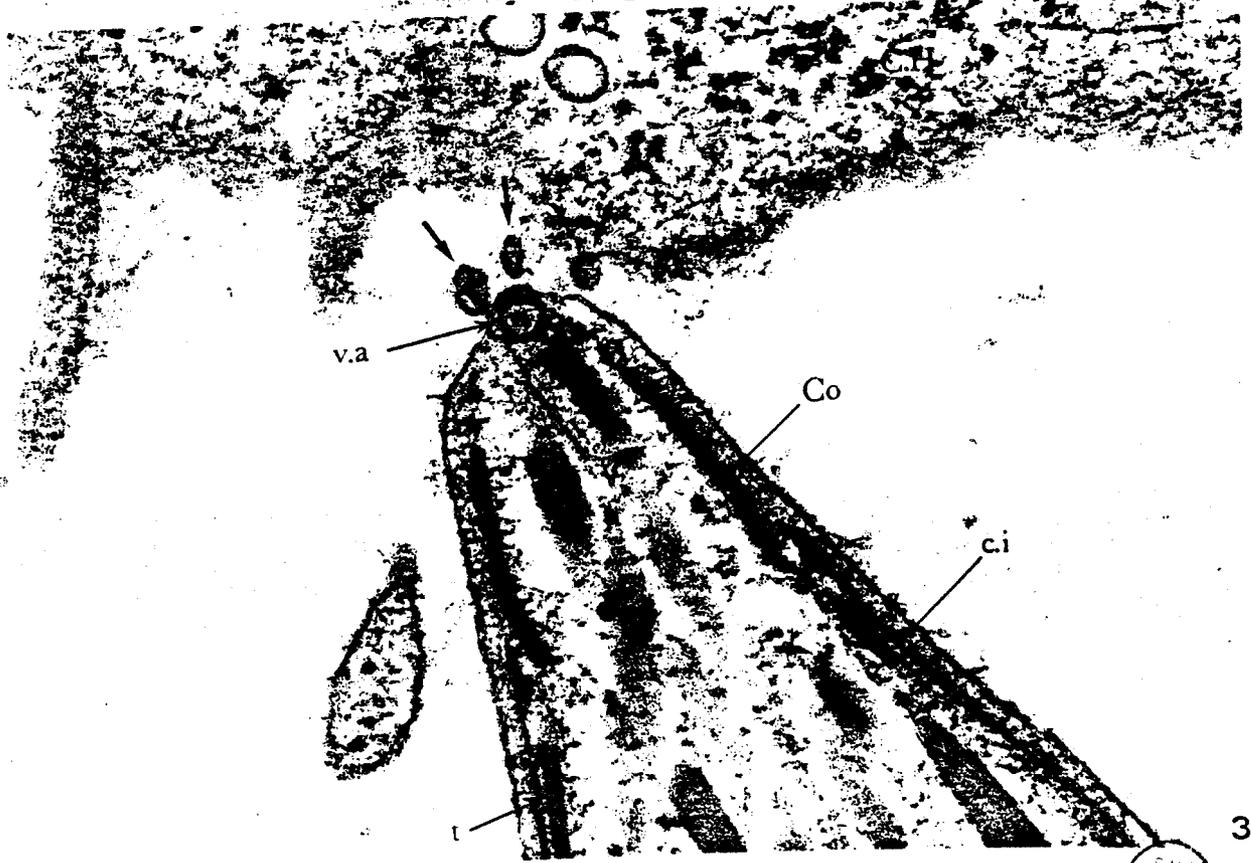
(X 10 000).



BUS
LILLE

PLANCHE 2 : INTERACTION BRADYZOÏTE DE *SARCOCYSTIS TENELLA* CELLULES BHK.

- 1 - Début de pénétration (flèche:conoïde)
(X 10 000)
- 2 - Stade identique à 1 en cryofracture, exposant une petite surface de la membrane vacuolaire en formation.
(X 37 000).
- 3 - Image évoquant la phase précoce d'interaction zoïte - cellule. La vésicule apicale est proéminente. De petites vésicules sont présentes entre le zoïte et le plasmalemma hôte (flèche).
(X 100 000).

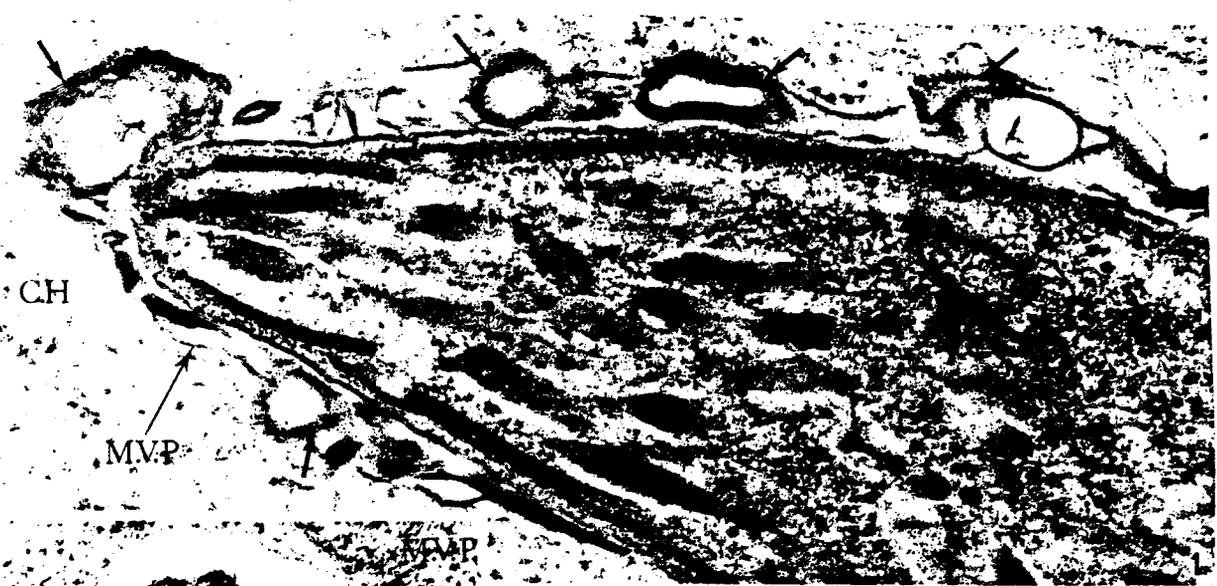


BUS LILLE

3

PLANCHE 3 : INTERACTION BRADYZOÏTE DE *SARCOCYSTES TENELLA* - CELLULES BHK.
ZOÏTES EN COURS DE PENETRATION.

- 1 - Noter l'abondance de profils myéliniques (flèches) entre zoïtes et membrane vacuolaire en formation.
(X 75 000).
- 2 - Noter les zones de contact étroit (flèches) entre zoïte et membrane vacuolaire en formation.
(X 60 000)
- 3 - Profil myélinique (flèche) dans une vacuole claire à l'intérieur d'un zoïte en cours d'invasion.
(X 100 000)
- 4 - Projection lamellaire (flèche) semblant émaner de l'apex du zoïte vers la vacuole parasitophore en formation, dans laquelle sont présentes de petites vésicules (têtes de flèches).
(X 80 000)



OTIS
LILLE

PLANCHE 4 : INTERACTION BRADYZOITES DE *SARCOCYSTIS TENELLA* - CELLULES
BHK (OU HELA, FIG. 2)

1 - Zoïte terminant la traversée d'une cellule : entre la membrane de la vacuole parasitophore et le plasmalemme est emprisonné un groupe de vésicules(*).

(X 100 000)

2 - Zoïte pénétrant une cellule Hela. Le plasmalemme du zoïte semble interrompu sur une courte distance à l'extrémité apicale (flèche)

(X 110 000)

3 - Zoïte sortant d'une cellule (un profil myélinique est encore présent à côté du conoïde). Des vésicules identiques à celles de la fig 1 sont libérées dans le milieu(*).

(X 50 000)

