

N° d'ordre : 1013

50376  
1982  
199

50376  
1982  
199

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE

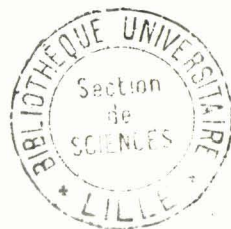
**THESE DE TROISIEME CYCLE**

**PROTISTOLOGIE - PARASITOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE**

présentée par

Nassira CHBOUKI

**ETUDES SUR LA STRUCTURE ET LA PHYSIOLOGIE DE  
LA PELLICULE DES ZOÏTES DE COCCIDIÉS**



Soutenue le 16 décembre 1982 devant la Commission d'Examen

Jury :	MM.	E.	VIVIER	Président
		J.F.	DUBREMETZ	Rapporteur
		J.	SCHREVEL	Examineurs
		R.	SINDEN	

## SOMMAIRE

	pages
INTRODUCTION	1
MATERIELS ET METHODES	
I - MATERIELS	3
1 - RAPPEL DES CYCLES	3
a - <i>Eimeria nieschulzi</i>	
b - <i>Sarcocystis muris</i>	
c - <i>Sarcocystis tenella</i>	
d - <i>Toxoplasma gondii</i>	
2 - OBTENTION ET ENTRETIEN DES SOUCHES	4
a - <i>Eimeria nieschulzi</i>	
b - <i>Sarcocystis muris</i>	
c - <i>Sarcocystis tenella</i>	
d - <i>Toxoplasma gondii</i>	
II - METHODES	5
A PREPARATION ET PURIFICATION DES ZOITES	5
1 - SPOROZOÏTES D' <i>Eimeria nieschulzi</i>	
a - Sporulation des oocystes	
b - Stérilisation des oocystes	
c - Excystation des oocystes et isolement des Sporozoïtes	
d - Préparation de la colonne	
2 - BRADYZOÏTES DE <i>Sarcocystis muris</i>	7

	pages
a - Prélèvement des muscles infestés	
b - Purification des bradyzoïtes	
3 - BRADYZOÏTES DE <i>Sarcocystis tenella</i>	8
a - Prélèvement des kystes	
b - Récupération des zoïtes	
4 - TACHYZOÏTES DE <i>Toxoplasma gondii</i>	9
B - METHODES D'OBSERVATION	9
1 - MICROSCOPIE PHOTONIQUE	
a - Observations	
b - Système d'enregistrement	
2 - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	10
a - La cryofracture	
b - Analyse en coupes fines des culots de centrifugation	
C - EXPERIMENTATION SUR LE ZOÏTE	11
1 - INTERACTION AVEC LES LIGANDS	
a - les lectines	
b - Les anticorps	
2 - EFFETS DE LA TRYPSINE ET DES DROGUES SUR LA MOBILITE DU ZOÏTE	12
a - Activation par la trypsine	
b - Action des drogues	

	pages
3 - QUANTIFICATION DES MOUVEMENTS	13
D - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES	
1 - MARQUAGE RADIOACTIF	14
a - Iodination des protéines superficielles	
b - Mise en évidence des résidus galactosyl des glycoprotéines membranaires	15
2 - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE SDS	16
a - Electrophorèse monodimensionnelle	
b - Electrophorèse bidimensionnelle	
c - Coloration des gels	
3 - FRACTIONNEMENT CELLULAIRE	19
a - Homogénéisation	
b - Ultrasons	
c - Essai de sous fractionnement	
4 - PREPARATION DES ANTICORPS ET IMMUNOGLOBULINES	20
a - Les anticorps	
b - Purification des Immunoglobulines	

## STRUCTURE DE LA PELLICULE

I - STRUCTURE DE LA PELLICULE DES ZOÏTES DE <i>Sarcocystis muris</i>	23
1 - CYTOLOGIE	
2 - CRYOFRACTURE	

	pages
a - Le plasmalemme	24
b - Le complexe interne	
II - ANALYSE BIOCHIMIQUE DE LA SURFACE DES ZOÏTES DE COCCIDIES	25
A - IODINATION SUPERFICIELLE	25
1 - <i>Eimeria nieschulzi</i>	
2 - <i>Sarcocystis muris</i>	
3 - <i>Sarcocystis tenella</i>	26
4 - <i>Toxoplasma gondii</i>	
B - MISE EN EVIDENCE DES RESIDUS GALACTOSYLS CHEZ LE SPOROZOÏTE D' <i>Eimeria nieschulzi</i> : MARQUAGE PAR LA LECTINE HPA	27
III - ISOLEMENT ET ANALYSE DES PELLICULES	
A - <i>Sarcocystis muris</i>	28
1 - MISE AU POINT DE L'ISOLEMENT DE LA PELLICULE	
2 - ANALYSE ULTRASTRUCTURALE	29
a - Coupes minces	
b - Cryofracture	
3 - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DE LA FRACTION DES PELLICULES	30
a - Electrophorèse monodimensionnelle	
b - Electrophorèse bidimensionnelle	
4 - ESSAI DE SOUS-FRACTIONNEMENT	31
a - Analyse ultrastructurale	

b -Centrifugation sur gradient continu de sucrose	
B - <i>Eimeria nieschulzi</i>	32
1 - ANALYSE ULTRASTRUCTURALE	
2 - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE	
IV - DISCUSSION	33
1 - PROTEINES SUPERFICIELLES	
2 - ARCHITECTURE DE LA PELLICULE	35
DYNAMIQUE SUPERFICIELLE-INTERACTION AVEC LIGANDS	
I - LA LECTINE	40
II - LES ANTICORPS	41
1 - OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE	
2 - CRYOFRACTURE	
III - DISCUSSION	42
1 - SITES REDISTRIBUES SOUS ACTION DE LIGANDS	42
2 - SITES NON REDISTRIBUES	47
3 - P.I.M. ET RECEPTEURS MEMBRANAIRES	
4 - ELIMINATION DU LIGAND	48

## MOBILITE DES ZOITES

1 - ANALYSE DES MOUVEMENTS	49
a - Déplacement sur un substrat solide	
b - Déplacement sur un substrat fluide	
2 - QUANTIFICATION DES DEPLACEMENTS	52
a - Calcul des moyennes	
b - Comparaison des moyennes	
3 - ACTIVATION PAR LA TRYPSINE	53
4 - ACTION DES INHIBITEURS	54
a - Inhibiteurs d'enzymes	
b - Cytochalasine B	

## DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

1 - MOBILITE CELLULAIRE CHEZ LES COCCIDIES	55
2 - RELATION ENTRE "CAPPING", GLISSEMENT ET INVASION DE LA CELLULE HOTE	58
3 - LE GLISSEMENT CHEZ LES AUTRES ORGANISMES	60
4 - ESSAI D'INTERPRETATION	61
CONCLUSION	65

## BIBLIOGRAPHIE.

## INTRODUCTION



Les Coccidies représentent une classe de Sporozoaires parasites intracellulaires obligatoires de vertébrés. Ces protozoaires peuvent parasiter de nombreux organismes et en particulier l'Homme. Ils sont capables d'entraîner des infections graves chez l'Homme (Toxoplasmose) et les animaux (Coccidiose).

Le cycle biologique des Sporozoaires débute par un germe infectieux ou zoïte (GRASSE 1953), qui représente la forme de dissémination de la parasitémie. Le zoïte peut être issu soit des divisions schizogoniques (phase asexuée), soit de la sporogénèse (phase sexuée). Le cycle se déroule chez un seul hôte, cas des Coccidies monoxènes, ou fait intervenir deux hôtes différents pour les Coccidies hétéroxènes (avec sporogonie chez l'hôte principal et schizogonie chez l'hôte intermédiaire).

Le zoïte constitue une des caractéristiques communes essentielles du groupe des Sporozoaires. Ce stade mobile montre une organisation structurale typique, caractérisée par un complexe apical comprenant des anneaux apicaux, un conoïde, des rhoptries, des micronèmes et des microtubules sous-pelliculaires. La pellicule du zoïte est trimembranaire, elle est constituée par un plasmalemme et un complexe membranaire sous-jacent formé de vésicules aplaties (VIVIER et PETITPREZ 1969).

L'originalité des zoïtes des Sporozoaires réside dans leur complexe apical, d'où le terme d'Apicomplexa proposé par LEVINE (1970) pour désigner cet embranchement.

La cytologie ultrastructurale des zoïtes a fait l'objet de nombreuses investigations (Revue par PORCHET-HENNERE et VIVIER 1971) et leur organisation est à présent bien connue. En revanche, peu de travaux existent encore sur la physiologie de ces cellules et en particulier sur leur fonction majeure c'est à dire l'invasion de la cellule hôte, étape primordiale pour la prolifération du cycle parasitaire.

Les études les plus récentes traitant de ce problème proposent un rôle important pour la pellicule dans ce phénomène ; celle-ci aurait également un rôle dans la motilité cellulaire.

Ces deux fonctions primordiales dans le cycle du parasite justifient notre intérêt pour la pellicule.

La structure de la pellicule des zoïtes a déjà été étudiée par cytologie ultrastructurale (VIVIER et PETITPREZ 1969 ; VIVIER et al 1970 ; D'HAESE et al 1977) et par la technique de cryodécapage (SULZER et al 1974 ; PORCHET et TORPIER 1977 ; DUBREMETZ et TORPIER 1979 ; PORCHET et al 1982).

Les recherches sur la motilité des zoïtes sont restées jusqu'à présent fragmentaires. Aussi cette étude a été poursuivie par deux approches : d'une part l'étude cytologique et biochimique de la structure de la pellicule ; et d'autre part l'étude de la mobilité cellulaire et de son expression au niveau membranaire. Cette double approche a été conduite en vue d'essayer d'établir un lien entre physiologie et structure afin de définir les mécanismes de la motilité des zoïtes ou au moins <sup>de</sup> progresser vers cette connaissance.

CHAPITRE 1

MATERIELS ET METHODES

## I MATERIELS

Pour cette étude sur la structure et la physiologie de la pellicule des Coccidies, notre expérimentation a porté sur quatre parasites : *Eimeria nieschulzi*, *Sarcocystis muris*, *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii*.

### 1 - RAPPEL DES CYCLES

#### a - *Eimeria nieschulzi* (DIEBEN, 1924)

C'est un parasite monoxène du rat. Le rat s'infeste par ingestion des oocystes ; les sporozoïtes libérés dans la lumière intestinale envahissent les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale et s'y développent en schizontes (ROUDABUSH, 1937). Après trois générations schizogoniques a lieu la phase sexuée qui donne naissance à l'oocyste lequel est rejeté avec les fèces.

#### b - *Sarcocystis muris* (LABBE, 1899)

C'est un parasite hétéroxène du chat et de la souris (RUIZ et FRANKEL 1976).

La reproduction sexuée se déroule dans le tube digestif du chat et les sporocystes qui en résultent sont rejetés dans les excréments. La souris s'infeste par ingestion des sporocystes. Ces derniers libèrent les sporozoïtes qui se développent en schizontes dans les cellules du système réticuloendothélial ; les mérozoïtes libérés essaient par le système circulatoire vers le tissu musculaire et s'y développent en kystes renfermant des bradyzoïtes. Ces kystes peuvent atteindre des tailles considérables (taille d'une fibre musculaire) et sont infectieux pour le chat.

#### c - *Sarcocystis tenella* (MOULE, 1888)

Le cycle (MELHORN et al 1979) se déroule chez deux mammifères :

- Le chat où a lieu la phase sexuée avec gamogonie et

sporogonie dans les cellules intestinales.

- Le mouton qui héberge la phase schizogonique : une première schizogonie intervient dans les cellules endothéliales du foie ; les mérozoïtes libérés gagnent les muscles de l'oesophage par la voie sanguine où ils se développent en kystes volumineux renfermant les bradyzoïtes.

d - Toxoplasma gondii (NICOLLE et MANCEAUX, 1908)

Le cycle de ce parasite n'a été élucidé que récemment par HUTCHINSON et al (1970). Il comprend :

- Une phase sexuée chez un félin, généralement le chat (FRENKEL 1974) avec schizogonie et gamétogénèse dans les cellules de l'épithélium intestinal, les oocystes sont émis dans les excréments. Les oocystes, très résistants dans le milieu extérieur, subissent la sporulation, après laquelle ils deviennent infestants pour les hôtes intermédiaires ou pour le félin.

- La phase asexuée chez l'hôte intermédiaire : le parasite s'y développe en se multipliant par endogénèse de façon indéfinie (tachyzoïtes) ou en formant des kystes dans la plupart des tissus (bradyzoïtes). Le félin s'infeste également en ingérant ces kystes.

2 - OBTENTION ET ENTRETIEN DES SOUCHES

a - Eimeria nieschulzi

La souche d'*Eimeria* a été fournie par J.L. MAHRT de l'Université d'Edmonton. Elle est entretenue sur son hôte naturel par infestation de rats d'environ 300g, par 500 000 oocystes inoculés par voie orale.

Les oocystes sporulés peuvent être conservés jusqu'à plusieurs années à + 4°C. Nous avons en général utilisé les oocystes dans les 2 à 6 mois suivant leur obtention.

b - Sarcocystis muris

La souche utilisée nous a été fournie par O. HEYDORN, de l'Universi

de Berlin (Faculté de médecine Vétérinaire).

Le parasite est inoculé aux souris par voie orale à raison de 80 sporocystes par animal. Les kystes musculaires sont obtenus 4 à 6 mois plus tard.

c - Sarcocystis tenella

Les oesophages de mouton infestés sont obtenus auprès de l'abattoir de Bailleul (Nord). L'irrégularité de cet approvisionnement a limité les expérimentations sur ce matériel.

d - Toxoplasma gondii

Les tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* proviennent du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (U. INSERM 167, Lille).

## II METHODES

### A - PREPARATION ET PURIFICATION DES ZOÏTES

#### 1 - SPOROZOÏTES D'*Eimeria nieschulzi*

##### a - Sporulation des oocystes

A partir du 7<sup>e</sup> jour d'infestation des rats, les oocystes non sporulés sont récupérés avec les fèces des animaux. Ils sont suspendus dans une solution de bichromate de potassium à 2,5% ; la suspension est tamisée à 250 $\mu$ m afin d'éliminer les plus gros débris, puis placée sous oxygénation par air comprimé dans un milieu agité pour favoriser la sporulation. Celle-ci dure environ 72 heures à 20°C.

La suspension obtenue est centrifugée à 500g max pendant 10 minutes, puis le culot est lavé deux fois dans l'eau distillée dans les mêmes conditions et repris dans une solution de sucrose 1,15 M contenant 2 g de phénol par litre. La suspension est centrifugée à 650g max pendant 10 minutes.

6

Dans un tel milieu, les oocystes sporulés se rassemblent en surface par flottaison et forment un voile. Ils sont recueillis par aspiration et lavés par 2 centrifugations à 500g<sub>max</sub> 10 minutes dans l'eau distillée.

b - Stérilisation des oocystes

Les oocystes sont suspendus pendant 15 minutes à la température du laboratoire dans une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel Commerciale diluée au demi, soit 24° chlorométrique) puis centrifugés à 650g<sub>max</sub> pendant 10 minutes. Les oocystes forment un voile en surface et sont alors recueillis par aspiration.

L'hypochlorite de sodium résiduel est éliminé par des lavages répétés en solution saline stérile (voir composition ci-dessous) jusqu'à ce que cette dernière ne soit plus décolorée. Les oocystes sont enfin resuspendus dans la solution saline et stockés à 4°C.

Composition de la solution saline : Saline A, PUCK (1957).

Na Cl	80g/l
K Cl	4g/l
Na H CO <sub>3</sub>	3,5g/l
Glucose	10g/l
Rouge de phénol	0,1g/l
Eau distillée	q.s.p. 1l

Cette solution 10 fois concentrée est diluée avec l'eau bidistillée avant utilisation.

c - Excystation des oocystes et isolement des sporozoïtes

Les oocystes sont incubés pendant 30 minutes à 37°C. Cette étape simule le transit dans l'hôte et fragilise les oocystes. La solution est ensuite broyée au broyeur de POTTER : 5 à 6 allers et retours à 1500 rpm suffisent à libérer les sporocystes. Après un lavage dans la solution saline puis centrifugation à 500g<sub>max</sub> pendant 5 minutes, les sporocystes sont excystés par une solution de trypsine de composition :

- Trypsine (Difco 1 : 250) 0,25 g
- Taurocholate de sodium 0,75 g
- Solution saline A (PUCK) pH 7,6 q.s.p. 100 ml.