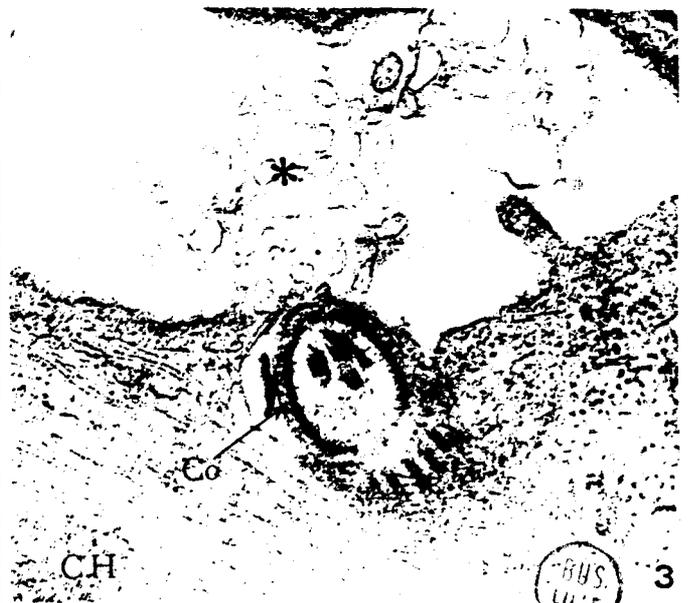
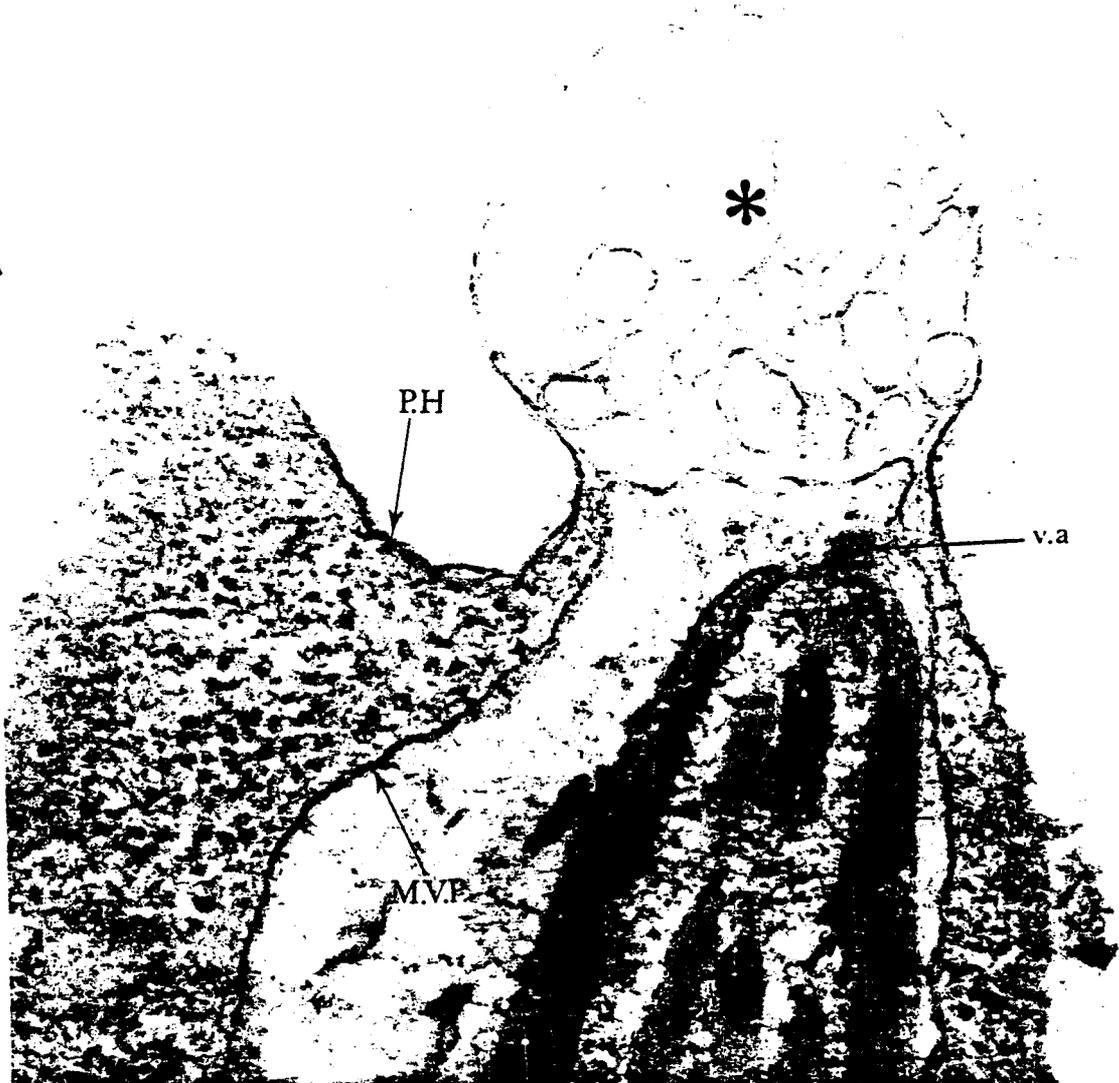
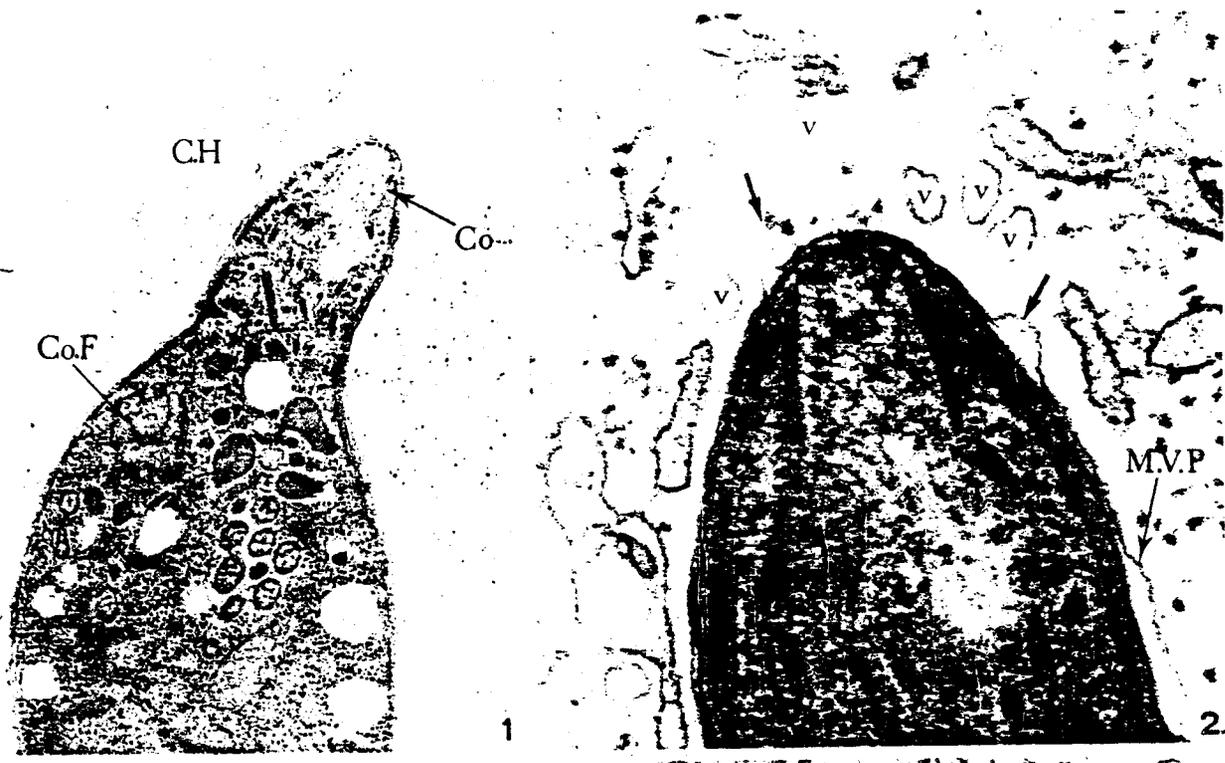


PLANCHE 5 : INTERACTION TACHYZOITES DE TOXOPLASMA - CELLULES HELA
(FIXATION APRES 2 MINUTES).

- 1 - Zoïte en cours d'invasion. La présence d'un apex fils (COF) indique qu'il s'agit d'un parasite largement engagé dans l'endogenèse.
(X 36 000).
- 2 - Détail de la région antérieure du zoïte précédent. La membrane parasitophore en formation semble essaimer des vésicules (v) dans le cytoplasme hôte avoisinant (flèche).
(X 110 000).
- 3 - Zoïte intracellulaire. L'emplacement des rhoptries est occupé par une vacuole(*) engagée dans le conoïde et contenant quelques profils denses. La membrane de la vacuole parasitophore est discontinue et doublée par une couche d'ergastoplasme dépourvue de ribosomes côté parasite.
(X 55 000). (cliché E. FERREIRA)



BU'S
LILLE

PLANCHE 6 : INTERACTION TACHYZOITES DE *TOXOPLASMA* - CELLULES HELA.
(FIXATION APRES 2 MINUTES)

- 1 - Région antérieure d'un zoïte intracellulaire. La membrane, la vacuole parasitophore et le plasmalemma du parasite sont accolés, pouvant donner d'illusion d'une seule strate à faible grossissement (flèche courbe). En un endroit, les 2 membranes se disjoignent pour former un espace rempli d'un matériel dense (flèche). Une vacuole claire contenant quelques profils denses occupe un large volume dans l'apex du zoïte(*).
(X 90 000).
- 2 - Région antérieure d'un zoïte intracellulaire contenant un volumineux profil myélinique (flèche) logé dans une vacuole.
(X 90 000).

1 et 2 : clichés E. FERREIRA

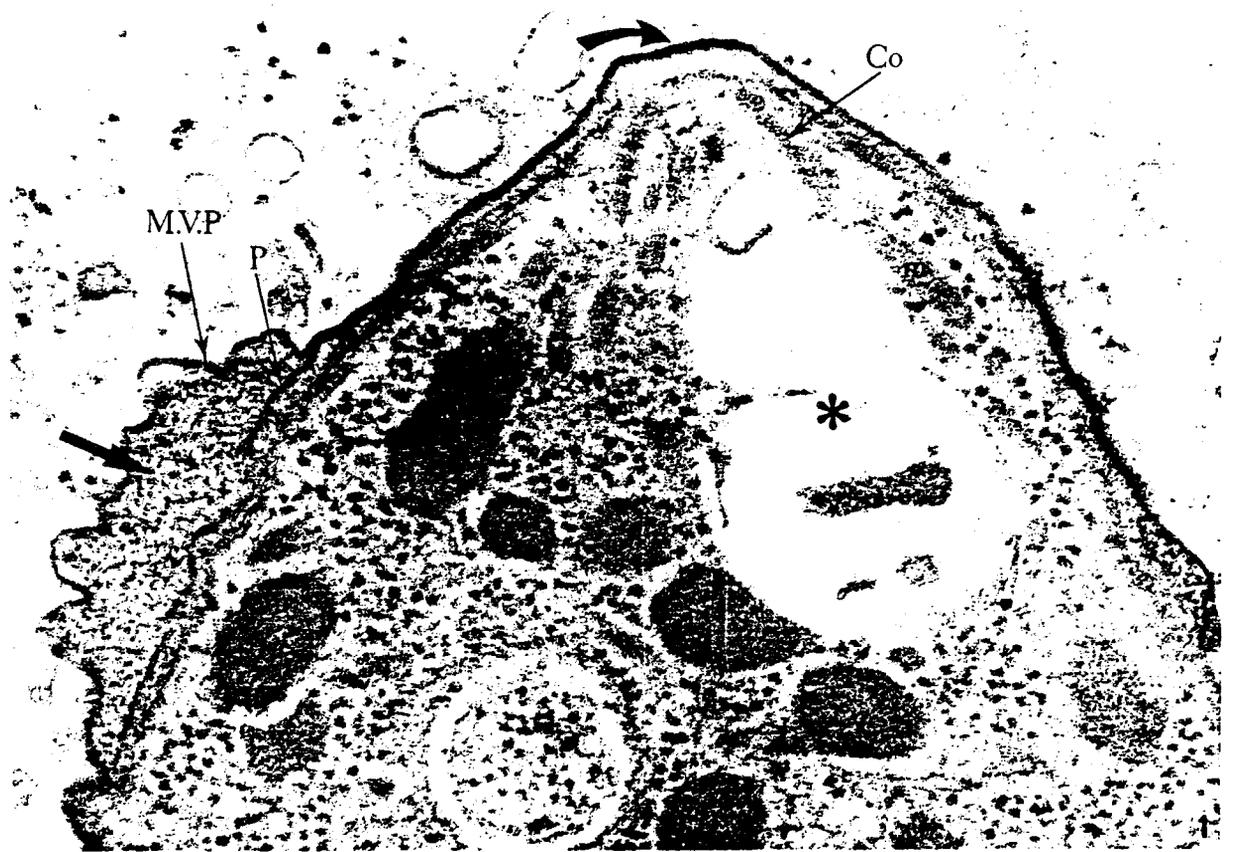


PLANCHE 7 : INTERACTION TACHYZOÏTES DE *TOXOPLASMA* - CELLULES HELA
(FIXATION APRES 2 MINUTES, SAUF 3).