Le pH de cette solution est ajusté à 7,4 - 7,6 avec du bicarbonate de sodium 0,9 M.

Au bout de 10 minutes à 37°C, les sporozoïtes sont libérés et peuvent être purifiés. Ils sont alors lavés dans une solution Ringer-Tris (WAGENBACH, 1969) de composition :

Na Cl	9 g/l
Ca Cl <sub>2</sub>	0,24 g/l
K Cl	0,42 g/l
KH CO <sub>3</sub>	0,2 g/l
TRIS (Hydroxymethyl)aminomethane	3,03 g/l
Eau distillée q.s.p.	1 l

(le pH est ajusté à 8 par l'acide chlorhydrique N)

Cette solution ayant une force ionique de 0,33 $\mu$  est ramenée pour utilisation à 0,22 $\mu$  par dilution à l'eau bidistillée.

Le culot contient des sporozoïtes, des oocystes non sporulés, les coques d'excystation et des sporocystes ; il est repris dans 5 ml de cette même solution pour être purifié sur colonne de fibres de nylon (leucopak filter, Travenol)

#### d - Préparation de la colonne

Un gramme de fibres de Nylon est régulièrement réparti sur une hauteur de 8 cm dans une colonne de 1 cm de diamètre qui est ensuite équilibrée par passage de 25 ml de tampon. On fait ensuite passer la suspension à purifier, puis 20 ml de tampon. Ce procédé conduit à l'obtention de sporozoïtes purs, contaminés seulement par quelques coques de sporocystes. Les sporozoïtes peuvent être conservés une quinzaine de jours à + 4°C.

### 2 - BRADYZOÏTES DE *Sarcocystis muris*

#### a - Prélèvement des muscles infestés

Nous avons mis au point un protocole permettant l'obtention de quantités importantes de bradyzoïtes purs nécessaires au fractionnement cellulaire. Les souris infestées sont tuées par dislocation des vertèbres cervicales.



La peau est alors dégagée et les muscles sont mis à nus ; les muscles infestés sont découpés et placés dans une solution saline en tampon phosphate (PBS DULBECCO) préparée comme suit :

Na Cl	8 g/l
K Cl	0,2 g/l
Ca Cl <sub>2</sub>	0,1 g/l
Mg Cl <sub>2</sub> ,6 H <sub>2</sub> O	0,1 g/l
Na H PO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2,16 g/l
K H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub>	0,2 g/l
Eau distillée	q.s.p. ll

sont

Ces muscles déchiquetés aux ciseaux et passés ensuite à l'homogénéiseur Virtis 3 à 4 fois 2 minutes ; après ce traitement les muscles sont réduits à des fragments de quelques millimètres.

#### b - Purification des bradyzoïtes

Une première centrifugation à 500 g<sub>max</sub> pendant 5 minutes élimine les graisses qui remontent en surface, elles peuvent entrainer des muscles. Ces derniers sont récupérés et broyés au broyeur Potter par 4 à 5 allers et retours à grande vitesse. Cette fraction est ajoutée au culot de la première centrifugation et l'ensemble est incubé dans une solution de trypsine (Difco 1 : 250) à 0,25% dans le PBS pendant 10 minutes à 37°C.

En général le tissu est entièrement dissocié par ce traitement. La suspension est passée à travers trois épaisseurs de gaze chirurgicale. Deux lavages successifs à 500g<sub>max</sub> pendant 10 minutes dans le PBS permettent d'obtenir des bradyzoïtes purs.

### 3 - BRADYZOÏTES DE *Sarcocystis tenella*

#### a - Prélèvement des kystes

Les oesophages de moutons sont disséqués et les kystes sont extraits de la musculature. Ils sont récupérés dans du PBS contenant 50 µ/ml de pénicilline et 50 µg/ml de Streptomycine ; les kystes dans ce milieu

peuvent être conservés jusqu'à 2 semaines à + 4°C sans altération notable.

#### b - Récupération des zoïtes

La libération des bradyzoïtes est réalisée par passage des kystes à travers une seringue sans aiguille, la seule ouverture du kyste permet la libération de tout son contenu.

Les restes de la paroi kystique sont éliminés par passage de cette solution sur 3 épaisseurs de gaze.

Selon les nécessités expérimentales, les zoïtes peuvent être séparés du reste du contenu kystique par centrifugations répétées à 250 g<sub>max</sub> pendant 5 minutes.

#### 4 - TACHYZOÏTES DE *Toxoplasma gondii*

Ils ont été purifiés par J.F. DUBREMETZ par filtration sur Nucléopore (HANDMAN et al, 1980) en ce qui concerne les Toxoplasmes d'ascite et par filtration sur fibres de verre (GRIMWOOD et al, 1979) pour les tachyzoïtes développés en cellules Hela. Ces derniers sont purs alors que les zoïtes issus de l'ascite sont contaminés par des hématies (1 hématie pour 50 à 200 parasites en général).

### B - METHODES D'OBSERVATION

#### 1 - MICROSCOPIE PHOTONIQUE

##### a - Observations

Nos observations en microscopie photonique ont surtout été orientées vers l'analyse de la dynamique des zoïtes, notamment leur déplacement sur un substrat.

Les observations sur le vivant ont été faites à 37°C à l'aide d'un microscope Leitz (Diavert) muni d'une enceinte thermostatée à 37°C. Pour les marquages en fluorescence, nous avons utilisé deux types de microscopes dotés

d'un système d'épifluorescence, Reichert Microstar 110 et Leitz orthoplan ; les enregistrements ont été réalisés sur film Kodak Ektachrome 400.

#### b - Système d'enregistrement

Les mouvements du sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi* ont été analysés et quantifiés à partir d'un enregistrement sur cassette vidéo.

La préparation de zoïtes est placée sous un microscope à contraste de phase Nachet 300 muni d'une enceinte thermostatée à 37°C.

L'activité des zoïtes est filmée grâce à une caméra Vidéo couleur (D x C 1800 P) adaptée à la sortie du microscope et enregistrée sur magnétophone SONY (U - Matic). L'analyse est réalisée sur l'écran d'un récepteur moniteur SONY.

## 2 - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

#### a - La cryofracture

Le matériel à étudier par cryofracture est fixé dans le glutaraldéhyde 2,5% en tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4 ; après rinçage dans ce même tampon les échantillons sont immergés dans le glycérol 30%. Ils sont congelés ensuite dans l'azote fondant, installés sur des supports en or et fracturés sous vide ( $10^{-6}$  torr) à - 150°C dans un appareil de cryofracture BALZERS BAF 380.

Les surfaces de fracture sont recouvertes par un ombrage d'environ 2nm de platine-carbone dirigé sous un angle de 30°. Les repliques sont consolidées par une couche de carbone de 20 nm, puis ramenées à la température ambiante, nettoyées dans l'hypochlorite de sodium, lavées à l'eau distillée et montées sur grilles en cuivre.

#### b - Analyse en coupes fines des culots de Centrifugation.

Les culots obtenus après fractionnement cellulaire sont préfixés pendant 2 heures à une nuit dans une solution de glutaraldéhyde 2,5% dans le tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4. Après un lavage et une post fixation de 2 heures

au tétroxyde d'osmium à 1% dans le même tampon, le culot est décollé du fond du tube, déshydraté par des concentrations croissantes d'éthanol, avec un passage dans l'acétate d'uranyle 0,5% dans l'éthanol 70°. Deux bains dans l'oxyde de propylène pendant 30 minutes chacun précèdent l'inclusion dans l'épon.

Les coupes semi-fines sont faites avec un couteau de verre, les coupes fines avec un couteau de diamant (Dupont de Nemour).

Ces coupes sont réalisées sur ultramicrotome Reichert OMU2 ou Porter-Blum MT1.

Les coupes semi-fines sont colorées par le Bleu azur B à chaud.

Les coupes fines sont colorées à l'acétate d'uranyle 2% dans l'éthanol 50% puis au citrate de plomb selon REYNOLDS.

Les observations sont faites sur microscopes électroniques Hitachi HU11E et Jeol JEM 120 CX.

## C - EXPERIMENTATION SUR LE ZOÏTE

### 1 - INTERACTION AVEC LES LIGANDS

#### a - Les lectines

Nous avons étudié l'interaction des sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* avec 7 lectines fluorescentes (IBF), dont les noms et les sucres spécifiques sont résumés ci-dessous :

<u>Lectine</u>	<u>Sucre spécifique</u>
<u>Lens Culinaris</u> Agglutinin (LCA)	D mannose et D glucose
<u>Helix Pomatia</u> Agglutinin (HPA)	N acetyl D galactosamine
<u>Limulus Polyphemus</u> Agglutinin (LPA)	Acide N acetyl neuraminique
<u>Phascolus Vulgaris</u> Agglutinin (PHA)	N acetyl galactosamine
<u>Soya Bean</u> Agglutinin (SBA)	N acetyl D galactosamine
<u>Ulex Europeus</u> Agglutinin (UEA)	L - Fucose
<u>Wheat Germ</u> Agglutinin (WGA)	N - acetyl glucosamine
<u>Concanavalia ensiformis</u> Agglutinin (CONA)	mannose et dérivés.

$\alpha$  - marquage

Les incubations étaient réalisées à 0°C dans 1 ml de PBS contenant 50 µg de lectine et 10<sup>6</sup> sporozoïtes. Après 30 minutes à + 4°C, les sporozoïtes sont lavés par deux centrifugations à 500 g<sub>max</sub> dans le PBS puis observés.

$\beta$  - Redistribution :

L'étude de la redistribution du marquage est faite en réalisant l'incubation avec le ligand et <sup>les</sup> lavages à 4°C puis en chauffant à 37°C pendant 5 minutes avant observation.

b - Les Anticorps

Les anticorps ant sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* ont été obtenus chez le lapin (voir plus loin). Nous avons utilisé d'une part le sérum total et révélé alors par un sérum de mouton anti-Immuglobulines de lapin marqué à la fluorescéine et d'autre part, les Immuglobulines purifiées et marquées à la fluorescéine(voir plus loin).

2 - EFFETS DE LA TRYPSINE ET DES DROGUES SUR LA MOBILITE DU ZOITE

a - Activation par la trypsine

Les bradyzoïtes de *Sarcocystis tenella* sont inactifs même à 37°C après leur libération du kyste ; leur activation survient après incubation dans la trypsine.

Nous avons essayé d'une part, l'activation des bradyzoïtes isolés et lavés dans le PBS. D'autre part, nous avons ouvert directement des kystes par seringuage dans la solution de trypsine, puis passage à 37°C.

Les observations ont été réalisées à la même température.

b - Action des drogues

$\alpha$  - inhibiteurs d'enzymes

Lors des essais d'activation enzymatique des zoïtes, nous avons

testé l'action des inhibiteurs des protéases : le N Tosyl-L-Lysine Chloromethyl Ketone HCl (TLCK) spécifique de la trypsine et le Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) de spectre plus large.

Le TLCK est solubilisé directement dans le milieu d'essai, le PMSF hydrophobe était repris dans le dioxane avant d'être dilué dans le milieu à une concentration finale de 2 mM PMSF, 5% Dioxane, ce dernier n'affectant pas la viabilité des zoïtes à cette concentration.

### β - Action de la Cytochalasine

Nous avons par ailleurs testé l'action de la Cytochalasine B : celle-ci est solubilisée dans le DMSO, puis diluée dans le milieu d'essai : le PBS à une concentration finale de 20 µg /ml, 1% DMSO, celui-ci n'affectant pas la viabilité des zoïtes à cette concentration.

### 3 - QUANTIFICATION DES MOUVEMENTS

Nous avons réalisé une série d'enregistrements de une à deux minutes à la même température 37°C. Un premier enregistrement E1 après une minute d'introduction de la lame, le deuxième E2 au bout de 10 minutes à 37°C.

Les différentes préparations proviennent de la même suspension de zoïtes à 10<sup>5</sup> cellules/ml de PBS.

Pour chaque enregistrement (E1 et E2), les distances parcourues par l'extrémité postérieure d'une cinquantaine de zoïtes pendant 30 secondes sont reproduites sur papier Cellophane collé à la surface du récepteur. Les tracés ainsi obtenus, représentant les trajectoires des zoïtes, sont quantifiés grâce à un analyseur d'images MOP KONTRON.

Les valeurs obtenues sont analysées grâce à des méthodes statistiques décrites plus loin (voir résultats).

### D - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

#### 1 - MARQUAGE RADIOACTIF

a - Iodination des protéines superficielles

$\alpha$  - Marquage

Les protéines superficielles des zoïtes de *Sarcocystis tenella*, *Eimeria nieschulzi*, *Toxoplasma gondii* et *Sarcocystis muris* sont mises en évidence par radioiodination catalysée par la lactopéroxydase selon la technique de MARCHALONIS et al (1971)

$5 \cdot 10^6$  zoïtes, repris dans 200  $\mu$ l de PBS sont incubés dans le milieu suivant :

- Iodure de sodium ( $\text{Na}^{125}\text{I}$ , Amersham , 50m Ci/ml.) : 1mCi/ml
- Iodure de potassium  $1,25 \cdot 10^{-6}\text{M}$ .
- Lactopéroxydase (calbiochem, 100 U/mg) 5  $\mu$ g/ml.
- Butylhydroxytoluène 20  $\mu$ g/ml.

Le marquage a lieu à 0°C pendant 15 minutes. La réaction est arrêtée par addition d'azide de sodium  $3 \cdot 10^{-5}\text{M}$  et d'iodure de potassium  $1,25 \cdot 10^{-3}\text{M}$ .

Les cellules sont ensuite lavées trois fois en PBS par centrifugation à 800  $g_{\text{max}}$  pendant 5 minutes, leur viabilité est contrôlée au microscope à contraste de phase.

Les témoins subissent le même traitement en absence de l'enzyme.

Les culots des derniers lavages sont précipités par l'acide trichloroacétique (TCA) à 10% dans le PBS, puis le précipité est recueilli sur filtre Watman GF1. L'incorporation d' $\text{I}^{125}$  est mesurée dans un compteur gamma.

Pour l'analyse électrophorétique, le précipité est solubilisé dans le tampon de reprise des échantillons pendant 3 minutes à 100°C.

$\beta$  - Autoradiographie :

Le gel séché est exposé sur un film Kodak X - AR -5 entre deux écrans renforceurs Dupont ; le temps d'exposition varie de 24 heures à 8 jours à -70°C.

b - Mise en évidence des résidus galactosyl des glycoprotéines membranaires

- Marquage

Les résidus galactosyl et N'acetyl-galactosamine des glycoprotéines membranaires sont marqués par le borohydrure tritié en présence de galactose oxydase, selon le protocole de STECK et al (1974).

Les sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* ( $10^8$ ) sont repris dans un milieu comprenant :

- Phosphate de sodium 20 mM
- Chlorure de sodium 60 mM.
- Galactose oxydase (extraite de *Dactylium dendroides* d'activité 35 U/mg dans du phosphate de potassium 0,1M à pH 7) 0,3 Ui.
- Borohydrure de potassium tritié ( $\text{KB}^3\text{H}_4$ ) 0,1 m Ci (activité spécifique 36 Ci/m Mole).

Nous avons réalisé deux incubations : une à 20°C pendant 1 heure et l'autre à 4°C pendant trois heures. Le milieu d'incubation est ensuite éliminé par centrifugation à 800  $g_{\text{max}}$  pendant 5 minutes, les culots sont remis en suspension dans le tampon phosphate -NaCl contenant 0,001% de  $\text{KBH}_4$ . Ce bain d'arrêt est suivi de deux lavages par centrifugation dans le PBS à 800  $g_{\text{max}}$  pendant 5 minutes.

Une fraction est précipitée par le TCA 10% pour comptage de la radioactivité incorporée ; le précipité est récupéré sur filtre GF 1 Watman qui est introduit dans le mélange lipoluma 9 ml, lumasolve 1 ml, eau distillée 0,2 ml.

La radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation liquide LKB.

Pour l'analyse électrophorétique, les échantillons étaient préparés comme lors de l'iodination.

B - Fluorographie :

Le gel est coloré au bleu de Coomassie, décoloré à l'acide acétique



puis lavé à l'eau distillée, il est ensuite deshydraté par trois bains de dimethylsulfoxyde (DMSO) de 30 minutes chacun, et incubé pendant trois heures dans un bain de liquide scintillateur: 2,5 diphényloxazole (P.P.O) à 20% dans le DMSO.

Le P.P.O. est ensuite précipité par lavage du gel à l'eau distillée, puis le gel est séché.