1 et 2 - Zoïtes fixés en fin de pénétration et chez lesquels une zone symétrique de contact étroit entre plasmalemme du zoïte et membrane de la vacuole parasitophore évoque l'existence d'une jonction mobile lors de la pénétration (flèche). Ailleurs, la membrane de la vacuole parasitophore est discontinue (têtes de flèches)

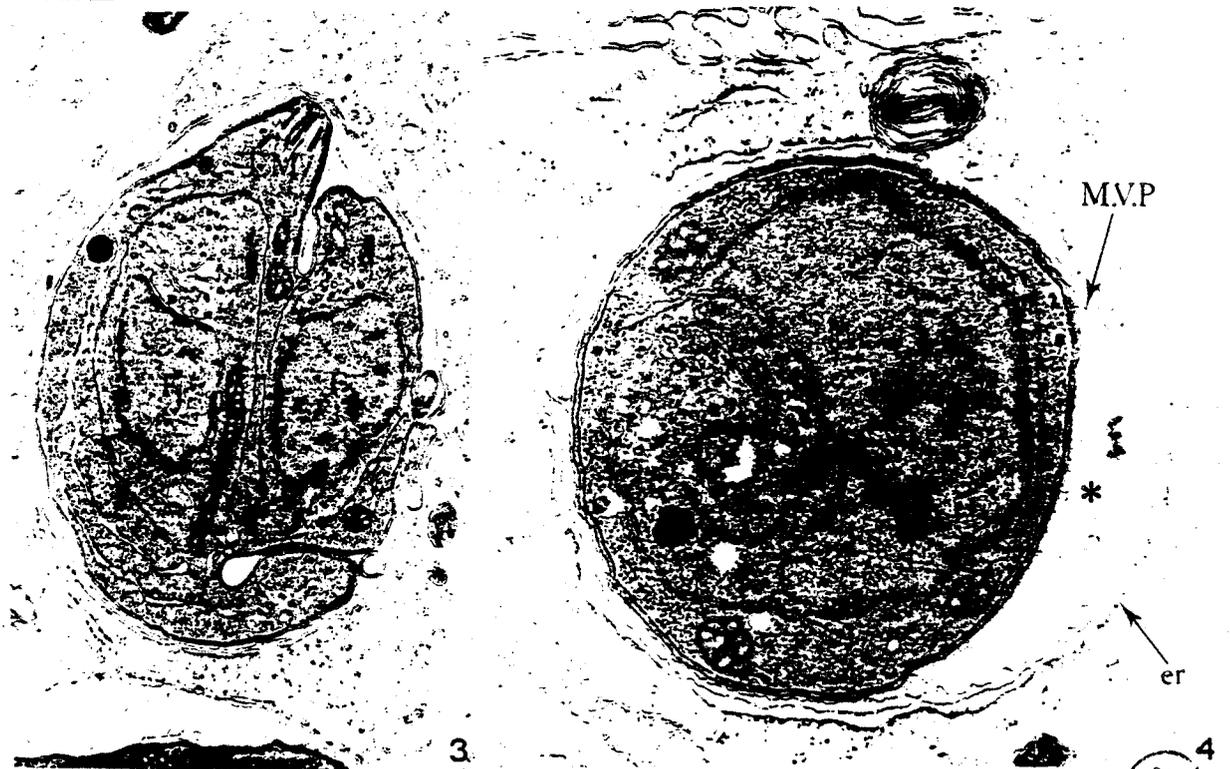
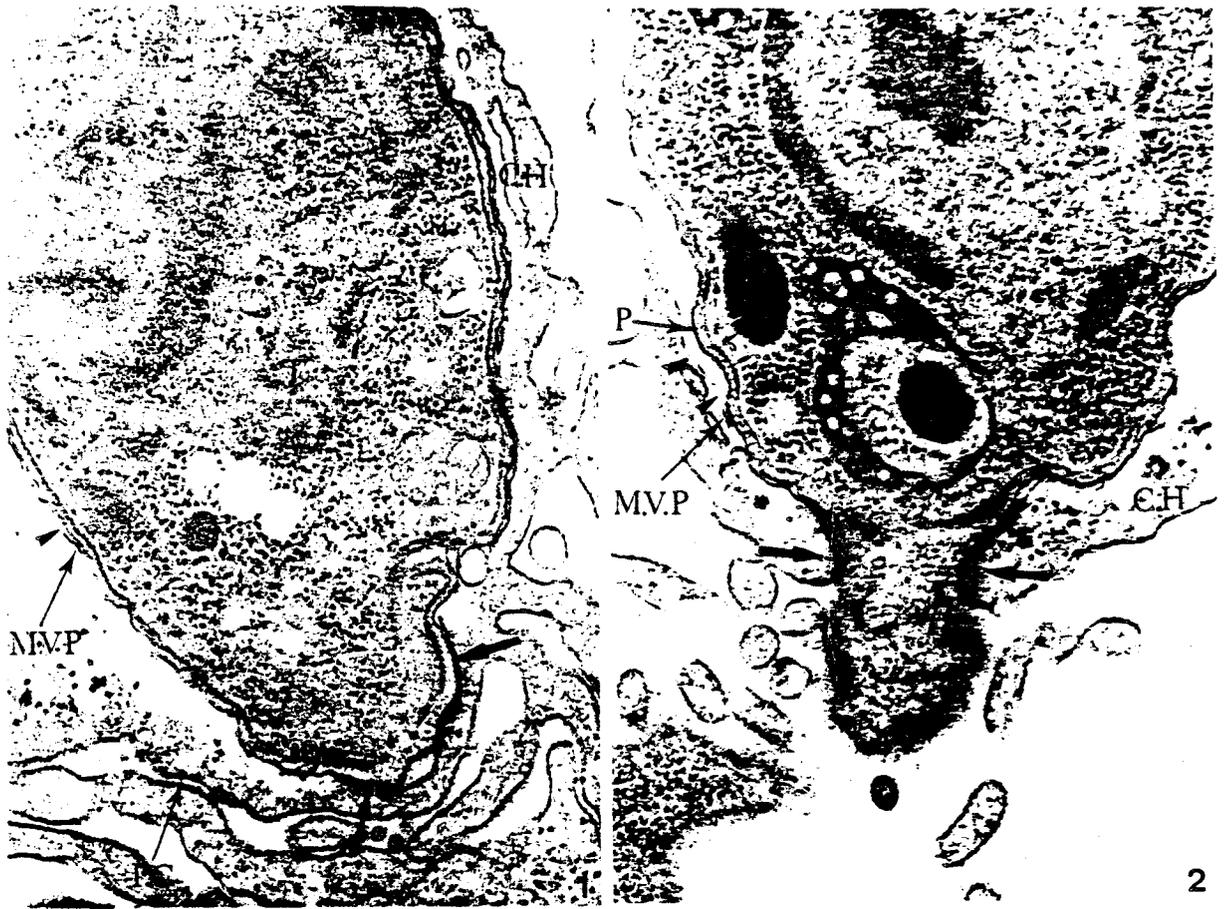
(X 62 000).

3 - Zoïte intracellulaire fixé 20 minutes après activation et qui contient deux individus fils à un stade très avancé d'élaboration.
(X 20 000).

4 - Zoïte intracellulaire. L'espace vacuolaire renferme un contenu granuleux(*). La strate d'ergastoplasme périvacuolaire entoure tout le parasite et est séparée de la membrane vacuolaire par un espace dépourvu d'inclusions.

(X 37 000).

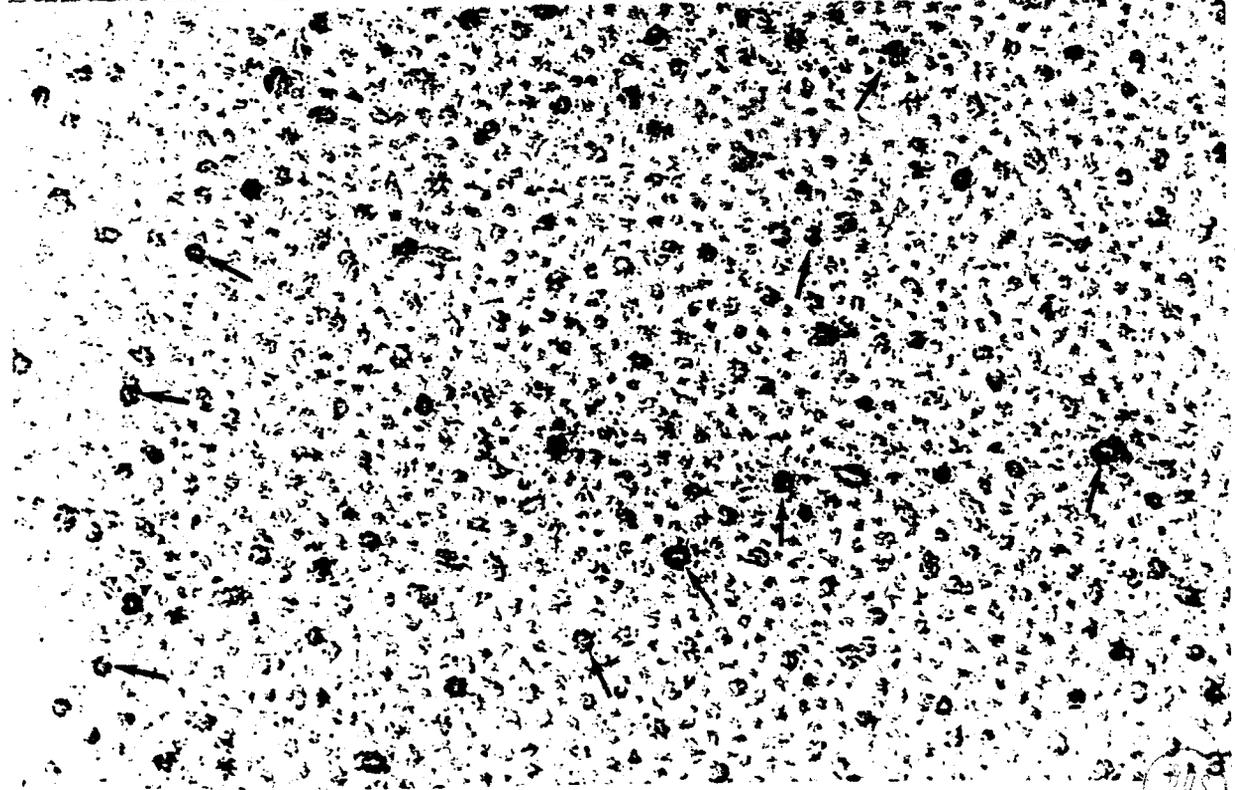
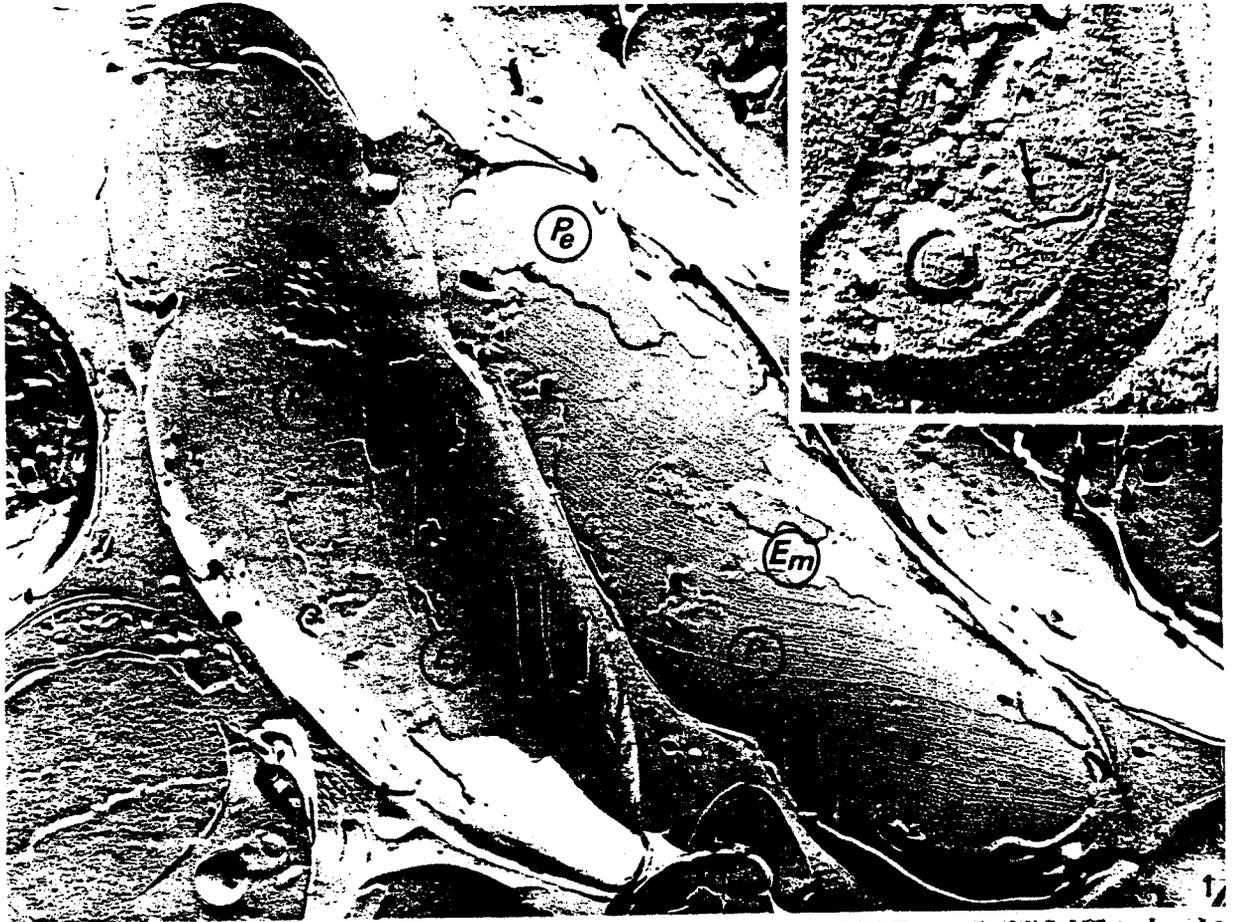
1 et 3 : clichés E. FERREIRA



BI
LILLE

PLANCHE 8 :

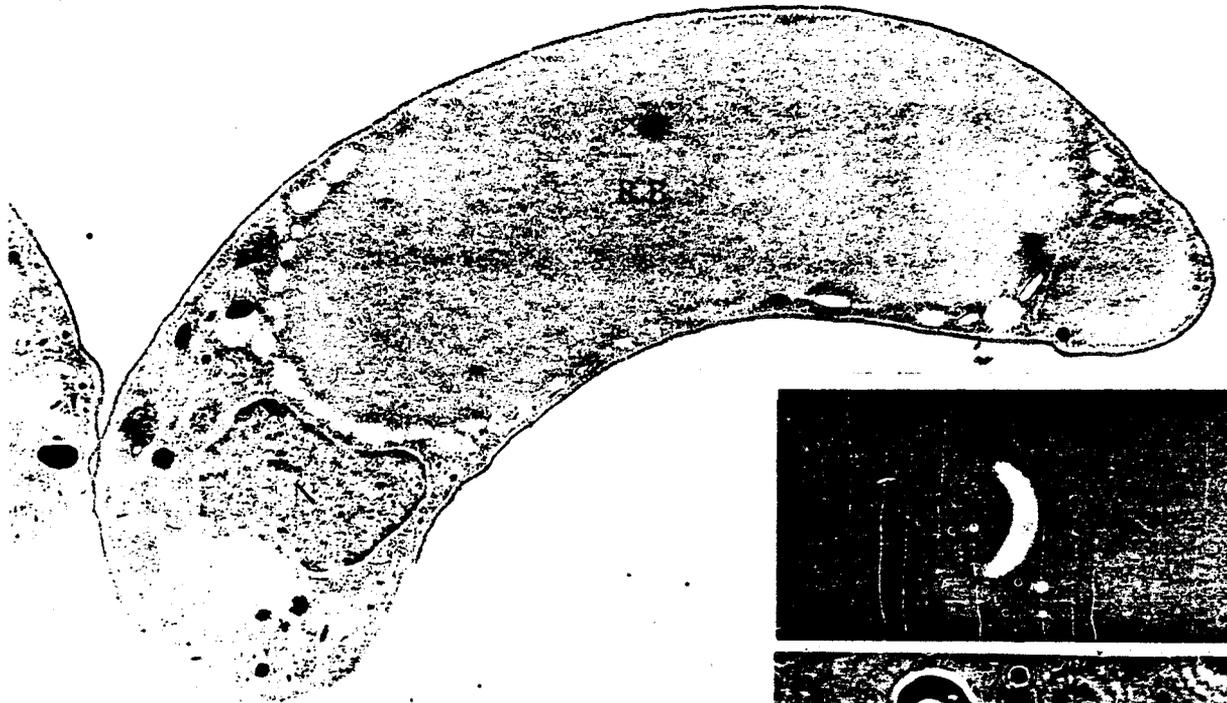
- 1 - Cryofracture de mérozoïtes II d'*Eimeria necatrix*. L'organisation de la pellicule est identique à celle décrite chez les sporozoïtes d'*Eimeria*. (X 18 000).
- 2 - Mérozoïte II d'*Eimeria necatrix* en cours de genèse. Un lame du complexe membranaire interne en cours de mise en place montre une accumulation de particules sur la partie accolée au plasmalemme alors que le reste de la surface est nu. (double flèche). (X 60 000).
- 3 - Cryofracture de plasmalemme de sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi* (face Pe). Ombrage rotatif. Une sous-structure est mise en évidence dans les P. I. M. (flèches). (X 360 000).



405
ULTR

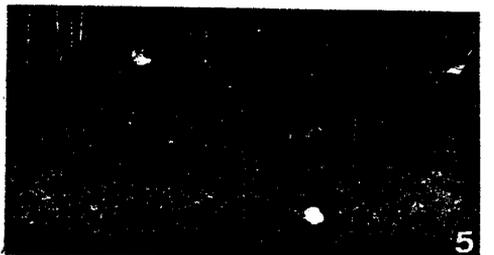
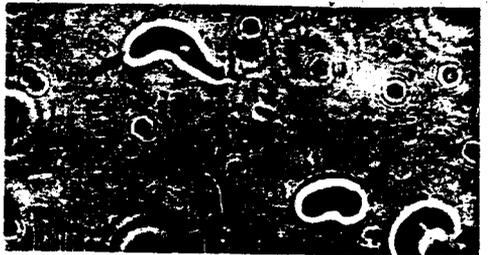
PLANCHE 9 : INTERACTION SPOROZOITES D'*EIMERIA NIESCHULZI* - FERRITINE
CATIONISEE.