Pour la révélation des glycoprotéines marquées, le gel est exposé, pendant 15 jours à 3 mois à  $-70^{\circ}\text{C}$  (LASKEY et MILLS 1975) contre un film Kodak XAR 5 préalablement sensibilisé par un flash de lumière.

## 2 - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE SDS

La composition en protéines des fractions est analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dissociant selon LAEMMLI (1970). L'électrophorèse monodimensionnelle est réalisée grâce à un appareil conçu par J.F. DUBREMETZ la bidimensionnelle est effectuée dans un appareil Bieler pour la première dimension et dans un appareil conçu par C. DISSOUS pour la seconde dimension.

### a - Electrophorèse monodimensionnelle

Le gel de séparation est un gradient continu 10 - 20% de polyacrylamide contenant 0,1% de dodecyl sulfate de sodium (SDS) dans du tampon Tris - HCl 375 mM à pH 8,8.

Le gel de concentration est à 5% d'acrylamide dans du Tris - HCl 125 mM à pH 6,8 contenant 0,3% de SDS.

La teneur en protéines de chaque échantillon est préalablement dosée par le réactif BIORAD (Protein Assay).

Les échantillons sont ajustés en Tris - HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2%, Glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,2%.

Les échantillons et les marqueurs de poids moléculaires (MWM Pharmacia) subissent simultanément un traitement par la chaleur de 3 minutes à  $100^{\circ}\text{C}$ , avant leur dépôt.

La migration dure 16 heures à 6 mA dans le tampon tris 10 mM, Glycine 96 mM contenant du SDS à 1%.

b - Electrophorèse Bidimensionnelle

Pour une meilleure résolution des protéines étudiées par analyse électrophorétique nous avons fait appel à l'électrophorèse bidimensionnelle d'après la technique de O'FARRELL (1975) modifiée selon GARRELS (1979).

Ainsi dans une première dimension, les protéines sont séparées selon leurs points isoélectriques, la deuxième dimension les sépare suivant leurs poids moléculaires.

- Première dimension :

Des tubes de verre de 140 mm de long et de 2,7 mm de diamètre interne sont fermés dans le bas par un parafilm et remplis d'une solution de gel contenant 3,8% d'acrylamide, 9,5 M urée, 4% NP40 et 2% d'ampholines (LKB) dont 1,6% de gamme de pH 5 -7 et 0,4% de gamme de pH 3,5 - 10.

Les protéines lors de leur migration seront arrêtées au niveau de leurs points isoélectriques respectifs.

Les échantillons sont concentrés et dialysés au moyen d'un système Micro Prodicon, puis lyophilisés. Ils sont solubilisés dans la solution de reprise suivante : 9,5 M urée, 4% NP40, 5% B mercaptoethanol, 3% SDS et 2% ampholines.

La migration est effectuée du côté basique (NaOH 0,02 M) vers le côté acide (H3 PO4 0,01M) pendant 16 heures à 400 volts puis 1 heure à 800 V à 28°C.

Les gels sont ensuite équilibrés environ une heure sous agitation constante dans 20 ml de tampon Tris-HCl 62,5 mM à pH 6,8 contenant 10% (v/v) de Glycérol, 5% (v/v) de B mercaptoethanol et 2,3% (p/v) de SDS.

Toutefois, les gels peuvent être immédiatement congelés à -70° pour une électrophorèse ultérieure mais un équilibrage est nécessaire avant la seconde dimension.

### $\beta$ - Deuxième Dimension

Elle est pratiquée de la même manière qu'une électrophorèse monodimensionnelle, en gel de polyacrylamide 15%.

Le boudin de la première dimension est maintenu sur le gel de concentration par l'agarose à 1% dans le tampon d'équilibrage, la migration dure 5 heures à 20 mA.

Afin de déterminer les poids moléculaires des protéines, des marqueurs de poids moléculaires (MWM Pharmacia) sont également déposés.

### c - Coloration des gels

#### $\alpha$ - Coloration au Bleu de Coomassie

Le gel est coloré pendant 2 heures sous agitation dans une solution de Bleu de Coomassie R à 0,02% dans l'acide acétique 7% puis séché par évaporation sous vide dans un sécheur de gel Pharmacia.

#### $\beta$ - Coloration à l'argent

La teneur en protéines d'une suspension de ghosts est en général assez faible, et le dépôt en électrophorèse bidimensionnelle de l'ordre de quelques dizaines de microgrammes. Nous avons donc souvent utilisé une coloration à l'argent qui est de 50 à 100 fois plus sensible que le bleu de Coomassie.

Les techniques de coloration à l'argent diffèrent par leur pouvoir de résolution (de l'ordre d'une centaine de nanogrammes) et la quantité de produits utilisés. Nous avons utilisé la méthode de MERRIL et al (1981) très sensible, facile à réaliser et peu onéreuse (OCHS et al 1981).

Le gel est préfixé dans du méthanol 50% - Acide acétique 12% pendant 20 minutes. L'excès de SDS est enlevé du gel par 3 lavages de 10 minutes chacun dans l'éthanol 20% acide acétique 5%. Après incubation dans le bichromate de Potassium 0,0034M en milieu acide (acide nitrique 0,0032M) pendant 5 minutes sous agitation, le gel est lavé 4 fois à l'eau distillée, puis incubé dans une solution de Nitrate d'argent 0,012M pendant 30 minutes sous lumière fluorescente. Deux rinçages rapides dans une solution de carbonate de

sodium 0,28M, Formaldehyde Commercial 0,5 ml/l précèdent une troisième incubation dans cette solution, sous éclairage, jusqu'à obtention de la teinte désirée. La coloration est arrêtée en remplaçant le bain précédent par l'acide acétique à 1%. Ce dernier est éliminé par deux bains d'eau distillée avant le stockage des gels.

Pour la différenciation, le gel est incubé dans une solution ammoniacale contenant : 0,37% de chlorure de sodium, 0,037% de sulfate de cuivre et 4,37% de thiosulfate de sodium.

### 3 - FRACTIONNEMENT CELLULAIRE

Les zoïtes destinés au fractionnement (*Sarcocystis muris* et *Eimeria nieschulzi*) sont fraîchement préparés comme il a été décrit auparavant. Ils sont suspendus ensuite à raison de  $10^8$  zoïtes /ml dans 40 ml de milieu d'homogénéisation : tampon triethanolamine - HCl 5 mM pH 7,5, sucrose 250 mM EDTA 1mM (Te - sucrose) ; la même solution est utilisée pour les gradients, en faisant varier la concentration de sucrose.

#### a) Homogénéisation

La suspension des cellules est passée à la French Press, et l'homogénéisation est réalisée sous une forte pression (voir plus loin, chap. résultats). Les pellicules des zoïtes sont ensuite isolées par centrifugation sur gradient discontinu de sucrose dans une ultracentrifugeuse BECKMANN L 65 B. (Le protocole de l'homogénéisation sera détaillé dans le chap. résultats). La fraction de pellicules collectée est diluée par au moins 4 volumes de Te-sucrose, lavée par centrifugation, puis fixée ou reprise dans un faible volume de tampon et congelée pour analyse électrophorétique.

#### b) ultra sons

Le traitement par les ultrasons de pellicules purifiées a été réalisé sur un générateur MSE. La suspension est ensuite lavée par centrifugation puis le culot est fixé pour analyse ultrastructurale.

c) Essai de sous fractionnement

Une partie des pellicules passées aux ultrasons, est déposée sur gradient continu de sucrose ; après ultracentrifugations, les sous fractions sont analysées au moyen d'un fractionneur de gradient ISCO mesurant la densité optique à 280 nm. (voir résultats).

4 - PREPARATION DES ANTICORPS ET DES IMMUNOGLOBULINES :

a - Les Anticorps

Les anticorps ant sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* ont été préparés chez le lapin par la méthode de VAITUKAITIS et al (1971). Des lapins reçoivent chacun 1 ml d'une émulsion, à parties égales de PBS et d'adjuvant de Freund complet, contenant  $10^8$  sporozoïtes préalablement congelés ; 50 injections intradermiques sont pratiquées dans la région dorsale dont la fourrure a été auparavant rasée. L'immunisation est contrôlée par immunodiffusion en gélose selon OUCHTERLONY.

b - Purification des Immunoglobulines

Les immunoglobulines ont été purifiées à partir du sérum immun, selon le protocole suivant :

- Préci $\ddot{u}$ itation par le sulf $\ddot{a}$ te d'ammonium

Cette opération est effectuée à 4°C.

Le sérum est dilué par un volume de tampon phosphate 10 mM pH 7,2, Na Cl 15mM (PS). Au volume obtenu on ajoute une solution de sulfate d'ammonium 3,8M, pour avoir une concentration finale de 1,6 M. La précipitation dure 30 minutes ; et le précipité, rassemblé par centrifugation à 12.000 g<sub>max</sub> pendant 15 minutes, est repris dans un volume de tampon PS, égal au volume du sérum dilué. Une deuxième précipitation au sulfate d'ammonium 1,6 M est conduite comme la précédente. Le culot est dissous dans du tampon PS le volume de la solution est égal à la moitié de celui du sérum initial.

Cette solution est dialysée pendant 24 heures contre le tampon PS, puis centrifugée à basse vitesse.

- Chromatographie sur DEAE et CM Cellulose

Le surnageant de la dernière centrifugation est passé sur une colonne de 1,5 cm de diamètre, contenant 10 cm de carboxymethyl (CM) cellulose recouverts de 10 cm de Diethylaminoethyl (DEAE) cellulose stabilisés dans du tampon PS. Le pH à la sortie de la colonne est 7,2.

La fraction non retenue est collectée, concentrée contre l'aquacide puis dialysée contre le tampon carbonate -NaCl 0,2M avant d'être couplée à la fluoresceine.

- Marquage des IgG à la fluoresceine

Les IgG sont incubées pendant 4 heures à 20°C à l'obscurité dans une solution d'isothiocyanate de fluoresceine (à raison de 1mg du fluorochrome pour 50 mg de protéines) préparée dans le tampon bicarbonate - Carbonate de sodium 50 mM, pH 9,25, NaCl 150 mM

Cette solution est déposée sur une colonne de Sephadex G 25 (48 cm x 1cm) équilibrée dans le même tampon.

A la sortie de la colonne, la densité optique est mesurée à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre ISCO, et le premier pic, correspondant aux IgG fluorescentes est retenu et conservé à 4°C.

## CHAPITRE 2

### STRUCTURE DE LA PELLICULE

L'étude de la pellicule des zoïtes de coccidies a été poursuivie par trois approches différentes :

- L'analyse ultrastructurale par cryofracture des pellicules in situ et après leur isolement.

- Le marquage des protéines superficielles (Iodination enzymatique et lectine).

- Le fractionnement cellulaire et l'isolement des pellicules puis leur analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide - S.D.S.



# I ULTRASTRUCTURE DE LA PELLICULE DES ZOÏTES DE *Sarcocystis muris*

## 1 - CYTOLOGIE (Pl. I, fig.2 )

Le zoïte de *Sarcocystis muris* est une cellule allongée en forme de banane, dont la longueur est d'environ  $15\mu$ . Il montre une organisation antéro-postérieure ; il est délimité par une pellicule trimembranaire constituée par une membrane unitaire de structure classique (ROBERTSON 1957) doublée vers l'intérieur par un complexe bimembranaire.

La partie antérieure du zoïte est organisée en un complexe apical constitué : d'un anneau d'insertion des microtubules sous pelliculaires. Ces derniers, au nombre d'une vingtaine, longent la face interne de la pellicule selon l'axe du zoïte .

- d'un conoïde (en forme de tronc de cône) formé de fibres spirales et surmonté de deux anneaux apicaux.

- Des rhoptries, organites en forme de massue.

- Des organites en forme de navettes, Les micronèmes qui peuvent être répartis dans toute la moitié antérieure de la cellule.

- D'autres organites de forme sphérique, les granules denses, sont également présents.

Le cytoplasme renferme les organites cytoplasmiques classiques avec noyau dans la moitié postérieure du corps, appareil de Golgi et mitochondries ainsi que reticulum endoplasmique.

## 2 - CRYOFRACTURE

La cryofracture a apporté des informations complémentaires à celles obtenues par cytologie ultrastructurale , en particulier en ce qui concerne la configuration spatiale et l'organisation interne des membranes.

### Terminologie :

Lors de la fracture, la membrane est clivée au niveau de la zone interne hydrophobe, séparant ainsi deux faces : l'une adjacente au cytoplasme et qui est appelée face P et sa complémentaire ou face E, d'après la nomenclature de BRANTON et al (1975).

Comme nous l'avons signalé, la pellicule du zoïte est trimembranaire. Trois plans de fracture préférentiels peuvent donc résulter de la cryofracture. Au niveau de la réplique, les faces seront désignées selon la terminologie de DUBREMETZ et TORPIER (1978) par les lettres P et E affectées des indices e, m et i respectivement pour les faces protoplasmique et externe du plasmalemme, de la membrane moyenne et de la membrane interne.

L'analyse des répliques de bradyzoïtes de *Sarcocystis muris* enkystés montre que comme chez les autres Sporozoaires, trois plans de fracture sont rencontrés dans la pellicule.

#### a - Le plasmalemme

La distribution des particules intramembranaires (P.I.M.) est homogène au niveau des faces P et E du plasmalemme. Les particules ne présentent pas d'orientation préférentielle ; elles semblent plus abondantes dans la face P que dans la face E (planche II fig. 1).

La face<sup>P</sup> montre par endroits des alignements de P.I.M. (ne dépassant pas une dizaine de particules) orientés selon l'axe du parasite ou dans le sens transversal. Dans certains cas, ces alignements coïncident avec les sutures du complexe interne sous jacent (pl. II fig. 2).

Une rosette apicale de 6 à 8 particules est présente dans la face P e à l'extrémité antérieure du zoïte (pl. II fig.4 ).

#### b - Le complexe interne

Le complexe interne apparait formé par un agencement de plaques allongées en rangées hélicoïdales entourant le zoïte. Ces plaques sont délimitées

par des lignes de sutures.

Les P.I.M. dans les faces E sont moins abondantes que dans les faces E du plasmalemme. Au niveau des faces P, les particules sont organisées en alignements parallèles orientés selon l'axe antéropostérieur du zoïte (Pl. II fig. 1 ). Ces alignements se poursuivent d'une plaque à une autre.

Une vue détaillée de ces faces montre une organisation supplémentaire. Parmi les alignements, on trouve deux lignes plus riches en particules : occupant le même emplacement au niveau de chaque plaque : ces deux alignements (pl.II fig. 3) sont situés en moyenne à 6 rangées de particules du bord de la plaque et séparés entre eux par 9 rangées de particules.

Nous n'avons obtenu qu'une image (pl.II, Fig.5 ) de la région antérieure : elle suggère l'existence d'une cape apicale et d'alignements particuliers comparables à ceux décrits chez *Sarcocystis tenella*, *Toxoplasma gondii* (PORCHET et TORPIER, 1977) et *Eimeria nieschulzi* (DUBREMETZ et TORPIER 1978).

## II ANALYSE BIOCHIMIQUE DE LA SURFACE DES ZOÏTES DE COCCIDIES

### A - IODINATION SUPERFICIELLE

#### 1 - *Eimeria nieschulzi*

L'iodination superficielle du sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi* met en évidence une protéine majeure à 17 kilodaltons (kd); des bandes mineures apparaissent également à 87, 28, 24 kd et une quatrième à un poids moléculaire inférieur à 14 kd (pl. II fig. B).

#### 2 - *Sarcocystis muris*

Chez *Sarcocystis muris*, l'autoradiogramme montre une bande majeure à 14 kd ; une autre plus faible apparaît à 28 kd (pl.III fig.A ). Cet autoradiogramme sera comparé avec l'électrophorégramme des pellicules isolées (pl. IV, Fig.B ).



Proteines superficielles (P.M en kd.)

	<i>Eimeria nieschulzi</i>	87	28	24 (24)	17*	14*	<14
	<i>Sarcocystis muris</i>		28 (30)			14*	
<i>tenella</i>	zoïtes non trypsinés	87	30				
	zoïtes trypsinés	87	30		17*		
<i>gondii</i>	zoïtes issus d'Ascite		67	44	31	27	22
	zoïtes issus de cellules			44	31		22

\* Protéines majeures

( ) Protéines majeures des "ghosts"

### 3 - Sarcocystis tenella

L'expérimentation entreprise sur l'effet activateur de la trypsine (voir chap. II) sur les bradyzoïtes de *Sarcocystis tenella*, nous a conduit à réaliser l'iodination :

- de bradyzoïtes trypsinés

- de bradyzoïtes non trypsinés. Certains de ces derniers ont été ensuite trypsinés.

L'autoradiographie montre les résultats suivants (pl.III fig. E et F) : chez le zoïte non trypsiné, deux protéines sont iodées : une à 30 et l'autre à 87 kd. Après trypsination, on retrouve les mêmes bandes avec apparition d'une nouvelle à 17 kd.

Chez les zoïtes trypsinés après iodination, deux bandes sont mises en évidence à 30 et 17 kd.

Dans le but d'un marquage plus superficiel des protéines membranaires, nous avons essayé l'iodination des bradyzoïtes avec des billes hydrophiles de plusieurs microns de diamètre (enzymobead Bio Rad) sur lesquelles sont fixées glucose oxydase et lactopéroxydase. Ce traitement s'est avéré létal pour les zoïtes ; l'autoradiogramme montre dans ce cas le marquage de deux protéines supplémentaires à 20000 et 22000 en plus des protéines marquées avec la lactopéroxydase libre. Ces deux protéines correspondent à celles des micronèmes, ce qui suggère un marquage des protéines internes du zoïte.

### 4 - Toxoplasma gondii

Nous avons utilisé, pour la radioiodination superficielle, des tachyzoïtes isolés à partir d'ascite et des tachyzoïtes purifiés à partir de cellules en culture.

a - Tachyzoïtes issus d'ascite (selon HANDMAN et al 1981)

L'autoradiographie révèle chez ces tachyzoïtes des bandes à 67, 44, 31, 27, 22 et 14 kd (pl.III, fig. G)

b - Tachyzoïtes issus de cellules en culture (selon GRIMWOOD et al 1980)

Trois bandes apparaissent sur l'autoradiogramme (pl.III, fig. H) à 44, 31 et 22 kd.

B - MISE EN EVIDENCE DES RESIDUS GALACTOSYLS  
CHEZ LE SPOROZOÏTE D'*Eimeria nieschulzi* : MARQUAGE PAR LA  
LECTINE HPA.

Parmi toutes les lectines fluorescentes (voir matériels et méthodes) utilisées pour le marquage superficiel du sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi*, seule la HPA (Helix pomatia agglutinin) a marqué ces derniers : les sporozoïtes sont fortement agglutinés, la fluorescence est accentuée au centre de l'agregat, mais le marquage est moins intense chez les zoïtes libres (pl.IX, fig. 1). La fluorescence et l'agglutination sont inhibées par la galactosamine à 200 mM dans le milieu d'interaction.

Un essai de marquage superficiel des résidus galactosyls a été réalisé par oxydation à la galactose oxydase et réduction au borohydrure tritié. Il n'a pas donné de résultat concluant alors que des *Gregarina garnhami* et des globules rouges de souris traités simultanément présentaient un marquage abondant des glycoprotéines superficielles.

### III ISOLEMENT ET ANALYSE DES PELLICULES

L'analyse des composants membranaires des zoïtes de Coccidies a nécessité l'isolement de leurs pellicules par fractionnement cellulaire. La quantité importante de parasites requise par cette technique a limité notre étude à deux Coccidies : *Sarcocystis muris* et *Eimeria nieschulzi*.

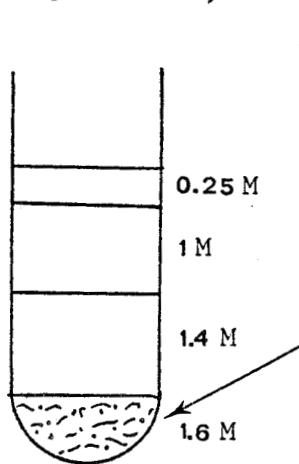
homogénat



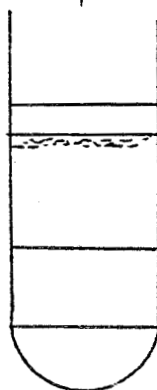
18 000 g max 10 minutes



culot ajusté à 1,6M



113 000 g max (1 heure)



pellicules

BUS  
LILLE

A - Sarcocystis murisI - MISE AU POINT DE L'ISOLEMENT DE LA PELLICULE

Nous avons dans un premier temps utilisé le protocole de fractionnement cellulaire déjà établi pour *Sarcocystis tenella* (DUBREMETZ 1980), où la pression d'homogénéisation à la French Press est de  $50 \text{ kg/cm}^2$ . La fraction de pellicules recueillie à la suite de ce traitement montre des ghosts dont certains présentent encore des structures apicales (conoïde, anneaux apicaux). Les microtubules sous pelliculaires sont également conservés.

En plus de ces structures liées aux ghosts, d'autres organites cytoplasmiques viennent contaminer la fraction de pellicules notamment les granules denses et les mitochondries (pl.I, fig.2 et 3).

En vue d'améliorer cette technique et d'obtenir une fraction purifiée de pellicules, nous avons modifié les conditions d'homogénéisation, étape primordiale du fractionnement cellulaire. Ainsi sous une pression de  $115 \text{ kg/cm}^2$  presque toutes les cellules sont complètement vidées ; les organites cellulaires peuvent être altérés, mais les pellicules sont préservées bien que plus fragmentées et donc moins susceptibles de piéger des organites (pl.IV, fig. 1).

Le protocole d'isolement de la pellicule est résumé dans le schéma ci-joint :

Les cellules restées intactes après l'homogénéisation ou mal vidées, sont éliminées par une première centrifugation à  $500 \text{ g}_{\text{max}}$  pendant 5 minutes. Les pellicules des zoïtes sont ensuite isolées par centrifugation sur gradient discontinu de sucrose comme suit : l'homogénat est centrifugé à  $18000 \text{ g}_{\text{max}}$  pendant 10 minutes, le culot est resuspendu dans la solution d'homogénéisation puis la suspension est ajustée à  $1,6 \text{ M}$  par du sucrose  $2,2 \text{ M}$ . Des portions de  $10 \text{ ml}$  sont déposées dans des tubes de  $38 \text{ ml}$  puis recouvertes successivement par :  $12 \text{ ml}$  de sucrose  $1,4 \text{ M}$ ;  $12 \text{ ml}$  de sucrose  $1 \text{ M}$  et  $4 \text{ ml}$  de solution d'homogénéisation ( $0,25 \text{ m}$ ) ; les tubes sont centrifugés à  $113000 \text{ g}_{\text{max}}$  pendant 1 heure en rotor SW 27.

L'interface  $0,25 - 1 \text{ M}$  contenant les ghosts est collectée avec une pipette, diluée par au moins 4 volumes de Te - sucrose, et centrifugée à  $18000 \text{ g}_{\text{max}}$  pendant 20 minutes. Le culot est ensuite fixé ou repris dans un faible volume de tampon, et congelé pour analyse électrophorétique.



## 2 - ANALYSE ULTRASTRUCTURALE.

### a - Coupes minces

L'observation au microscope électronique de la fraction pellicules montre qu'elle est composée essentiellement de fragments de pellicule dont la structure trimembranaire est conservée (pl.IV, fig.2et3)Le complexe membranaire interne est soit continu, soit formé de petites vésicules tapissant le plasmalemme. Quelques sections transversales montrent des microtubules sous pelliculaires qui persistent contre certaines pellicules.

### b - Cryofracture

#### - Le plasmalemme

La face P du plasmalemme présente un aspect bosselé et une désorganisation des P.I.M. (pl.V , fig. 1). Ces dernières ne sont plus réparties régulièrement sur cette face comme chez le zoïte intact , mais tendent à se grouper en amas . Les petits alignements de particules déjà observés ne sont plus repérables.

La face E présente une organisation comparable à celle de la face P avec des zones d'agregation des P.I.M.

#### - Le complexe membranaire interne

Les membranes du complexe interne sont les plus altérées par le fractionnement cellulaire. En effet, alors que chez le zoïte entier les faces Pm et Pi montrent une organisation parfaite des P.I.M. en lignes parallèles et doubles alignements, dans les "ghosts" fracturés les P.I.M. des faces P sont réparties sans orientation apparente (pl.V , fig.3 ). Leur distribution est hétérogène, certaines zones montrent une grande densité de P.I.M. alors que d'autres en sont dépourvues .

Les surfaces de fracture étant assez réduites, nous n'avons pu suivre les limites des plaques du complexe interne. Toutefois dans certaines fractions de membrane où la face Pi et la face E sont restées adhérentes, les lignes

de sutures sont préservées, mais l'organisation des P.I.M. reste altérée au niveau de la face Pi (Fig.3 ).

### 3 - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DE LA FRACTION DES PELLICULES

#### a - Electrophorèse monodimensionnelle

Nous avons dans un premier temps analysé la fraction de pellicules par électrophorèse monodimensionnelle. Elle a été comparée au profil de la fraction granules denses abtenue par DUBREMETZ (1981) et avec les zoïtes entiers.

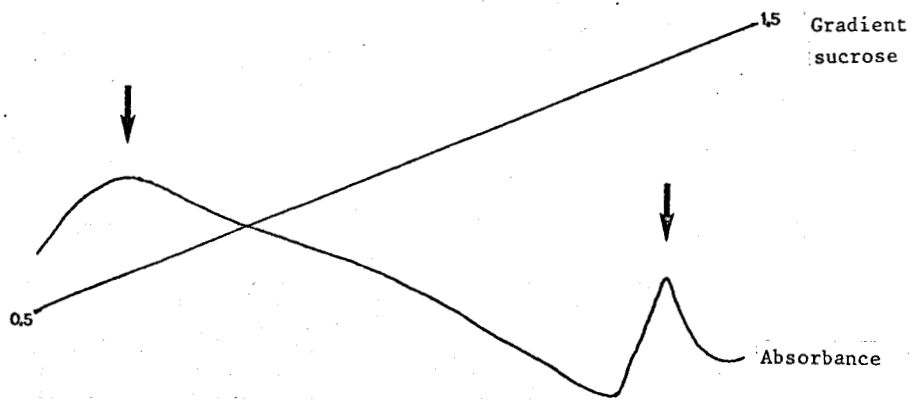
L'analyse électrophorétique montre que la fraction des pellicules renferme une protéine majeure de poids moléculaire 31 kd, proche de celle présente dans les granules denses. Trois autres bandes moins importantes apparaissent à 84,85 et 42 kd (pl.IV, fig.B ).

En comparant le profil des pellicules à celui des zoïtes entiers, on remarque un léger décalage entre la protéine majeure des "ghosts" et celle des granules denses (pl.IV, Fig. A. et C).

Cette première analyse électrophorétique laissait supposer une contamination des pellicules isolées par les granules denses malgré leur absence en ultrastructure. Une deuxième analyse par électrophorèse bidimensionnelle s'imposait donc pour lever cette ambiguïté.

#### b - Electrophorèse bidimensionnelle

La coloration au bleu de coomassie du gel de l'électrophorèse bidimensionnelle des pellicules de *Sarcocystis muris* met en évidence une protéine majeure dont le point isoélectrique (pHi) est aux environs de 5 à 5.5 (pl.VI, fig.1 ), alors que la tache majeure des zoïtes entiers, qui correspond aux granules denses, est voisine de 7 (pl.VI, fig.2 ).



Profil densitométrique du sous-fractionnement de la pellicule  
de Sarcosystis muris



La coloration des gels à l'argent, de résolution plus fine, permet de révéler dans les ghosts, en plus de la protéine majeure, plusieurs spots dont les pHi sont compris entre 5 et 7 et les poids moléculaires entre 60 kd et 14 kd.

#### 4 - ESSAI DE SOUS-FRACTIONNEMENT

Des expériences préliminaires ont été tentées en vue d'essayer de séparer le plasmalemme du complexe membranaire interne à partir des pellicules isolées.

La fraction des pellicules purifiées a été traitée par les ultrasons pendant 2 minutes. Une aliquote est analysée en ultrastructure, le reste de la fraction est déposé sur un gradient continu de sucrose.

##### a - Analyse ultrastructurale

A la suite du traitement par les ultrasons, la fraction de pellicules apparait formée essentiellement de vésicules de tailles variables. Ces vésicules sont formées de membranes unitaires (pl.VII,fig.1 ). Deux types de vésicules peuvent être distingués selon l'épaisseur et le contraste de leur membrane : l'un à la membrane épaisse rappelle le plasmalemme (pl.VII,fig.2 ), tandis que l'autre à la membrane mince et peu contrastée évoque le complexe membranaire interne (pl. VII, fig. 2).

##### b - Centrifugation sur gradient continu de sucrose

La centrifugation sur gradient discontinu de sucrose de l'homogénat de zoïtes a permis d'isoler une fraction pure de "ghosts" au niveau de l'interface 1M - 0,25 M. En s'appuyant sur cette donnée nous avons utilisé, pour tenter d'isoler des sous fractions de pellicules, un gradient continu de sucrose 0,5 M - 1,5 M. Après centrifugation à 200 000  $g_{max}$  pendant 1 heure dans des tubes de S W 40, le profil densitométrique a permis de mettre en évidence 2 pics d'absorbance maximum (voir profil) correspondant au passage de deux

niveaux distincts. Ces deux pics pourraient représenter deux sous fractions de pellicules.

La quantité insuffisante de matériel a limité jusque là notre recherche. Nous n'avons pu analyser séparément les sous fractions en ultrastructure ni établir leur composition protéique par électrophorèse.

## B - Eimeria nieschulzi

Le protocole établi pour le fractionnement cellulaire et l'isolement de la pellicule de *Sarcocystis muris* a été appliqué au fractionnement des sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi*.

### 1 - ANALYSE ULTRASTRUCTURALE

Les coupes fines des pellicules isolées montrent qu'elles sont constituées essentiellement des "ghosts" ayant conservé leur structure trimembranaire. Le complexe interne parfois plus vésiculisé reste adhérent au plasmalemma (pl. VIII, fig. let2). Ces "ghosts" peuvent emprisonner des vésicules de petite taille limitées par une membrane unitaire ; la possibilité d'une contamination par des membranes cytoplasmiques ne peut être exclue.

Les microtubules sous-pelliculaires persistent in situ. Quelques "ghosts", imparfaitement vidés, emprisonnent des organites (rhoptries, micronèmes).

### 2 - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE

Le profil électrophorétique montre une protéine majeure à 24kd. D'autres bandes moins importantes apparaissent à 44, 58, 68, 84 kd.

## IV DISCUSSION

### 1 - PROTEINES SUPERFICIELLES

La radioiodination enzymatique, catalysée par la lactoperoxydase permet de fixer l'iode radioactif sur les résidus tyrosine des chaînes polypeptidiques (MARCHALONIS 1971). Chez tous les zoïtes étudiés, un nombre généralement très faible de protéines superficielles majeures iodifiables a été mis en évidence. Ceci signifie en fait qu'il existe peu de résidus tyrosyl accessibles à la surface des zoïtes, et ne préjuge pas de l'existence de protéines superficielles pauvres en cet acide aminé.

Deux catégories de zoïtes ont été examinés : d'une part ceux pour qui l'exposition aux enzymes intestinaux est obligatoire pour poursuivre le cycle (*Eimeria* et *Sarcocystis*) et d'autre part ceux qui ne sont pas exposés aux enzymes à cette phase de leur cycle (*Toxoplasma*). Chez les premiers, après exposition à la trypsine, on note l'existence d'une protéine majeure de faible poids moléculaire. Nous ne pouvons toutefois pas préciser si ces molécules présentent une parenté entre elles ou si leur seul caractère commun est d'avoir un faible poids moléculaire.

Aucun autre résultat n'est disponible dans la littérature pour le comparer aux nôtres. DUBREMETZ (1981) a montré par l'iodination de *Sarcocystis tenella*, le marquage de deux protéines supplémentaires à 20 000 et 22 000. Ayant repris ses conditions de marquage, nous avons obtenu le même résultat, avec une altération notable des zoïtes ; il semble donc que les deux bandes correspondent au contenu des micronèmes (DUBREMETZ et DISSOUS, 1980).

Une différence notable est mise en évidence entre les tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* issus d'ascite et ceux isolés à partir des cellules en culture. Le nombre de protéines iodifiables est plus important dans

le premier cas. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par HANDMAN et al (1980) sur des zoïtes d'ascite. Nous pouvons attribuer une telle différence à une contamination des parasites par des composants d'ascite : adsorption des protéines sériques, présentes dans le milieu, à la surface du zoïte, hypothèse également envisagée par HANDMAN et al. D'après nos résultats, les zoïtes de *Toxoplasma* présenteraient donc à leur surface 3 protéines majeures iodifiables de 44,31 et 22 kd.