- 1 - Sporozoïte fixé avant inclusion : le ligand couvre uniformément le parasite.
(X 200 000)
- 2 - Cape postérieure (flèche) de ferritine cationisée sur un sporozoïte incubé à 37° 10 minutes dans le ligand.
(X 60 000).
- 3 à 7 - Ferritine cationisée fluorescente.
 - 3 - conditions indentiques à 1.
(X 1000)
- 4 et 5 - lumière transmise(4) et fluorescence (5) de sporozoïtes vivants incubés dans une solution de ferritine cationisée fluorescente. Double flèche : marquage postérieur. Flèche : cape.
(X 800)
- 6 et 7 - mêmes conditions que 4 et 5 : cape en voie d'élimination.
(X 600).



1

2



5



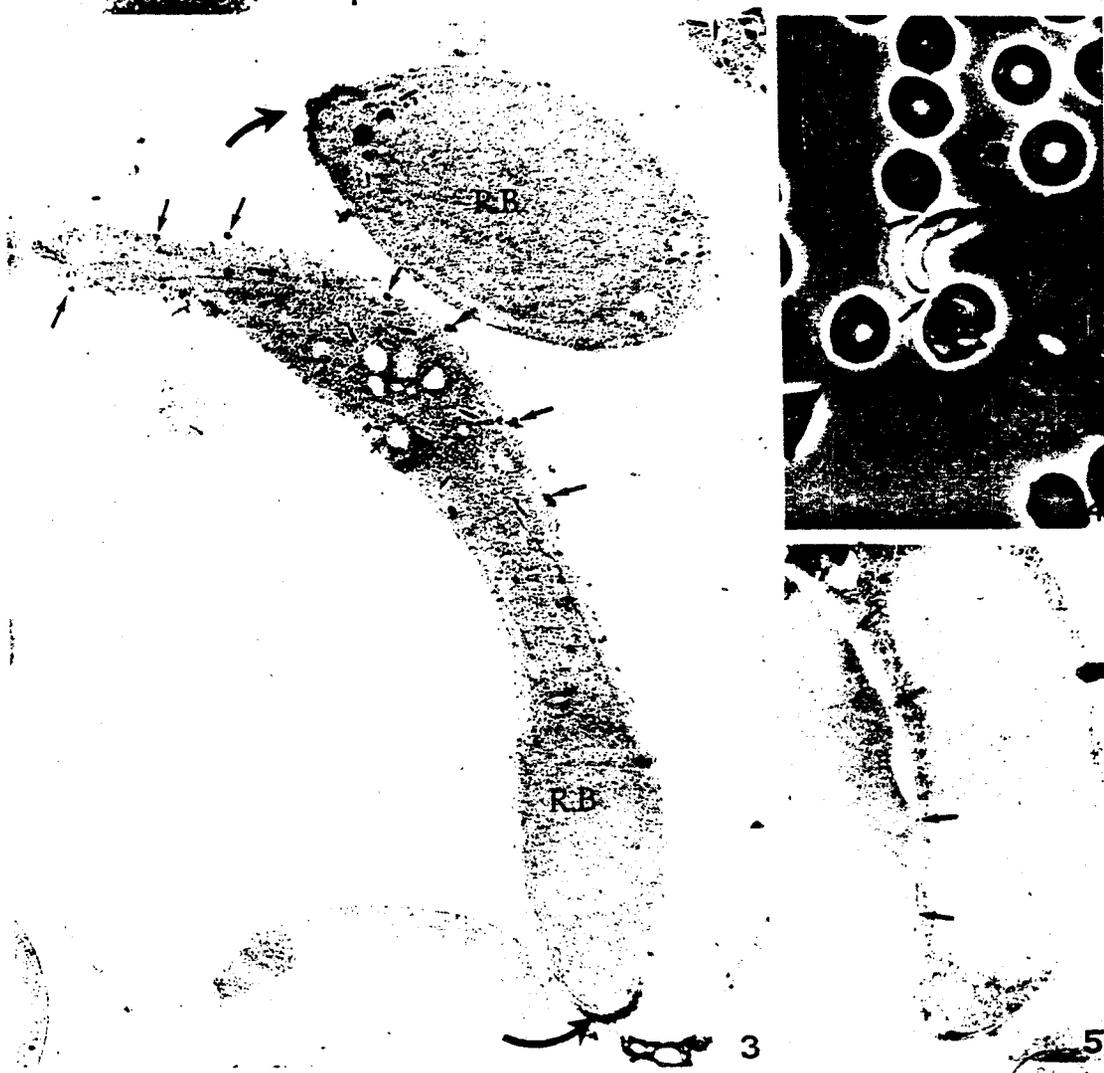
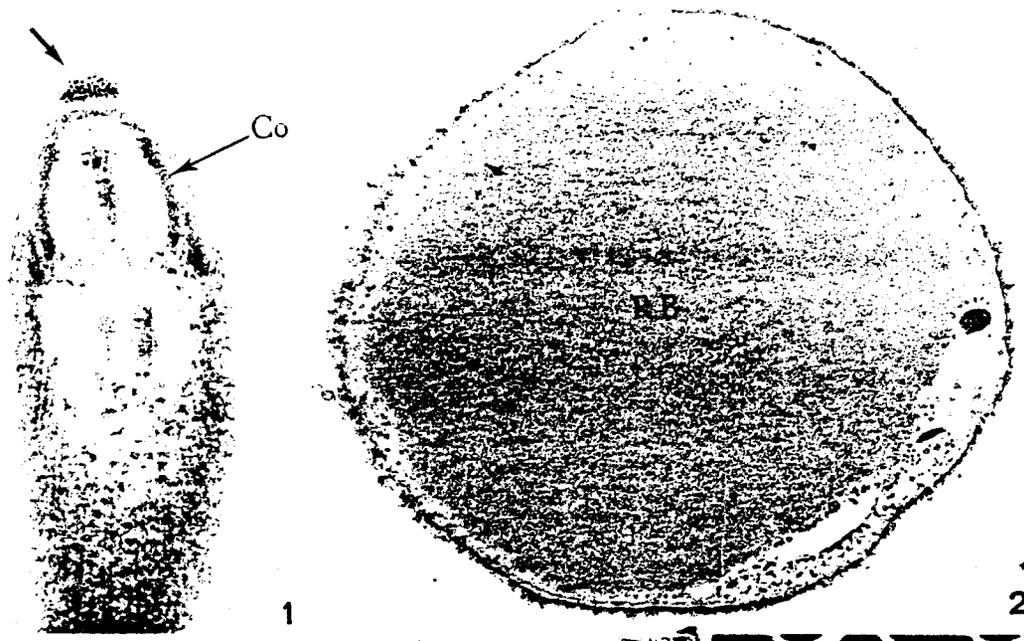
7

BIP
LILLE

PLANCHE 10 : INTERACTION SPOROZOITES D'*EIMERIA NIESCHULZI* - FERRITINE
CATIONISEE OU GLOBULES ROUGES DE SOURIS.

- 1 - Un site anionique apical persiste après formation de la cape à 37°C.
(X 70 000).
- 2 - Marquage uniforme d'un sporozoïte incubé à 4°C.
(X 36 000).
- 3 - Sporozoïte fixé après 10 secondes d'interaction à 37° avec la ferritine cationisée. Une cape postérieure est déjà présente (flèche courbe), mais des agrégats persistent sur le plasmalemme (flèches).
(X 16 000).
- 4 et 5 - Interaction sporozoïtes - globules rouges en contraste de phase sur le vivant (4)
(X 1200)
et fixé, en microscopie électronique (5).
(X 16 000).

5 : cliché H. VARTANIAN



BUS
LILLE

PLANCHE 11 : PELLICULES DE *SARCOCYSTIS TENELLA*.

- 1 - Fraction "pellicule" isolée lors du fractionnement de bradyzoïtes. Les microtubules sous pelliculaires persistent dans certains "ghosts" (flèche)
(X 10 000).

Encart : agrandissement montrant la persistance de la structure trimembranaire
(X 110 000).

- 2 - Apex de zoïtes dans la fraction "ghosts". La dépendance vésicule apicale - plasmalemme est mise en évidence ainsi que la stabilité structurale de l'ensemble conoïde, anneaux apicaux, anneau d'insertion des microtubules sous pelliculaires (flèche) centré sur la vésicule apicale.
(X 150 000).

Profils électrophorétiques

A et E : Ghosts de zoïtes de *Sarcocystis tenella* non trypsinés.