Les zoïtes de *Plasmodium* ne sont pas exposés aux enzymes digestifs, et un nombre restreint de protéines majeures iodifiables est détecté chez les sporozoïtes : 2 protéines (110 et 53 kd) chez *Plasmodium berghei* (VERMEULEN et al 1982).

La faible quantité de protéines superficielles ne semble pas être en rapport avec l'exposition des zoïtes aux enzymes de l'hôte

Nous avons montré l'action de la trypsine sur les protéines superficielles du bradyzoïte de *Sarcocystis tenella*. Cet enzyme fait apparaître une protéine à 17 kd et d'autres polypeptides de faible poids moléculaire, qui n'existaient pas avant trypsination. Nous verrons plus loin que la trypsine joue un rôle dans l'activation du bradyzoïte. Nous pouvons donc supposer que chez les sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* avant excystation ou les cystozoïtes de *Sarcocystis muris* intrakystiques, les profils d'iodination pourraient présenter des différences avec ceux que nous avons obtenus.

Le sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi* montre une très faible affinité aux lectines et un marquage insignifiant par le borohydrure tritié. Les résultats témoignent d'une grande pauvreté en résidus glucidiques superficiels, qui peuvent appartenir soit à des glycolipides, soit à des glycoprotéines. Chez les autres coccidiomorphes, la même observation a été faite pour *Toxoplasma gondii* (HANDMAN et al 1980, MAURAS et al 1980) et *Plasmodium gallinaceum* (TURNER et GREGSON 1982). A l'inverse, la quantité de sucres de surface est importante chez les Gregarines. Ainsi PHILIPPE et al (1979) ont montré que galactose, mannose, glucose, glucosamine et galactosamine sont présents à la surface de *Gregarina blaberae*. Cette importance de sucres chez les Grégarines

est attribuée à leur revêtement membranaire bien développé qui aurait un rôle protecteur chez ces parasites. (SCHREVEL 1972)

## 2 - ARCHITECTURE DE LA PELLICULE

La cryofracture d'une part, la purification des "ghosts" d'autre part renseignent sur l'organisation des différents composants de la pellicule et les relations entre ceux-ci.

### a - Cryofracture

L'architecture de la pellicule du zoïte de *Sarcocystis muris* ne diffère pas dans son organisation générale de celle des autres zoïtes de Coccidies déjà décrits : *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii* (PORCHET et TORPIER 1977), *Eimeria nieschulzi* (DUBREMETZ et TORPIER 1978) et *Aggregata eberthi* (PORCHET et al 1982).

Nous n'avons pas quantifié les différences éventuelles tenant soit à la densité des P I M soit au nombre de plaques ou d'alignements de P I M du complexe membranaire interne, Ce dernier étant constitué de P I M de taille homogène, organisées selon des rangées longitudinales. Les petits alignements de particules de la face Pe, dont certaines répliques montrent la correspondance avec les lignes de suture des plaques, seraient un argument en faveur d'une éventuelle liaison entre le plasmalemma et le complexe interne.

### b - Pellicules isolées

#### - Pureté

Lors du fractionnement cellulaire, nous avons soumis les deux parasites : *Sarcocystis muris* et *Eimeria nieschulzi* à la même pression d'homogénéisation et au même protocole de purification.



L'analyse des pellicules isolées montre que ces deux parasites se comportent différemment : alors qu'avec *Sarcocystis muris* nous avons isolé une fraction de pellicules propres ; *Eimeria nieschulzi* produit des "ghosts" dans lesquels subsistent encore des organites cytoplasmiques. Par comparaison avec ces deux parasites, *Sarcocystis tenella* semble plus facile à homogénéiser puisqu'une pression de  $50 \text{ kg/cm}^2$  permet d'isoler des pellicules relativement propres (DUBREMETZ 1981). La taille des parasites ne semble pas être le facteur déterminant dans cette résistance, car *Sarcocystis muris* et *S. tenella* sont de tailles comparables. Toutefois, nous avons homogénéisé le culot de la première centrifugation au Potter, alors que l'homogénéiseur Dounce a été utilisé pour *Sarcocystis tenella*, ce qui peut également introduire une différence dans les résultats.

L'analyse des répliques en cryofracture confirme en partie la propreté des pellicules : elle lève le doute sur une éventuelle contamination par les enveloppes nucléaires : nous n'avons pas trouvé de pores nucléaires dans les membranes observées. Nous ne pouvons par contre pas exclure l'existence d'autres membranes plasmiques.

#### - Structure

La structure trimembranaire de la pellicule est conservée après isolement de celle-ci. Les deux membranes : plasmalemme et complexe interne restent solidaires, il s'agit donc d'un système cohérent. PHILIPPE et al (1979) par leur étude sur *Grerarina blaberae* remarquent que les "ghosts" sont également constitués par la juxtaposition de trois membranes.

Cependant certaines désorganisations sont à noter dans les pellicules isolés :

- Le plasmalemme conserve sa structure en feuillet membranaire mais les P I M y sont désorganisées.

- Le complexe interne résiste peu aux forces d'homogénéisation et se résout en vésicules de petites tailles. L'aspect bourgeonnant de certaines faces Pe et Em, observé en cryofracture, est en rapport avec la vésiculation des membranes du complexe interne. Ce dernier est donc moins stable, son organisation spatiale dépend de l'intégrité de l'organisme. Ceci suggère l'existence d'interactions étroites entre le complexe interne et les formations qui l'encadrent : plasmalemme et microtubules sous pelliculaires.

PORCHET (1977) et DUBREMETZ (1978) ont montré que les doubles alignements de P I M au niveau des faces Pm et Pi correspondent en nombre et en disposition aux microtubules sous pelliculaires. Une altération due à l'homogénéisation conduit à la désorganisation des P I M au niveau des membranes du complexe interne et pourrait traduire la destabilisation d'un système basé sur l'interaction membrane-microtubules. Ce type d'interaction existe également dans les flagelles (BLOODGOOD 1977) et les cils (DENTLER et al 1980).

#### - Composition

Chez *Sarcocystis muris*, les "ghosts" contiennent une protéine majeure qui au premier abord semble être celle des granules denses, mais que l'analyse ultrastructurale et l'électrophorèse bidimensionnelle ont permis d'attribuer aux pellicules. Cette protéine n'est pas marquée par l'iode, deux éventualités peuvent donc être posées :

- il s'agit d'une protéine externe ne présentant pas de résidus tyrosyl accessibles en surface.
- C'est une protéine profonde localisée dans le plasmalemme, entre le complexe interne et le plasmalemme ou dans le complexe interne.

Un sous fractionnement des "ghosts" avec analyse biochimique des sous fractions s'avère nécessaire afin de pouvoir localiser cette protéine.

Le même problème se pose pour la protéine majeure détectée dans les "ghosts" d'*Eimeria nieschulzi*.

Nous avons progressé dans cette voie en montrant que les ultra sons transformaient la suspension de "ghosts" en une suspension de deux types de vésicules différenciées par l'épaisseur et le contraste de leurs membranes, qui pourraient ainsi provenir l'un du plasmalemma et l'autre du complexe interne. Il reste à obtenir la séparation des deux types de vésicules et à les analyser pour identifier leurs composants respectifs.

Il est clairement établi que les membranes plasmiques de la plupart des cellules contiennent de nombreuses protéines (KEPES A. 1978). Chez les sporozoaires, la composition chimique des pellicules préparées à partir de cellules entières, est moins connue. Les études sont limitées aux grégaires chez qui un nombre important de protéines a été mis en évidence dans les "ghosts" (PHILIPPE et al 1979, 1982). Les investigations dans ce domaine ont été par contre réalisées chez d'autres protozoaires parasites tels les trypanosomes chez qui les études des protéines membranaires par marquage superficiel ont décelé le faible nombre de protéines superficielles (ROVIS et al 1978 ; ARAUJO et REMINGTON 1981 ; NOGUEIRA 1981). La technique d'isolement des pellicules a par contre montré la richesse de ces fractions en protéines (DASILVEIRA et al 1979 ; ROVIS et BAEKKESKOV 1980).

Les profils électrophorétiques de certaines membranes spécialisées, présentent une ou un faible nombre de protéines majeures. Chez ces membrane, la protéine majeure joue un rôle fonctionnel prédominant. C'est le cas des membranes isolées de la rétine très riches en rhodopsine (BOWNDIS et al 1971), des gap junctions (HERTZBERG et al 1982), des récepteurs d'acétylcholine au niveau des synapses (NAKAJIMA et BRIDGMAN 1981). Dans ces cas on a souvent pu rapporter le polypeptide majeur à une classe particulière de particules intramembranaires en cryofracture : ainsi la rhodopsine dans les cellules photoréceptrices (SJÖSTRAND et KREMAN 1978)

Dans le même ordre d'idées, il semble concevable de rapprocher la protéine majeure des "ghosts" de l'élément le plus abondamment représenté dans la pellicule, c'est à dire l'unité répétitive des alignements du complexe membranaire interne. La même hypothèse peut être envisagée pour la protéine majeure d'*Eimeria*.

En plus de cette protéine majeure, une bande moins importante apparaît vers 43 kd. Cette protéine ayant une mobilité électrophorétique semblable à celle de l'actine (42 kd) pourrait en être rapprochée. PORCHET (communication personnelle) a décelé la présence d'actine chez des Toxoplasmes d'ascite. La localisation de cette protéine dans les zoïtes n'est toutefois pas connue et sa présence dans les "ghosts" reste à établir. Nos résultats ne permettent pas d'affirmer sa présence dans les pellicules de *Sarcocystis muris*.

- CHAPITRE 3

DYNAMIQUE SUPERFICIELLE, INTERACTION AVEC LIGANDS

L'étude de la mobilité latérale des composants de la membrane cellulaire a été entreprise par l'analyse de la redistribution de ligands interagissant avec la surface des zoïtes.

Des travaux antérieurs, DUBREMETZ et FERREIRA (1978) et RUSSELL et SINDEN (1981), réalisés respectivement chez *Eimeria nieschulzi* et *Eimeria tenella* et *E. acervulina* ont été poursuivis par marquage à la ferritine cationisée.

Dans le but d'étendre cette étude à d'autres sites membranaires, nous avons analysé, chez le sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi* l'action de deux ligands : une lectine, la H P A, et des anticorps ant sporozoïtes.

## I LA LECTINE

L'incubation des zoïtes dans une solution de lectine fluorescente à 4°C pendant 30 minutes conduit à un marquage uniforme de la surface. La plupart des zoïtes sont groupés en agrégats (dont le centre est plus marqué que la périphérie) (pl. IX, fig. 1). Le même résultat est obtenu si l'incubation a lieu après fixation des sporozoïtes dans le glutaraldehyde ou le formol respectivement à 2,5% et 1% dans le P.B.S.

ou si le marquage est réalisé en présence de cytochalasine B à 20 µg/ml.

Quand l'incubation est réalisée à la température du laboratoire pendant 20 minutes ou 5 minutes à 37°C, le marquage des zoïtes est limité à un point fluorescent à l'extrémité postérieure du zoïte. Dans les agrégats, le marquage est limité au centre de ces derniers. Le même phénomène se produit quand on réchauffe les sporozoïtes marqués à 4°C par une incubation de 5 minutes à 37°C (pl. IX, fig. 2).

Après une incubation prolongée (une heure environ) dans les conditions physiologiques (37°C) la plupart des zoïtes sont éteints, ayant abandonné leur marquage dans le milieu.

## II LES ANTICORPS

### 1 - OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Nous avons utilisé pour le marquage des sporozoïtes différentes dilutions de sérum de lapin immun. Les anticorps ant sporozoïtes sont marqués directement à l'isothiocyanate de fluorescéine ou révélés par des anticorps anti-immunoglobulines de lapin fluorescents.

Quelle que soit la concentration en anticorps utilisée et le mode de marquage (direct ou indirect), l'incubation des sporozoïtes dans une solution d'anticorps conduit à un marquage uniforme de la surface, suivi par une redistribution du ligand en une cape postérieure ; mais une fraction du marquage reste uniformément répartie sur le corps du zoïte.

La liaison avec les anticorps ralentit considérablement le mouvement des sporozoïtes qui abandonnent sur la lame de verre des traînées fluorescentes (pl. IX, fig. 4).

L'incubation des zoïtes dans une solution d'immunoglobulines G de lapin fluorescentes, préparées à partir du sérum ant sporozoïte, montre que ces dernières ont un effet comparable à celui des anticorps. Le sérum de lapin non immun est par contre sans effet sur la mobilité des sporozoïtes.

### 2 - CRYOFRACTURE

L'étude du sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi* par cryofracture a été déjà réalisée par DUBREMETZ et TORPIER (1978). Nous avons repris cette technique pour vérifier l'action éventuelle des anticorps sur l'architecture de la pellicule de ce parasite.

Dans les conditions de redistribution du ligand contrôlée en microscopie photonique, la cryofracture ne révèle aucun changement quant à la distribution des P.I.M.

### III DISCUSSION

Par nos expériences avec les lectines et les anticorps, nous avons mis en évidence, en plus des sites anioniques déjà décrits (DUBREMETZ et FERREIRA 1978), d'autres sites membranaires chez le sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi*.

Deux catégories de récepteurs sont à différencier dans le plan de la pellicule du zoïte : d'une part des récepteurs mobiles, comme ceux de la lectine (H P A), de la ferritine cationisée et de certains anticorps, dont la répartition peut être modifiée dans certaines conditions ; d'autre part des récepteurs incapables de réarrangement et conduisant à un marquage uniforme de la surface. Le sérum immum révèle en particulier ces deux types de récepteurs.

#### 1 - SITES REDISTRIBUES SOUS ACTION DE LIGAND

##### a - Capping avec différents ligands

Le sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi* est capable de rassembler à son extrémité postérieure, dans les conditions physiologiques, un marquage uniforme de surface réalisé avec un ligand. Ce dernier est d'abord uniformément réparti sur la surface cellulaire ; ceci est suivi d'une distribution en petits amas disposés uniformément sur toute la surface (patching) puis redistribution du marquage vers un pôle de la cellule (capping).

L'existence de sites mobiles à la surface cellulaire a été démontrée chez différents types de cellules par l'utilisation de différents ligands (anticorps, lectines et ferritine). Il a été ainsi observé chez les leucocytes polynucléaires (ALBERTINI et al 1977), les érythrocytes humains (FOWLER et BRANTON 1977), les fibroblastes normaux et transformés (NICOLSON 1976) , les cellules en cultures (BOURGUIGNON et SINGER 1977 ; MONSIGNY et OBRENOVITCH 1979).



Chez les protozoaires, des observations similaires ont été réalisées chez les amibes (KING et PRESTON 1977), les flagellés (BARRY 1979), les ciliés (WATANABE et al 1981), les grégarines (KING 1981), Les Coccidies (DZBENSKI et ZIELINSKA 1976, RUSSELL et SINDEN 1981) et les Hémospodidies (TAKAHASHI et al 1980, VANDERBERG 1974).

Le réarrangement est généralement induit par des ligands multivalents, essentiellement des lectines, des anticorps et la ferritine cationisée. Ces ligands permettent le pontage entre les récepteurs membranaires <sup>car</sup> les ligands monovalents n'induisent généralement pas le capping (DEPETRIS et RAFF 1973),

#### b - Modalités du capping.

Chez le sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi*, la redistribution du ligand se fait dans le sens antéro-postérieur de la cellule, avec formation de la cape au niveau du pôle postérieur. Une telle polarisation a également été décrite chez d'autres cellules : c'est le cas chez les sporozoaires de type *Eimeria* (RUSSELL et SINDEN 1981, DUBREMETZ et FERREIRA 1978), *Toxoplasma* (DZBENSKI et al 1976) et *Plasmodium* chez lequel la cape a été décrite comme une réaction du parasite au marquage (circumsporozoïte précipitate -C S P - réaction) (VANDERBERG 1974). Une cape localisée dans les 2/3 postérieurs de la cellule a été observée chez l'amibe *Naegleria* (KING et PRESTON 1977). Chez les lymphocytes, la cape est dans la partie renfermant le centrosome : pôle postérieur (DEPETRIS et RAFF 1973). La redistribution du ligand se poursuit jusqu'à la partie terminale du flagelle du *Chlamydomonas* (TIPPING) (GOODENOUGH et JURIVICH 1978).

Pour d'autres protozoaires, le capping se fait plutôt vers le pôle antérieur du parasite, c'est le cas de *Leishmania donovani* (DWYER 1976).

La diffusion du ligand au niveau de la surface cellulaire est remarquablement rapide. Nous avons montré que 5 minutes à 37°C étaient suffisantes

pour que tous les sporozoïtes aient redistribué le ligand. Le phénomène est en fait plus rapide ; car chez ce même parasite, la redistribution de la ferritine cationisée survient après une seconde d'incubation à 37°C (DUBREMETZ 1981). En effet RUSSELL et SINDEN (1981), analysant la dynamique superficielle chez les sporozoïtes d'*Eimeria tenella* et *Eimeria acervulina* remarquent que le marquage se déplace à la surface du parasite à la même vitesse que le déplacement de celui-ci sur le substrat ; ce qui correspond approximativement à une durée de 2 secondes pour la formation de la cape.

Chez les cellules des animaux supérieurs, les "cappings" les plus rapides sont ceux obtenus avec la Con A ; ils durent cependant plus d'une minute pour des cellules d'environ 20 µm de diamètre (KOPPEL et al 1981), ces caractéristiques sont sans commune mesure avec celles de la formation de la cape chez les zoïtes ; ceci conduit à penser à l'intervention de mécanismes différents dans les deux types de capping.

#### c - Inhibiteurs du capping

Certains facteurs tels les basses températures et la cytochalasine B inhibent la redistribution du ligand ; ils n'influencent cependant en rien sur la liaison de celui-ci avec le récepteur ni sur le "patching". Ces deux processus sont indépendants de la température et de l'effet des drogues.

La cytochalasine B est un inhibiteur des fonctions liées aux microfilaments d'actine dans les cellules non musculaires (BRAY 1979) . Elle semble dépolymériser l'actine in vitro (BRENNER et KORN 1979) et capable de supprimer les interactions entre filaments d'actine et autres composants du cytosquelette (SCHLIWA 1979). Cette drogue présente dans le milieu inhibe complètement la formation de capes, avec la lectine (H P A) et les anticorps, chez le sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi*, et également avec la ferritine cationisée chez ce même parasite (DUBREMETZ et FERREIRA 1978). Son action est réversible, car on voit son effet inhibiteur disparaître après lavage des zoïtes dans le tampon approprié. RUSSELL et SINDEN obtiennent les mêmes résultats chez *Eimeria tenella* et *E. acervulina*.

L'effet inhibiteur de la cytochalasine B et des basses températures a été également observé dans de nombreux cas. Cependant la sensibilité aux différents inhibiteurs varie selon les types cellulaires et les ligands qui leur sont associés. Chez les macrophages alvéolaires, la cytochalasine B renforce le capping de la Con A (WILLIAMS et al 1977). Alors qu'à des faibles concentrations, elle inhibe le capping de la Con A chez les lymphocytes ; utilisée à des doses élevées, elle n'inhibe que partiellement le "capping" des Ig (SCHREINER et UNANUE 1976). Toutefois ces auteurs montrent que la redistribution de la Con A n'a lieu qu'en présence de la colchicine, destabilisateur des microtubules. Alors que cette drogue est sans effet sur la redistribution des ligands chez *Eimeria* (RUSSELL et SINDEN 1981), chez les amibes la colchicine renforce l'effet inhibiteur de la cytochalasine B sur la redistribution des lectines et anticorps (AUSTKETTIS et SUNDQVIST 1978).

Ces observations suggèrent une participation du cytosquelette dans le phénomène du capping, tout en soulignant une grande variabilité dans les modalités d'induction ou d'inhibition et donc probablement dans les mécanismes (WEATHERBEE 1981).

Il n'est pas possible de lier directement l'effet de la cytochalasine B sur le "capping" par un effet sur l'actine car la cytochalasine B a également d'autres effets, en particulier sur les transports membranaires (POLLARD et WEIHING 1974 in WEATHERBEE).

#### d - Dynamique superficielle et cytosquelette

La possibilité de l'existence d'une liaison entre les récepteurs membranaires et le cytosquelette a été rapportée par de nombreux auteurs à la suite d'observations réalisées chez différentes cellules.

L'utilisation de l'immunofluorescence et des ligands et anticorps spécifiques des protéines du cytosquelette, a montré que les composants de la membrane sont redistribués en relation avec les éléments du cytosquelette.

Ainsi les observations ont été faites pour la tubuline (GABBIANI et al 1977), l'actine (SUNDOVIST et EHRNST 1967 ; TOH et HARD 1977 ; BOURGUIGNON et SINGER 1977 ; GABBIANI et al 1977 ; OLIVER et al 1977) et la myosine (BOURGUIGNON et SINGER 1977 ; BRAUN et al 1978). L'étude ultrastructurale a confirmé les premières observations de la microscopie optique.

C'est en étudiant le "capping" de la Con A chez *Dictyostelium* que CONDEELIS (1979) a montré l'association de filaments épais et d'autres fins au niveau de la cape. Le rôle direct des microfilaments dans la dynamique superficielle est également mis en évidence par l'action de la cytochalasine B. L'action activatrice de la Colchicine sur ce mécanisme exclut le rôle direct des microtubules (ALBERTINI et CLARK 1975) ; toutefois certains auteurs leur attribuent un rôle indirect impliquant une action sur l'organisation des microfilaments (WEATHERBEE 1981).

#### e - Mécanismes possibles

Dans le cas général, deux types de modèles sont proposés pour expliquer le "capping" : le modèle de EDELMAN<sup>et al</sup> (1973) supposant l'ancrage des récepteurs sur des molécules du cytosquelette, ce dernier étant responsable du réarrangement ; l'autre modèle proposé par BRETHER (1976) et affiné par HEWITT (1979) puis OLIVER et BERLIN (1982) supposant un flux continu dans la membrane qui entraîne les molécules superficielles dans certaines conditions, le rôle du cytosquelette étant atténué dans le phénomène. Aucun de ces modèles n'a encore apporté d'explication satisfaisante pour le "capping" ligand induit.

Dans le cas des sporozoïtes, nous ne pouvons concevoir d'interaction directe qu'avec le complexe membranaire interne, sous-jacent au plasmaleme. La microscopie électronique ne met en évidence aucun type de filaments liés à la pellicule et par conséquent aucune accumulation dans la zone du "capping". D'autre part, un flux membranaire orienté est difficile à visualiser.

Nous ne pouvons, à la lumière de nos résultats, exclure l'une ou l'autre de ces hypothèses en précisant que si une interaction avec les molécules sous-jacentes intervient, le phénomène diffère sensiblement de celui des autres cellules (Lymphocytes, fibroblastes, macrophages).

## 2 - SITES NON REDISTRIBUES

Le marquage des sporozoïtes d'*Eimeria* avec les anticorps conduit à la redistribution d'une partie du marquage, alors qu'une fraction reste uniformément répartie sur le corps du zoïte. Quatre possibilités peuvent être prises en considération afin d'expliquer la non redistribution de ces sites :

- Il s'agit de récepteurs non doués de mouvement latéral donc immobiles.
- Ces récepteurs sont mobiles mais non redistribuables, et diffusent librement au niveau de la membrane.

Dans ce cas, l'étude du phénomène par extinction de fluorescence et analyse de la diffusion latérale, (Photobleaching, SCHLESINGER et al 1976) pourrait confirmer ou infirmer cette hypothèse.

- Il s'agit de récepteurs mobiles mais immobilisés par l'interaction avec le ligand.
- Enfin l'immobilité de ces sites pourrait être due à la saturation des capacités de la cellule à redistribuer un ligand, si celui-ci est trop abondant.

## 3 - P.I.M. ET RECEPTEURS MEMBRANAIRES

L'interaction de la surface des zoïtes d'*Eimeria* avec les anticorps n'altère pas l'organisation intramembranaire telle qu'elle est visualisée par la cryofracture.

Ces résultats sont en accord avec ceux de DUBREMETZ (1980) sur l'action de la ferritine cationisée chez ce même parasite. YAHARA<sup>et al</sup> (1980) ont rapporté les mêmes résultats en étudiant l'interaction des ligands sur les lymphocytes. Cependant AIKAWA et al (1979) annoncent une désorganisation des P.I.M. au niveau de la face P du plasmalemme, chez trois espèces de *Plasmodium* sous l'effet d'anticorps. Mais dans les cas cités, le complément a modifié profondément les membranes, et la désorganisation des P.I.M. pourrait en être la conséquence.

Ainsi, les récepteurs redistribués avec les ligands ne sont pas identifiables aux P.I.M visualisées en cryofracture.

#### 4 - ELIMINATION DU LIGAND

Dans les conditions physiologiques, les sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi*, arrivent à abandonner dans le milieu leur marquage superficiel (shedding) redistribué en une cape postérieure.

Cette propriété semble être générale quelque soit le ligand, lectine ou anticorps à quelques variantes près.

Avec la lectine, le marquage est libéré sous forme de cape ; alors que celui des anticorps est libéré sous forme de traînées qui restent plus ou moins attachées à la partie postérieure du zoïte. La "Circumsporozoïte réaction" décrite chez *Plasmodium* (VANDERBERG 1974) est une illustration de cette forme de "shedding".

Cette réaction de libération du ligand a été décrite chez différentes cellules sous des formes variées : des capes, comme chez *Naegleria grubei* (KING et PRESTON 1977) ; ou des vésicules membranaires chez des cellules en culture, qui sont libérées à la suite d'interaction avec ligand (DOETSHMAN 1980) ou naturellement dans la culture cellulaire (PETERSON et RUBIN 1969).

Il apparaît donc que le "shedding" est un moyen pour le parasite de se débarrasser du ligand, BOURGUIGNON et BOURGUIGNON (1981) et DOETSHMAN (1980) ont montré que les protéines membranaires sont concentrées au niveau de la cape chez les lymphocytes. Deux éventualités peuvent donc être envisagées : les récepteurs membranaires sont libérés avec le ligand ; ou seul le ligand est éliminé dans le milieu par la rupture de la liaison-récepteur.

Nous ne pouvons conclure quant à l'une ou l'autre de ces deux hypothèses ; seule une analyse du matériel libéré pourrait apporter une réponse à cette question.

CHAPITRE 4

MOBILITE DES ZOITES

L'étude de la mobilité des zoïtes a été poursuivie par deux approches différentes . Nous avons, d'une part, analysé et quantifié les mouvements des parasites placés dans des conditions physiologiques. D'autre part, nous avons étudié l'action de la trypsine, de certaines drogues et d'inhibiteurs d'enzymes sur l'activité des zoïtes.

## 1 - ANALYSE DES MOUVEMENTS

### a - Déplacement sur un substrat solide

L'analyse de l'activité des zoïtes sur une lame de verre a montré que ces derniers sont capables de différents types de mouvements qui n'assurent pas tous le déplacement du parasite.



#### - Le glissement

Seul ce mode d'activité conduit à la translation du zoïte. Il est pratiqué de manière unidirectionnelle ; la partie antérieure de la cellule, plus effilée, est toujours orientée vers l'avant.

Deux types de glissement ont été observés chez les zoïtes : le glissement rectiligne et le glissement hélicoïdal.

#### + le glissement rectiligne :

Ce mouvement est le plus fréquent chez les zoïtes observés. Il a été particulièrement étudié chez le sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi*. Lors du déplacement, la cellule maintient son contact avec le substrat, auquel elle semble adhérer par une génératrice du corps entier, dont la forme courbée est conservée. La trajectoire décrite est dans le prolongement de la courbure, ainsi les enregistrements montrent des trajectoires encercles ou en courbes.



Le glissement est entrecoupé par des phases de repos de durée variable. Une séquence de déplacement dure 10 à 40 secondes environ, durant lesquelles la vitesse du mouvement peut varier. Des changements dans la direction peuvent également avoir lieu au cours de l'activité : le zoïte redresse sa partie antérieure, seule l'extrémité postérieure restant adhérente au substrat, puis retombe ; et le déplacement se poursuit dans une autre direction. Le changement de direction peut être également réalisé par changement de courbure du corps.

+ Le glissement hélicoïdal :

Durant ce mouvement, la partie antérieure du corps ne semble pas toucher le substrat ; seuls les 2/3 postérieurs entrent successivement en contact avec celui-ci, selon une génératrice hélicoïdale. Le zoïte se déplace à la manière d'une hélice. Une séquence de déplacement se termine parfois par un brusque redressement du corps, la partie postérieure restant attachée au substrat.

Ce mouvement a été moins observé chez *Sarcocystis muris* et *Eimeria nieschulzi*. Il est par contre bien mis en évidence chez le bradyzoïte de *Sarcocystis tenella*.

- La rotation du corps

De temps à autre, le zoïte se redresse en position verticale ; l'extrémité postérieure adhérent au substrat, il pivote, la partie antérieure décrivant des cercles. Le corps peut être tendu ou se courber sur lui-même. Ce mouvement est répété plusieurs fois, jusqu'à 10 tours par minute. Cette position se termine souvent par le glissement.

- La flexion

Durant les phases de repos, le zoïte peut exercer un autre type

de mouvement sans déplacement du corps. Il ramène progressivement la partie postérieure du corps vers l'avant, puis se détend pour reprendre sa position initiale.

Tous les mouvements cités ci-dessus mettent en jeu l'interaction du zoïte avec un substrat solide ; nous avons essayé d'analyser son comportement quand le substrat est fluide.

b - Déplacement sur un substrat fluide

- goutte pendante

Les zoïtes observés en goutte pendante, entre lame à concavité et lamelle, se rassemblent par gravité au bas de la goutte à l'interface air-liquide.

L'analyse des mouvements des parasites, dans de telles conditions, montre qu'ils sont capables de glissement ; les vitesses paraissent fortement ralenties. Mais nous n'avons vu aucun zoïte en rotation sur l'extrémité postérieure.

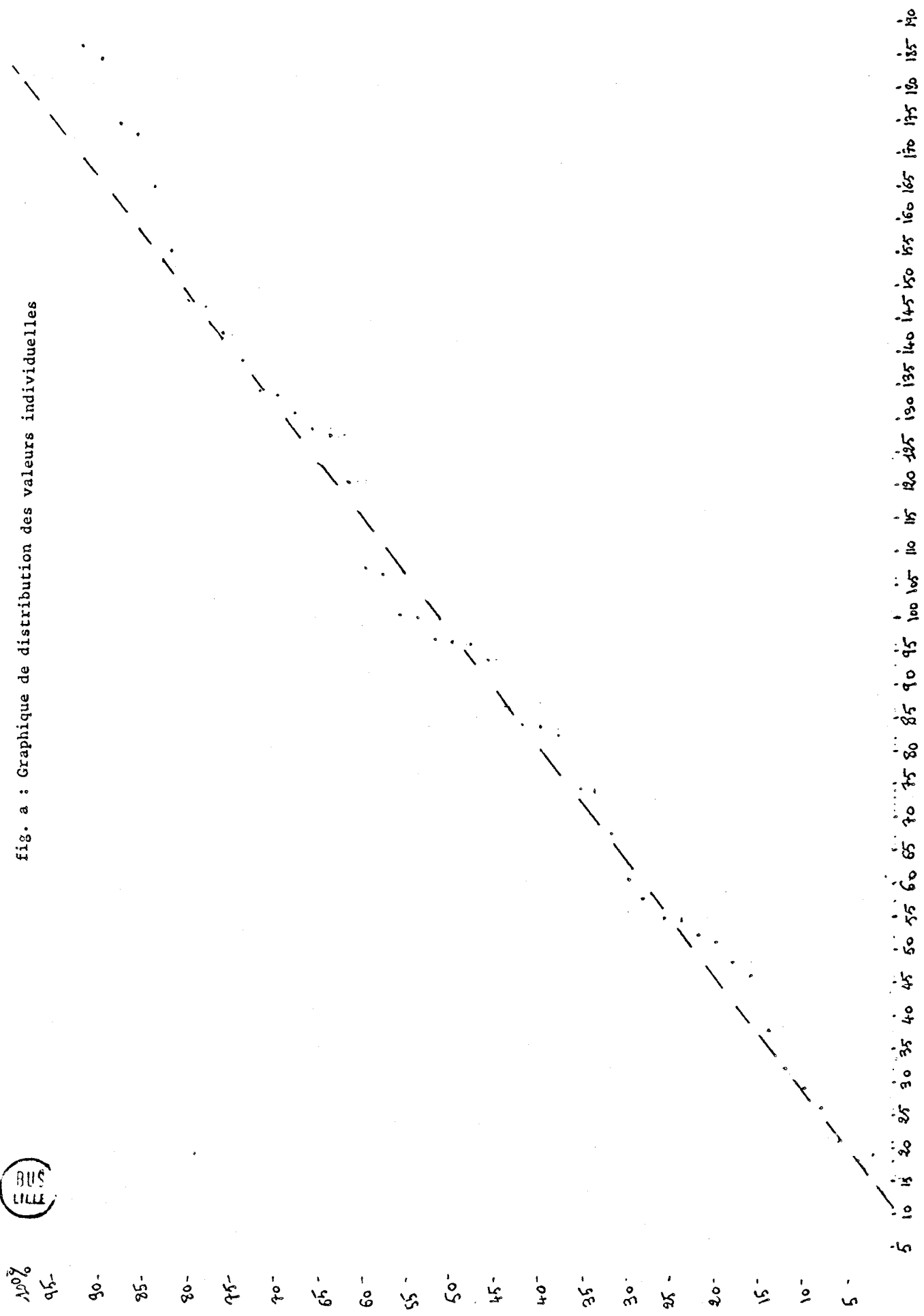
- huile fluorinert

Une goutte d'huile fluorocarbonée (Fluorinert, Fc, 48, ISCO) de densité 1.93 mg/ml, tapisse le fond du trou d'une boîte (NUNC). Cette goutte est recouverte par 50 µl d'une suspension de sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi*.