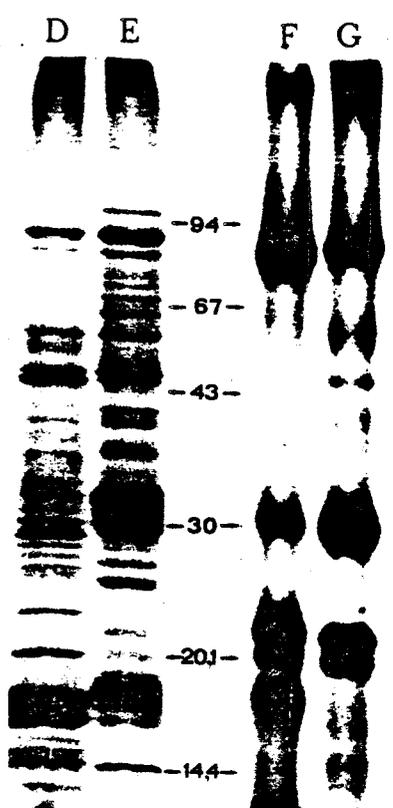
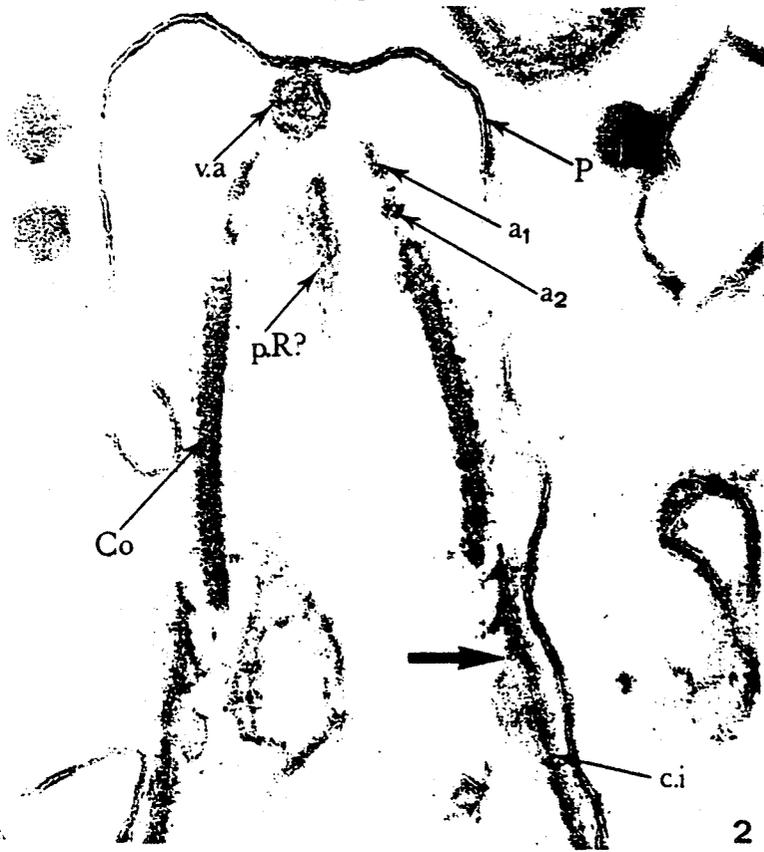
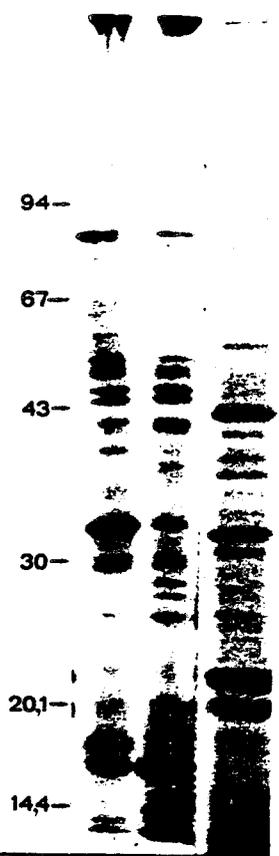
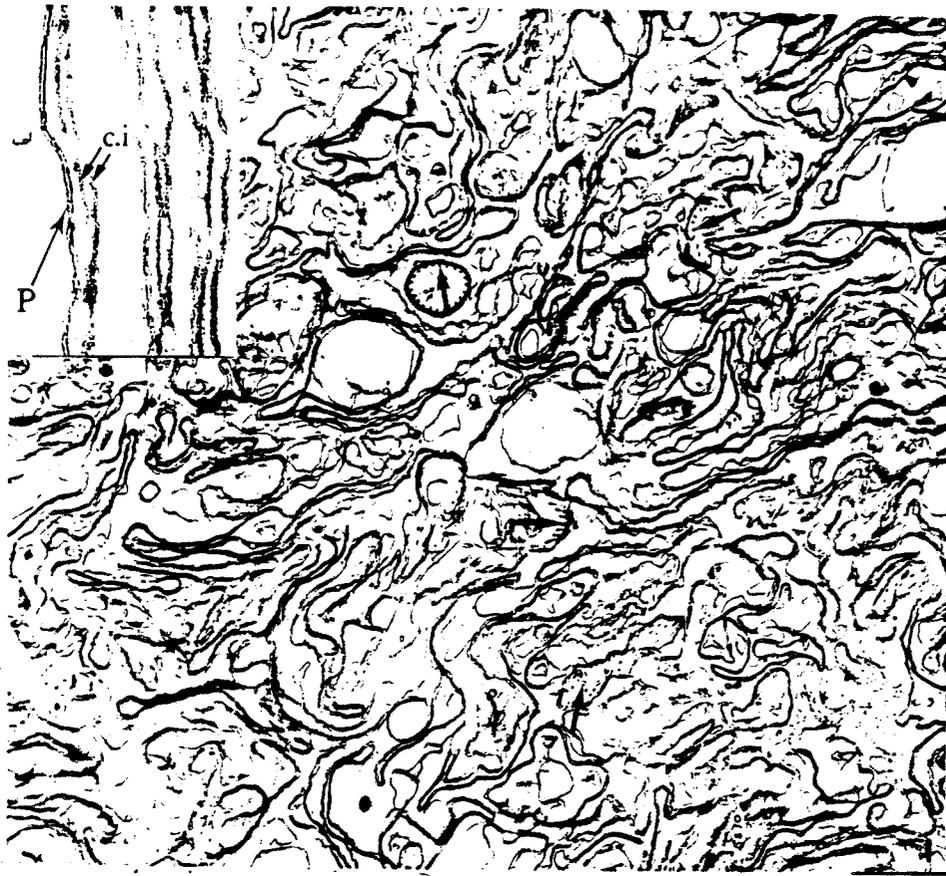
B et D : Ghosts de zoïtes de *Sarcocystis tenella* activés par le trypsine.

F G : Autoradiogrammes de zoïtes de *Sarcocystis tenella* iodés par la lactoperoxydase (6), puis trypsinés (F).

C : Zoïtes entiers

-Dépôts : A,B : 50 µg, C : 60 µg, D,E : 150 µg, F,G : 20 000 cpm
(24 heures exposition).

-Marqueurs de poids moléculaire : 1:94000, 2:67000, 3 : 43 000,
4:30 000, 5 : 20 100, 6:14 400.



2



PLANCHE 12 : FRACTIONNEMENT DES ZOÏTES DE *SARCOCYSTIS TENELLA*.

1 et 2 : fraction granules denses.

1 : vue générale.

(X 10 000).

2 : détail

(X 54 000).

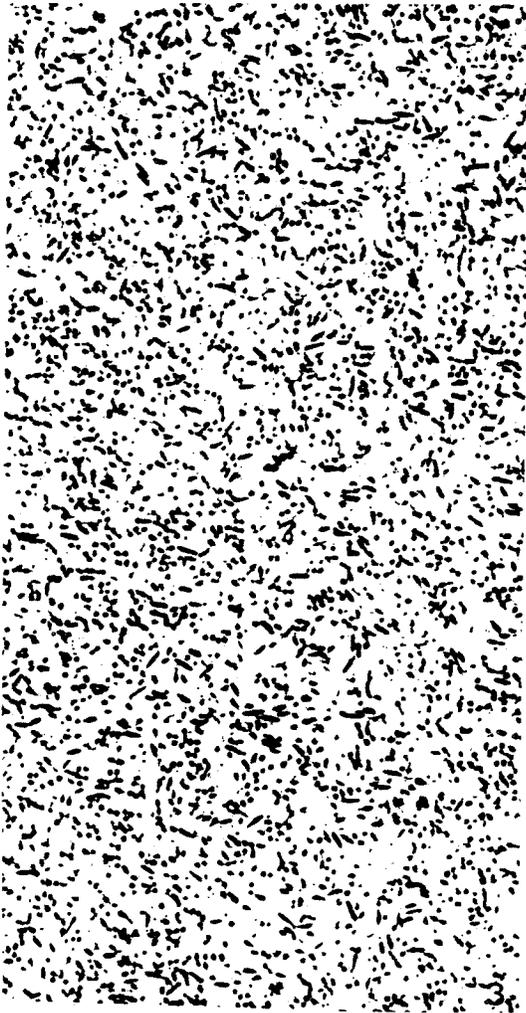
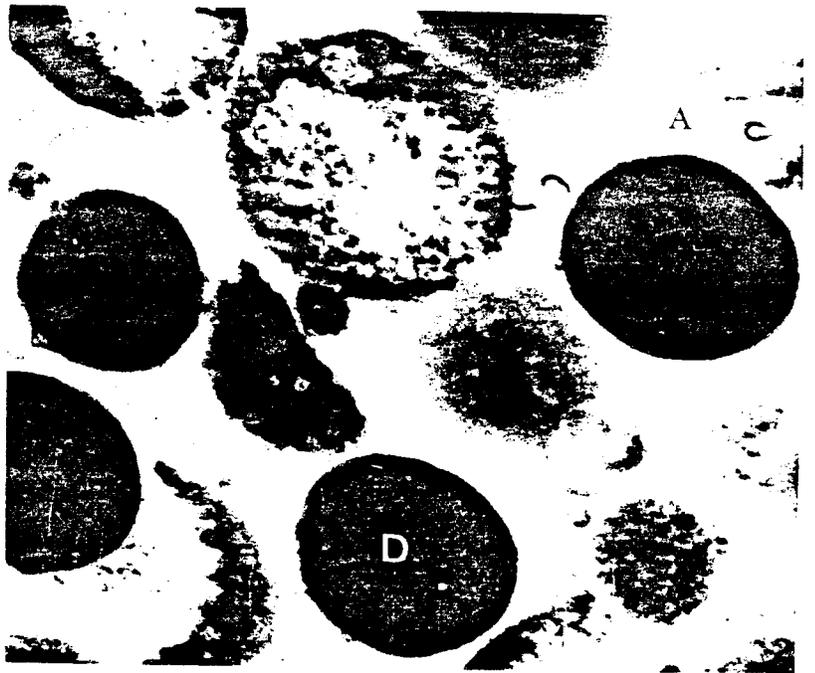
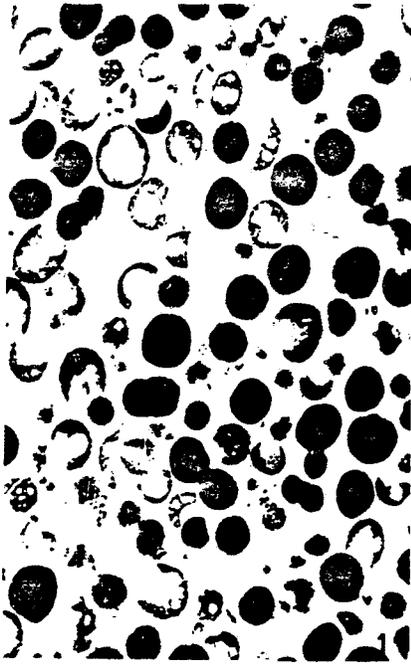
3 et 4 : fraction micronèmes.

3 : vue générale

(X 10 000).

4 : détail

(X 90 000).



BUS
LILLE

PLANCHE 13 :

Fractionnement subcellulaire de sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi*.

- 1, Fraction ghosts
(X 10 000).
- 2, Fraction rhoptries.
(X 10 000)
- 3, Fraction micronèmes
(X 10 000)
- 4, Détail des micronèmes
(X 50 000).

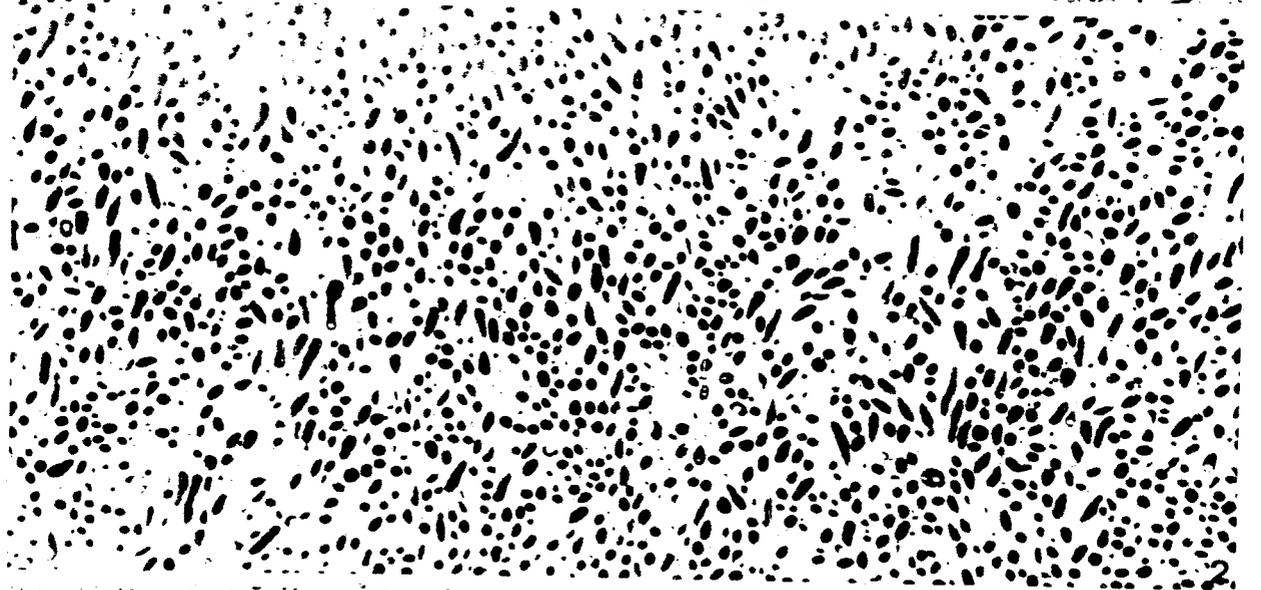


PLANCHE 14 :

Sédimentation différentielle d'un homogénat de mérozoïtes III d'*Eimeria nischulzi*.

(X 10 000).

- 1 - Culot 2000 gmax, 10 min.
- 2 - Culot 12000 gmax, 10 min.
 - 2a : base du culot
 - 2b : partie supérieure.
- 3 - Culot 24 000 gmax, 15 min.
- 4 - Culot 240 000 gmax, 15 min.
 - 4a : base du culot
 - 4b : partie supérieure.

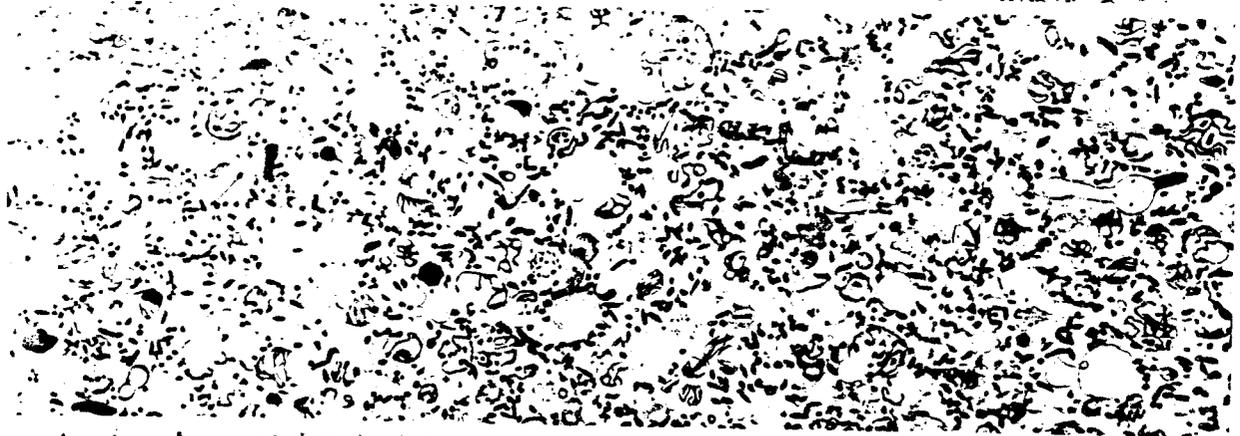
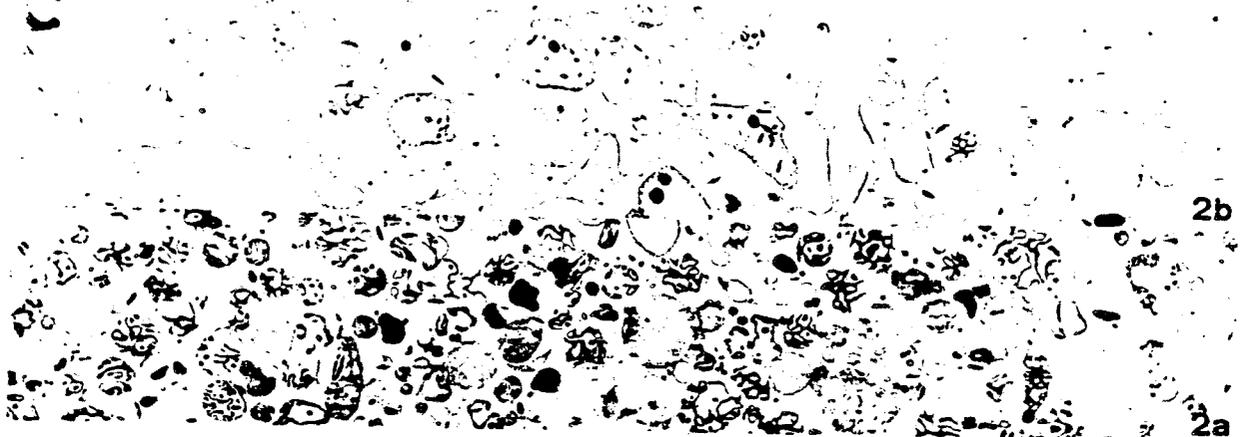


PLANCHE 15 :

- 1, 2 : Essai de séparation des rhoptries de sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* à partir du sédiment 100 000 gmax x min, basé sur la vélocité des organites.
- 1 : Vue de la fraction enrichie en rhoptries (RM).
- 2 : Vue de la fraction enrichie en mitochondries. (M).
(X 10 000).
- 3, 4 : Sédimentation différentielle d'un homogénat de mérozoïtes II d'*Eimeria necatrix*. Sédiment 110 000 gmax, 1 heure.
- 3 (X 10 000).
- 4 (X 60 000).

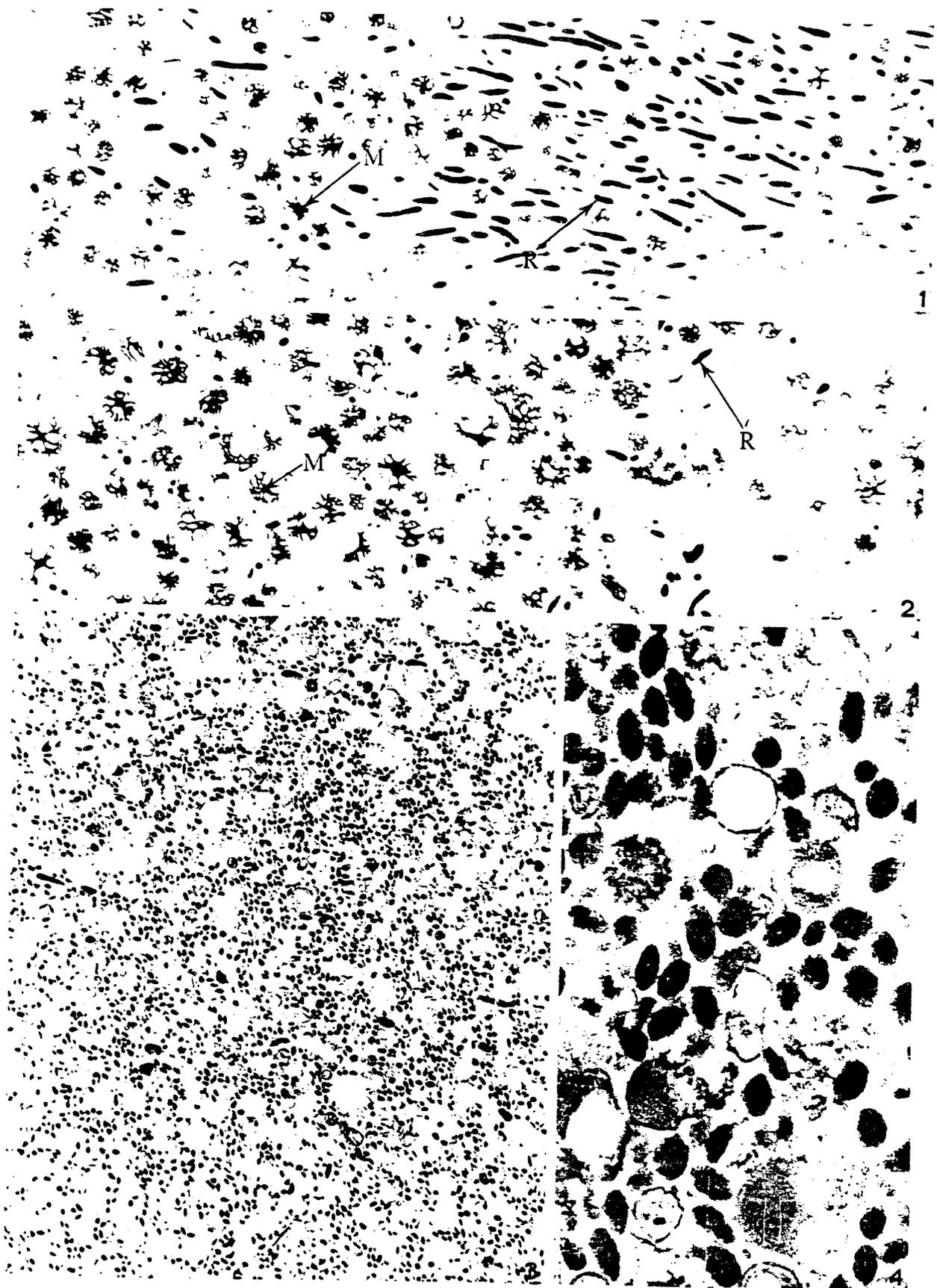


PLANCHE 16 : SEDIMENTATION DIFFERENTIELLE D'HOMOGENAT DE TACHYZOÏTES DE
TOXOPLASMA GONDII.