Les sporozoïtes sédimentent au niveau de l'interface huile-tampon. L'observation au microscope à 37°C montre que les déplacements des zoïtes sont identiques à ceux observés sur la lame de verre.



fig. a : Graphique de distribution des valeurs individuelles



## 2 - QUANTIFICATION DES DEPLACEMENTS

Nous avons réalisé deux séries d'enregistrements : un premier  $E_1$ , après une minute d'introduction de la lame dans l'enceinte du microscope (temps de stabilisation de la température) ; le deuxième enregistrement  $E_2$  est effectué 10 minutes après l'introduction de la lame.

Une séquence d'enregistrement dure 1 à 2 minutes.

Pour chaque enregistrement  $E_1$  et  $E_2$ , nous avons mesuré les distances parcourues par une cinquantaine de sporozoïtes pendant 30 secondes. Les sporozoïtes sont pris au hasard, dans les fractions de suspension.

### a - Calcul des moyennes

Les moyennes des déplacements des zoïtes sont calculées pour  $E_1$  et  $E_2$ . (Les zoïtes immobiles ne sont pas pris en considération).

$$m E_1 = 32,23 \mu\text{m}/30\text{s} \pm 4,92 \mu\text{m}/30\text{s}.$$

$$m E_2 = 13,85 \mu\text{m}/30\text{s} \pm 3,27 \mu\text{m}/30\text{s}$$

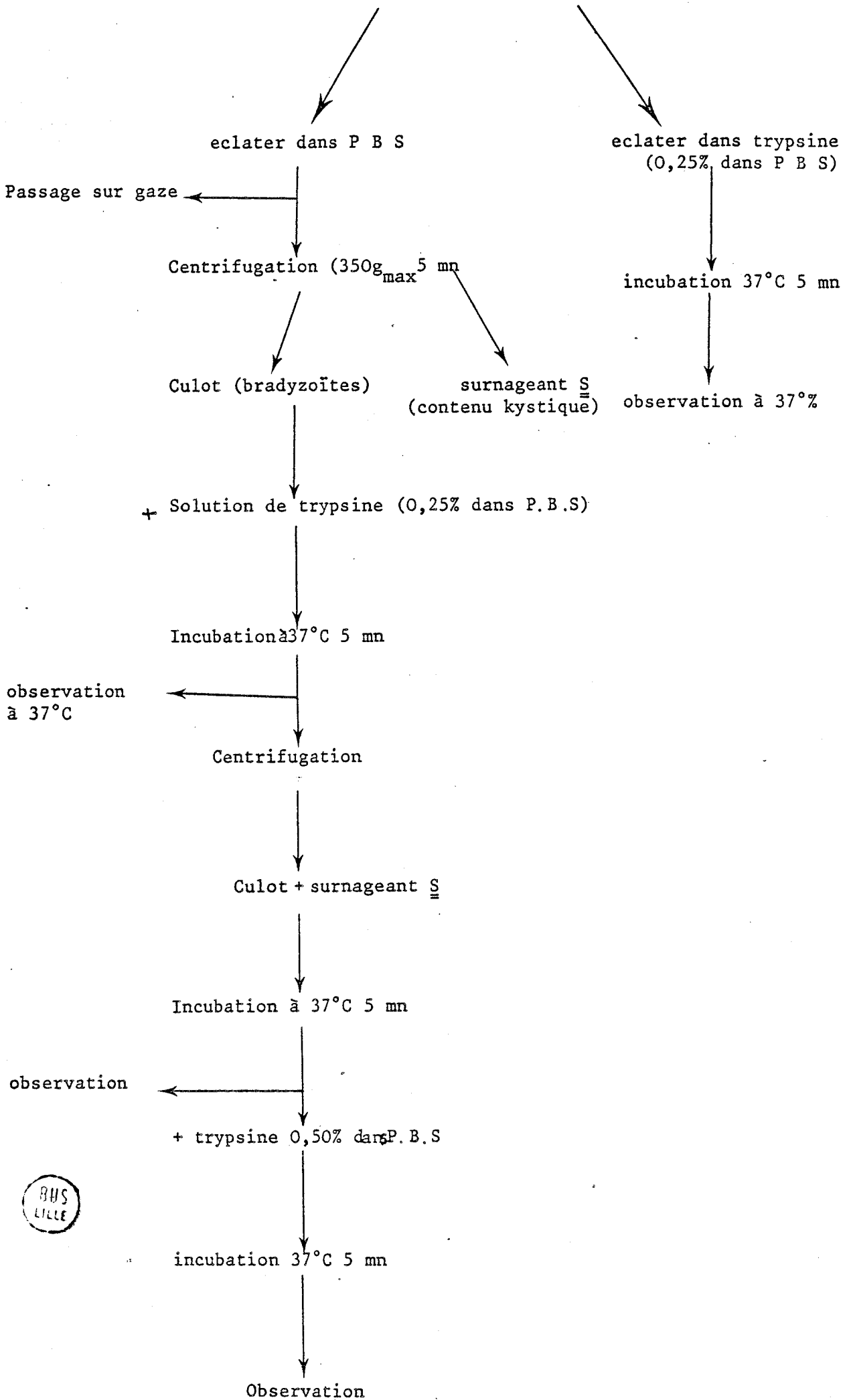
La vitesse du mouvement est estimée à 15  $\mu\text{m}/\text{s}$ .

Afin de pouvoir conclure quant à la différence des déplacements en fonction du temps d'incubation, nous avons fait appel à des méthodes statistiques.

### b - Comparaison des moyennes (test t)

Le graphique de la distribution des valeurs individuelles est préalablement établi. Ce graphique montre (fig. a) qu'il s'agit d'une distribution rectangulaire ; dans de telles conditions, les moyennes des échantillons tendent vers une distribution normale (KENDALL et STUART 1963). Ceci nous permet d'appliquer le test de comparaison des moyennes de STUDENT.

KYSTE DE BRADYZOÏTES (*Sarcocystis tenella*)



D'après ce test la différence entre les deux moyennes ( $mE_1$  et  $mE_2$ ) est de 6,22, elle est significative à 1°/oo (il y aurait moins d'une chance sur mille pour que cette différence soit due au hasard) ; le seuil de signification à 1°/oo étant 3,3. Ce test nous conduit à conclure que le temps d'incubation à 37°C, auquel sont soumis les zoïtes est le seul facteur responsable de cette variation.

### 3 - ACTIVATION PAR LA TRYPSINE

Certains zoïtes de coccidies sont spontanément actifs dès qu'ils sont placés à la température physiologique de leur hôte. C'est le cas par exemple du sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi*.

Dans le cas de *Sarcocystis tenella*, l'activité des bradyzoïtes n'intervient qu'après leur incubation dans une solution de trypsine. Cependant, des bradyzoïtes isolés, lavés dans le tampon puis trypsinés ne montrent qu'une faible activité.

Aussi nous avons réalisé différents essais d'activation, schématisés sur la feuille ci-jointe et avons obtenu les résultats suivants : Les zoïtes issus de kystes éclatés directement dans la solution d'enzyme sont mobiles. Ceux qui sont lavés par centrifugation dans le P B S puis trypsinés ne montrent qu'une faible activité ; ils deviennent par contre plus mobiles quand on ajoute à la solution de trypsine le contenu kystique.

Il apparaît donc, après ces différentes observations, que le contenu kystique, dont la composition n'a pas encore été déterminé, est indispensable à l'activation des zoïtes en plus de la trypsine.

L'activation des parasites est maintenue après lavage de la solution et leur reprise dans le P.B.S.

#### 4- ACTION DES INHIBITEURS

##### a - Inhibiteurs d'enzymes

Comme nous l'avons signalé plus haut, le sporozoïte d'*Eimeria nieschulzi* et le bradyzoïte de *Sarcocystis muris* sont spontanément actifs dans les conditions physiologiques. Toutefois, la méthode de purification de *Sarcocystis muris* laissait supposer une éventuelle action de la trypsine, utilisée lors des broyages des tissus de l'hôte. Afin de lever cette ambiguïté, nous avons réalisé des incubations de bradyzoïtes de *Sarcocystis muris* issus de kystes directement éclatés dans les solutions d'inhibiteurs de protéases. Ainsi des inhibiteurs spécifiques : T L C K et T P C K, et d'autres à spectre plus large : zymophren et P M S F, ont été utilisés.

Après une incubation de 15 minutes à 37°C, des observations réalisées à la même température montrent une activité normale des zoïtes.

##### b - Cytochalasine $\beta$

L'incubation des sporozoïtes d'*Eimeria nieschulzi* dans une solution de cytochalasine  $\beta$  à 20  $\mu\text{g/ml}$  en P B S, entraîne l'immobilisation des zoïtes à 37°C.

Les mouvements de glissement et de rotation sont complètement inhibés mais la flexion du corps est maintenue malgré l'effet de la drogue.

L'élimination de la cytochalasine  $\beta$  du milieu d'incubation par lavage, permet aux zoïtes de reprendre leur activité normale.

CHAPITRE 5

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION



En dépit de son importante fonction biologique, la mobilité cellulaire a été très peu étudiée chez les Coccidies. Les résultats rapportés se limitent à l'énumération et à une description sommaire des différents mouvements des zoïtes.

GUIMARAES et MEYER (1942, in DORAN 1973) ont été les premiers à montrer l'existence de stades extracellulaires mobiles chez *Toxoplasma*. Les mouvements décrits sont des oscillations, des ondulations et des torsions. Chez *Eimeria*, les différents types de mouvements ont été identifiés successivement. Les premiers annoncés sont le glissement et la flexion (FAYER et HAMMOND 1967), puis la rotation (SPEER et al 1971) et le glissement hélicoïdal (ROBERT et al 1971). La rotation a été décrite sur l'extrémité postérieure (DORAN et VETTERLING, 1967a) ou antérieure du zoïte (SAMPSON et al 1971). Les mêmes types de mouvements : glissement, flexion et rotation ont été observés chez *Sarcocystis* (FAYER 1970).

Seuls VANDERBERG (1974) chez *Plasmodium* et surtout RUSSELL et SINDEN (1981) chez *Eimeria acervulina* et *E. tenella* ont décrit et analysé la motilité chez ces parasites.

Aussi nos résultats seront-ils essentiellement comparés à ceux obtenus par ces derniers auteurs. Nous verrons qu'un rapport étroit semble exister entre dynamique superficielle et certains aspects de la motilité Coccidienne. Puis nous élargirons notre analyse <sup>aux</sup> mouvements cellulaires en général afin d'essayer de comprendre si ces Sporozoaires ont développé un mécanisme unique ou si celui-ci peut-être rattaché à un processus généralement répandu.

## 1 - MOBILITE CELLULAIRE CHEZ LES COCCIDIES

### a - Les différents types de mouvement

RUSSELL et SINDEN (1981) ont décrit 3 types de mouvements chez les sporozoïtes d'*Eimeria acervulina* et *E. tenella* : glissement hélicoïdal, flexion et rotation. VANDERBERG (1974) parle d'un autre type de mouvement : glissement linéaire dans le prolongement du corps chez le sporozoïte de *Plasmodium*. Nous avons observé ces 4 types de mouvements chez les zoïtes de *Sarcocystis muris*, *S. tenella* et *Eimeria nieschulzi*.

Toutefois, la fréquence d'obtention des glissements : hélicoïdal et linéaire varie d'un zoïte à l'autre ; le glissement hélicoïdal est plus fréquent chez *Sarcocystis tenella* alors que *Eimeria nieschulzi* utilise plutôt le glissement linéaire.

Parmi tous les mouvements rencontrés chez ces parasites, seuls les glissements (hélicoïdal et linéaire) conduisent à la translation du corps. Ce sont donc ceux qui ont retenu plus particulièrement notre attention.

#### b - Caractéristiques des mouvements

##### ↳ - Le substrat

Comme RUSSELL et SINDEN, nous avons constaté que les mouvements des zoïtes nécessitent l'interaction de ces derniers avec un substrat, sauf peut-être en ce qui concerne la flexion. Mais alors que ces auteurs ne s'étaient placés que dans le cas d'un substrat solide, nous avons étendu les observations et montré que tous les types d'interface étaient utilisables à des degrés divers par les zoïtes. Nous n'avons pas noté de différence sensible entre l'interface liquide - solide et liquide - liquide. Des observations similaires ont été rapportées par KING (1981) sur le glissement des Grégarines. Par contre, la rotation sur l'extrémité postérieure n'a pas été observée sur l'interface air-liquide, ce qui suggère une différence entre ce type de mouvement et les glissements alors que l'on interprétait jusque là la rotation comme un dérivé du glissement hélicoïdal (RUSSELL et SINDEN 1981).

L'observation de glissement sur des surfaces fluides suggère la possibilité d'un rôle de la tension superficielle dans ce mouvement.

### $\beta$ - Modalités du glissement

La différence essentielle entre les glissements hélicoïdal et linéaire semble résider dans la forme du zoïte et a pour conséquence une différence dans la zone de contact entre la cellule et le substrat. Dans le glissement hélicoïdal décrit par RUSSELL et SINDEN, le zoïte a une forme torsadée et le contact avec le support n'intéresse qu'une zone très limitée qui se déplace le long d'une génératrice hélicoïdale du zoïte. Dans le glissement linéaire, que nous avons observé en plus et qui correspond à celui décrit pour *Plasmodium*, le contact semble intéresser toute la longueur du zoïte selon une génératrice linéaire. Comme le corps cellulaire est courbe, la génératrice l'est également et le zoïte décrit des cercles. Mais là aussi, le contact peut être limité également à une zone restreinte qui parcourt la génératrice linéaire. Ainsi, le même mécanisme pourrait intervenir dans les deux cas, car il suffirait que le zoïte soit capable de passer d'une configuration torsadée à une configuration linéaire pour pouvoir présenter les deux types de glissement. Nous verrons plus loin que la morphologie des zoïtes favorise une telle interprétation.

### $\alpha$ - Vitesse de déplacement

Notre estimation de la vitesse de glissement, qui mesure la vitesse effective des cellules lors des phases d'activité, est du même ordre de grandeur que celle évaluée par RUSSELL et SINDEN (1981) pour *Eimeria acervulina* et *E. tenella* (2 à 8  $\mu\text{m/s}$ ) ou celle des Grégarines (4 à 8  $\mu\text{m/s}$ ) (KING 1981).

Les valeurs concernant le trajet parcouru par unité de temps, qui intègrent les phases de déplacement et d'arrêt et mesurent l'activité globale des zoïtes, sont supérieures à celles obtenues par RUSSELL et SINDEN (27  $\mu\text{m/ mn}$  contre 13  $\mu\text{m/ mn}$ ). Mais ces auteurs ne précisent pas si leurs résultats concernent l'ensemble des zoïtes ou seulement ceux qui sont mobiles, alors que nous n'avons, pour permettre l'analyse statistique, tenu compte que des zoïtes actifs.

Nous avons constaté une baisse de l'activité des zoïtes quand croît le temps d'incubation à 37°C, également mise en évidence chez *Eimeria acervulina* et *E. tenella* et attribuée à l'épuisement progressif des réserves énergétiques des zoïtes.

### S - Inhibiteurs de la motilité

Nous avons confirmé l'action inhibitrice réversible de la cytochalasine B sur la motilité mise en évidence par JENSEN et EDGAR (1976) puis RUSSELL et SINDEN (1981).

La flexion est insensible à la cytochalasine B ; ceci permet de la distinguer des autres types de mouvements des zoïtes et suggère une différence dans les mécanismes régissant d'une part rotation et glissement et d'autre part flexion.

Nous avons montré que les anticorps pouvaient également inhiber le glissement des sporozoïtes d'*Eimeria*, comme l'avait déjà signalé VANDERBERG (1974) chez le sporozoïte de *Plasmodium*.