- 1 - Sédiment 2000 gmax, 10 min. (*: zoïtes intacts)
- 2 - Sédiment 18 000 gmax, 10 min.
- 3 - Sédiment 240 000 gmax, 30 min

3a : fond

3b : partie supérieure

Les micronèmes apparaissent ici séparés des autres organites par stratification du culot en cours de centrifugation.

1; 2, 3,

(X 10 000).

- 4 - Détail d'une région du sédiment

(18 000 gmax, 10 min)

riche en rhoptries.

(X 50 000).

- 5 - Détail des micronèmes de 3.

(X 50 000).

1 à 5 : clichés E. FERREIRA

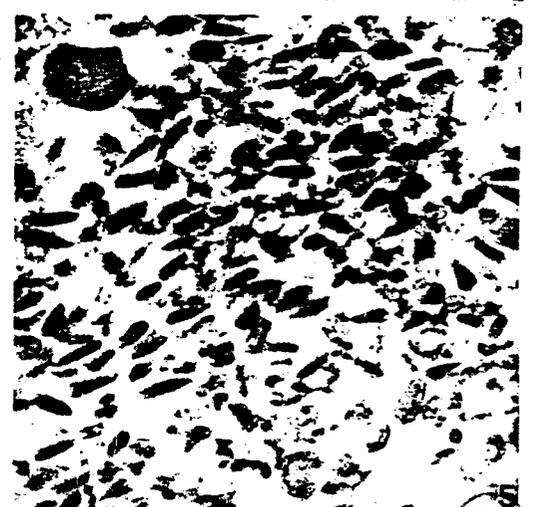
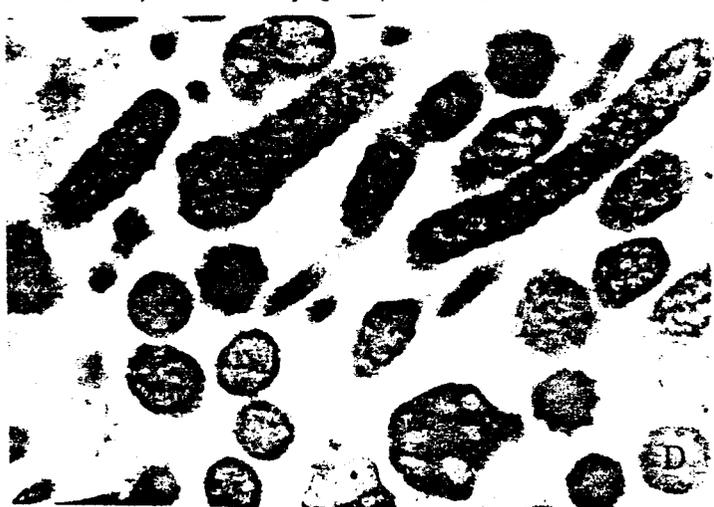


PLANCHE 17 :

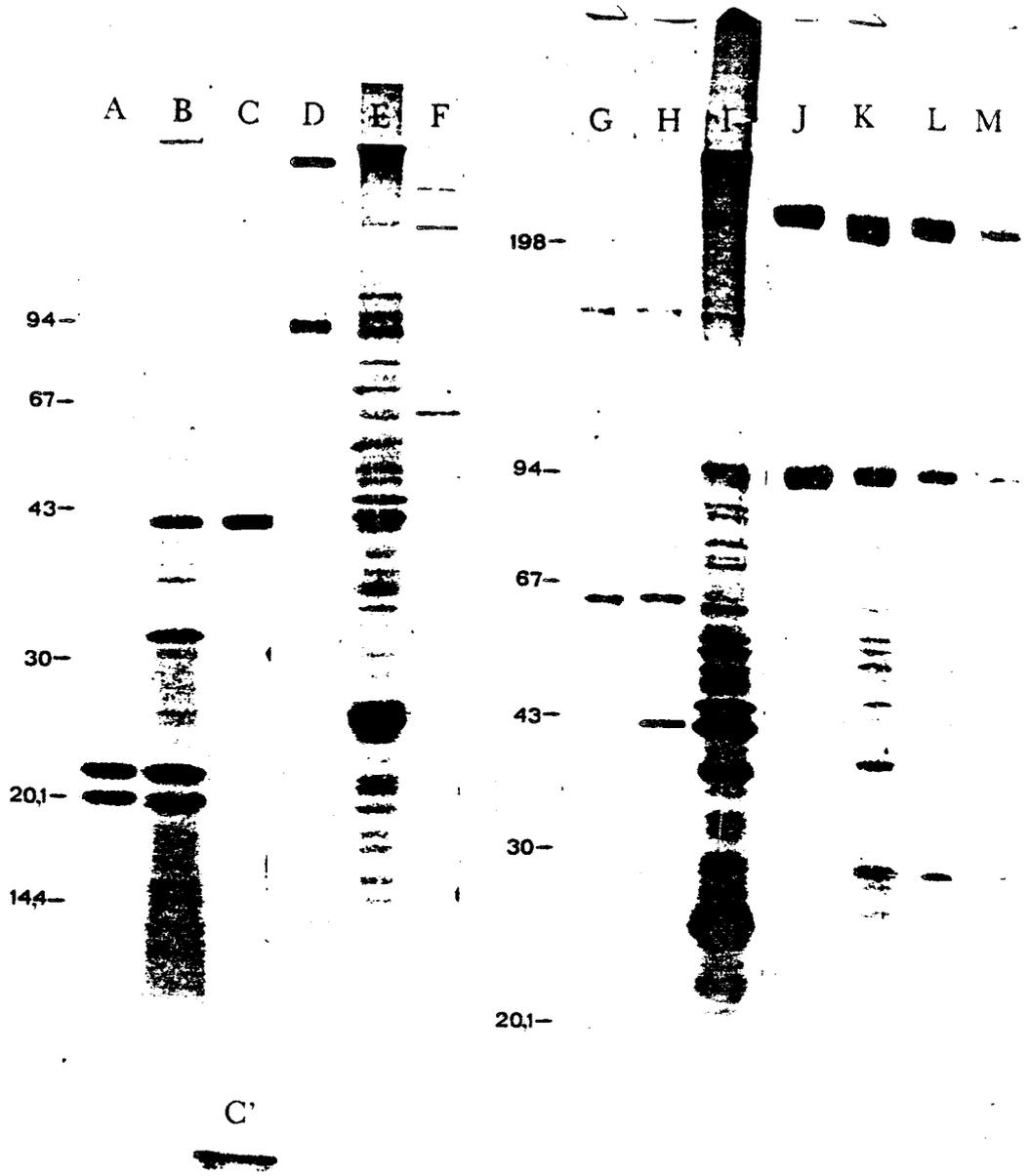
Electrophorèses en gel de polyacrylamide - SDS de fractions subcellulaires de zoïtes de *Sarcocystis* et d'*Eimeria*.

A à F Gradient 10 - 18 % Acrylamide.

G à M Gradient 5 - 15 % Acrylamide.

Marqueurs de poids moléculaire (0 : 198 000, 1 : 94 000, 2 : 67000, 3 : 43000, 4 : 30 000, 5 : 20 100, 6 : 14400).

- A *Sarcocystis tenella* : micronèmes.
B *Sarcocystis tenella* : zoïtes entiers.
C *Sarcocystis tenella* : granules denses
C' *Sarcocystis tenella* : granules denses (gel moins chargé : 2 bandes apparaissent.)
D *Eimeria nieschulzi*, sporozoïtes : micronèmes.
E " : entiers.
F " : rhoptries.
G " : rhoptries.
H " : fraction RM.
I " : entiers
J " : micronèmes.
K mérozoïtes III : entiers
L " : Sédimentation différentielle, culot 240 000 Gmax, 15 min.
M " : Sédimentation différentielle, culot 24000 Gmax, 15 min.



BUS
LILLE

PLANCHE 18 :

ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE SDS ET FLUOROGRAPHIE DE *TOXOPLASMA*
MARQUES PAR LA LEUCINE TRITIÉE. INTERACTION AVEC DES CELLULES HELA.

- A et B : électrophorégramme coloré au Bleu de Coomassie de zoïtes (A)
et de zoïtes tritiés (B) purifiés.
- C : Fluorographie de la piste B.
- D à J : essai de mise en évidence d'une exocytose lors de la pénétration
de Toxoplasmes dans des cellules Hela (fluorographies).
- D : Zoïtes purifiés, suspension de départ.
- E : culot cellules + zoïtes pénétrés, après lyse cellulaire par
Dounce puis hémolysine.
- F : surnageant de broyage au Dounce.
- G : surnageant d'incubation en hémolysine après broyage.
- H : culot témoin cellules + zoïtes incubés sans cellules, après lyse
au Dounce puis à l'hémolysine
- I : surnageant témoin de broyage au Dounce.
- J : surnageant témoin d'incubation en hémolysine après broyage au
Dounce.

E + F + G = cellules + zoïtes intracellulaires

H + I + J = témoin cellules + zoïtes incubés séparément .