Les deux types d'inhibiteurs semblent être distingués par leurs sites d'action : la cytochalasine B devrait intervenir sur le mécanisme générateur du glissement alors que les anticorps devraient intéresser son expression superficielle.

### 2 - RELATION ENTRE "CAPPING", GLISSEMENT ET INVASION DE LA CELLULE HÔTE.

DUBREMETZ et FERREIRA (1978), utilisant la ferritine cationisée, ont montré que seuls les zoïtes mobiles étaient capables de "capping". RUSSELL et SINDEN (1981) ont montré, avec le même ligand, que "capping" et glissement étaient simultanés et se déroulaient à la même vitesse, le

bord de la cape en formation restant immobile par rapport au substrat. Nous avons montré que la redistribution des ligands n'a pas lieu dans les conditions d'immobilité des zoïtes : basse température et cytochalasine B. Enfin l'inhibition de la motilité des zoïtes par les anticorps coïncide avec la non redistribution d'une partie du ligand.

Ces points communs partagés par ces deux activités suggèrent une parenté entre-elles; RUSSELL et SINDEN sont allés jusqu'à assimiler le glissement au "capping" de ligands liés à une surface.

L'invasion de la cellule hôte peut être également rapprochée de ces deux phénomènes. L'existence d'une jonction annulaire mobile entre la cellule hôte et la membrane du parasite lors de l'invasion (AIKAWA et al 1978) semble également pouvoir être rapportée à un phénomène de capping ,  
et SINDEN  
l'interaction intervenant alors entre les membranes (RUSSELL 1982).

La communauté du mécanisme à l'origine de ces diverses activités peut difficilement être mise en doute. Toutes ces activités mettent en jeu un mécanisme capable de mouvoir d'avant en arrière des sites superficiels de la pellicule interagissant avec des éléments du milieu environnant.

Ce qui peut distinguer les différentes activités réside dans l'interaction zoïte - milieu. Dans le capping, toute la surface est mise en jeu simultanément ; alors que dans le glissement, c'est une zone restreinte et au plus une génératrice longitudinale qui intervient. Dans l'invasion, l'interaction semble restreinte à un anneau (AIKAWA 1978 ; MICHEL et al 1980 ; PORCHET 1982) bien que certains l'étendent à l'ensemble de la surface (RUSSELL sous presse 1982).

Des cas d'interaction ponctuelle ont été observés : DUBREMETZ (1981) décrit l'interaction du sporozoïte d'*Eimeria* avec une hématie sous la forme d'un point de contact qui se déplace le long du corps. Des observations comparables ont été réalisées sur le trophozoïte de Grégarine interagissant avec des billes de Sepharose - concanavaline A.

Une question se pose alors : c'est de savoir si le zoïte est capable de ne mouvoir qu'une partie de sa surface ou si le déplacement de l'élément figuré, de la jonction annulaire ou de l'interaction avec le substrat n'est que la traduction d'une activité intéressant simultanément toute la surface.

Comme le capping et le glissement sont deux mouvements simultanés, il faut se demander si le capping des ligands n'est qu'une conséquence du glissement qui serait assuré par une onde parcourant le zoïte d'avant en arrière. Cependant, il est difficile de concevoir que tous les sites superficiels soient rassemblés à l'extrémité postérieure chaque fois que le zoïte progresse d'une longueur cellulaire. Bien que les mouvements soient intermittents, il arrive que le zoïte parcoure plusieurs longueurs cellulaires en continu.

Ainsi, nous pouvons concevoir que lors des glissement, "capping" et invasion le zoïte ne déplace que les sites membranaires perturbés par l'interaction avec le milieu, et que ces activités superficielles puissent émaner d'un mécanisme interne commun qui déplacerait en surface des sites de natures diverses.

### 3 - LE GLISSEMENT CHEZ LES AUTRES ORGANISMES

Parmi les êtres unicellulaires et les cellules isolées des pluricellulaires, deux catégories de mouvements peuvent être distingués : mouvement de type bactérien sans déformation cellulaire durant le glissement, et mouvement de type amoéboïde avec déformation cellulaire.

Le mouvement amoéboïde, caractéristique des Rhizopodes, et duquel se rapproche le mouvement des fibroblastes, repose sur une adhérence des cellules sur un substrat rigide. La cellule émet des expansions (filiformes dans le cas du fibroblaste, ABERCROMBIE et al 1971, pseudopodes chez les amibes, PRESTON et KING 1978) qui entrent en contact avec le support, abandonnant sur celui-ci des résidus correspondant aux zones de contact (PRESTON et KING 1978). Ce type de mouvement semble avoir peu de rapports avec la motilité des zoïtes qui glissent sans contraction ni déformation du corps cellulaire.

Le glissement de type bactérien est caractéristique des procaryotes et concerne certaines bactéries, certains mycoplasmes, et les cyanophycées (HALFEN 1979, TO et MARGULIS 1978, BURCHARD 1981). Il semble exister également chez les diatomées et les desmidiales.

Il s'agit d'une translocation de la cellule sans déformation le long de surfaces rigides, mais également d'interfaces air-fluide. Ce mouvement est intermittent, se terminant parfois par la rotation sur l'extrémité postérieure (BURCHARD 1981). Ces descriptions ressemblent étonnamment à celles du glissement Coccidien. Cependant, cela ne suffit pas à identifier les mécanismes impliqués.

Chez les bactéries, le mécanisme de glissement n'est pas identifié ; quatre hypothèses ont été proposées : forces osmotiques, forces de tension superficielle, sécrétion de mucus, vagues de contraction. Une autre caractéristique du mouvement bactérien, est la sécrétion de mucus ; rien de tel n'a été décrit chez les Coccidies, tandis que cela a été autrefois considéré comme générateur du mouvement des Grégarines (SCHEWIAKOFF 1894 in VIVIER 1968).

Le glissement de Chlamydomonas par l'intermédiaire de son flagelle (BLOODGOOD 1977, 1979) et les observations sur l'interaction du flagelle avec des microbilles, rappellent étroitement les observations réalisées sur les Coccidies. Cependant, le fait que le glissement des microbilles puisse s'opérer dans les deux directions et son insensibilité à la cytochalasine B limitent la portée de la comparaison entre les deux phénomènes.

Nous en concluons que si des rapprochements sont à faire avec d'autres êtres vivants pour essayer de résoudre le problème du glissement Coccidien, <sup>les</sup> Procaryotes glisseurs semblent être les organismes avec lesquels les zoïtes présentent le plus d'affinités.

#### 4 - ESSAI D'INTERPRETATION

Une voie possible vers l'élucidation du mécanisme de motilité

Coccidienne est d'essayer de rapporter les mouvements réalisés à des structures existant chez le zoïte. Ceci nous a conduit à explorer simultanément l'observation de la dynamique et l'analyse ultrastructurale.

Nos résultats ainsi que ceux des autres ayant abordés le problème conduisent à se poser les questions suivantes.

- Peut-on concevoir un mécanisme commun pour les différents types de mouvements.

- Quelle est la nature de l'interaction zoïte - substrat lors du glissement.

- Peut-on rapporter le mécanisme du glissement à un système moléculaire déjà décrit (Actine - myosine ; Dyneine - tubuline)?

#### a - Mécanisme des mouvements

Une donnée structurale caractéristique des zoïtes pourrait être impliquée dans l'orientation des mouvements et permet également d'unifier le mécanisme de glissement hélicoïdal, linéaire et de rotation, il s'agit du complexe membranaire interne. En effet ses plaques longitudinales peuvent présenter une configuration variable : en arrangement linéaire ou en torsade (PORCHET et TORPIER 1977 ; DUBREMETZ et TORPIER 1978 ; nos observations).

Ce système peut être également impliqué dans la rotation sur l'extrémité postérieure étant donnée la configuration qu'il présente à ce niveau. Une telle interprétation semble être la plus acceptable en regard de nos connaissances de la structure du zoïte.

Le mécanisme de la torsion et de la flexion pourrait résulter d'une interaction entre le complexe interne et les microtubules sous pelli- culaires. Les alignements de particules trouvés dans les plaques en face des microtubules (PORCHET et TORPIER 1977 ; DUBREMETZ et TORPIER 1978 ; et nos observations) témoignent de l'existence d'un lien structural entre les deux formations. Lors de ces activités, il suffirait donc d'un glissement relatif des membranes par rapport aux microtubules pour assurer le mouvement.



Ce type d'interaction pourrait être rapproché du système proposé pour la torsion ou la courbure des cils et flagelles (SATIR 1968).

Les alignements des particules du complexe interne joueraient le rôle de guide lors du glissement. Ceux ci se prolongent en effet jusqu'à l'extrémité postérieure, alors que les microtubules sous pelliculaires n'arrivent pas jusqu'à cette extrémité (RUSSELL et SINDEN 1982). Il resterait alors à définir comment cette information est transmise à la surface du zoïte.

#### b - Nature de l'interaction superficielle lors du glissement

La nature de l'interaction entre la surface du zoïte et le substrat est difficile à concevoir, surtout quand ce dernier est une interface fluide - fluide. Nous avons essayé d'identifier les protéines superficielles dans le but d'analyser ultérieurement leur implication éventuelle dans l'interaction avec le support. Nous pouvons concevoir que les polypeptides majeurs mis en évidence chez les divers zoïtes (17 kd *Sarcocystis tenella* ; 14 et 28 kd *Sarcocystis muris* ; 17 kd *Eimeria nieschulzi* ; 44,31 et 22 kd *Toxoplasma gondii*) participent à ce phénomène. Une telle hypothèse pourrait être vérifiée par l'utilisation d'anticorps spécifiques de ces protéines. Par ailleurs, il n'est pas exclu que les petits alignements observés sur la face Pe correspondent à des sites d'interaction avec le support, mais ceci n'est jusque là pas vérifié. L'intervention de polypeptides mineurs, ou de propriétés locales de la bicouche lipidique ne peut être écartée.

Les forces d'adhésion entre le zoïte et le substrat restent à définir. Dans le cas des interfaces fluide - fluide, la tension superficielle doit être considérée comme suffisamment importante pour stabiliser la surface, mais ceci reste à vérifier.

#### c - Effecteurs des mouvements

Il reste à comprendre comment l'interaction superficielle peut être

guidée par une structure sous jacente. La sensibilité des glissements à la cytochalasine B et aux fortes concentrations en ion Magnésium conduisent RUSSELL et SINDEN 1981 à suggérer l'existence d'un système de microfilaments; ces microfilaments seraient constitués d'actine. Cette hypothèse n'est toutefois pas démontrée définitivement, faute d'avoir pu observer de tels microfilaments en ultrastructure. L'identification de l'actine dans les pellicules des zoïtes n'est pas encore réalisée, bien que son existence chez les zoïtes de certaines Coccidies (*Toxoplasma*, PORCHET, communication personnelle) ne puisse être mise en doute .

La mise au point du protocole de purification des "ghosts" permet à présent d'aborder l'étude de la présence ou non d'actine dans les pellicules.

En l'absence d'un rôle de l'actine dans le glissement, il serait possible d'envisager que le phénomène repose sur un mécanisme original, distinct de celui qui régit les systèmes contractiles (actine - myosine ; dyneine - tubuline). L'absence de l'actine a été déjà soulignée chez les Grégarines (MACKENZIE 1980).

Par ailleurs, nous n'avons fait qu'évoquer un dernier aspect qui devrait éclairer également l'analyse du glissement : c'est le déclenchement de la motilité chez *Sarcocystis tenella*. Nous avons montré, que ce phénomène était plus qu'une simple activation trypsique ; il nous reste à le définir mieux car la mise en évidence de la modification responsable du déclenchement du mouvement devrait renseigner sur le mécanisme lui même.

## CONCLUSION

La présente étude nous a permis de contribuer à une meilleure connaissance d'une part de la structure de la pellicule des zoïtes de Coccidies et d'autre part du mécanisme possible de leur motilité.

Ainsi par l'analyse de l'organisation de la pellicule de *Sarcocystis muris* en cryofracture, nous avons élargi l'éventail de comparaison avec les autres Coccidies déjà étudiées.

La radioiodination a permis de mettre en évidence les protéines superficielles des zoïtes susceptibles d'interagir avec la cellule hôte durant l'invasion cellulaire, ou avec le substrat lors des déplacements, et par conséquent pouvant être impliquées dans les mouvements. L'isolement de la pellicule des zoïtes nous a conduit à déterminer la composition protéique de la pellicule et de comparer en cryofracture l'organisation des pellicules isolées avec celle des membranes in situ et de mettre ainsi en évidence la participation des structures sous pelliculaires dans l'organisation et l'architecture membranaires.

Enfin, l'analyse des mouvements des zoïtes sur des interfaces variées et dans différentes conditions nous a conduit à discuter le mécanisme possible de ces activités. Par l'utilisation de ligands : lectine et anticorps, nous avons mis en évidence l'existence d'autres sites membranaires mobiles à la surface des zoïtes en plus de ceux de la ferritine cationisée.

Certes, ces résultats sont loin de résoudre tous les problèmes posés. Ils ouvrent cependant plusieurs voies d'investigation qui devraient permettre de progresser notamment dans l'étude de la structure et la physiologie de la pellicule dont le rôle est capital dans l'invasion de la cellule hôte.

Ainsi, la mise au point du protocole d'isolement de la pellicule autorise l'essai de détection de protéines contractiles, en particulier l'actine, dans le système membranaire par l'utilisation d'anticorps spécifiques.

La mise en évidence de ces protéines pourrait éclairer sur le mécanisme de l'activité des parasites et permettrait ainsi de rapprocher

leurs mouvements de ceux des autres cellules dont les mécanismes sont déjà établis ; à l'inverse, leur absence conduirait à considérer la motilité Coccidienne comme régie par un système original.

La possibilité qui s'offre à présent de séparer le plasmalemma du complexe interne autorisera de plus une analyse plus fixe de la structure de la pellicule ce qui conduira à des progrès dans l'interprétation de sa fonction.

La préparation d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines membranaires superficielles permettra de détecter la ou les composante(s) impliquée(s) dans les interactions avec le substrat.

Le problème de la motilité présente un grand intérêt en biologie cellulaire, et selon les différents groupes d'organismes unicellulaires étudiés, chacun montre une originalité dans le mécanisme de locomotion.

L'avantage d'avoir étudié en même temps la structure et la physiologie de la pellicule des zoïtes a permis de discuter les structures impliquées dans les différents mouvements. Il sera nécessaire de poursuivre cette étude afin d'élucider le mécanisme de glissement chez les parasites et l'étendre à celui de l'invasion.

## BIBLIOGRAPHIE

- ABERCROMBIE M., HEAYSMAN J.E.M. et PEGRUM S.M., 1971.  
The Locomotion of fibroblasts in culture. IV.  
Electron microscopy of the leading lamella  
Exp. Cell. Res. 67, 359-367.
- AIKAWA M., COCHRANE A.H., NUSSENZWEIG R.S. et RABBEGE J., 1979.  
Freeze-fracture study of Malaria Sporozoites : Antibody-induced  
changes of the pellicular membrane  
J. Protozool., 26, 273-279.
- AIKAWA M., MILLER L.H., JOHNSON J. et RABBEGE J. 1978.  
Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction  
between erythrocyte and parasite.  
J. Cell. Biol. 79, 72-82
- ALBERTINI D.F. et CLARK J.I., 1975.  
Membrane-microtubules interaction : ConcanavalinA capping induced  
redistribution of cytoplasmic microtubules and colchicine binding  
proteins.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 4976-4980.
- ALBERTINI D.F. et ANDERSON E., 1977  
Microtubules and microfilaments rearrangements during capping  
of Con A receptors on cultured ovarian granulosa cells.  
J. Cell. Biol., 73, 111-127.
- ARAUJO F.G. et REMINGTON J.S., 1981.  
Characterization of stages and strains of *Trypanosoma cruzi* by  
analysis of cell membrane components.  
J. Immunol., 127, 855-859.
- AUST-KETTIS A., SUNDQUIVIST K.G., 1978.  
Dynamics of the interactions between *Entamoeba histolytica* and  
Components of the immune response. I. Capping and endocytosis  
influence of inhibiting and accelerating factors : variation of  
the expression of surface antigens.  
Scand. J. Immunol., 7, 35-44.

BARRY J.D., 1979

Capping of variable antigen on *Trypanosoma brucei*, and its immunological and biological significance.

J. Cell. Sci. 37, 287-302.

BLOODGOOD R.A., 1977.

Motility occurring in association with the surface of the *Chlamydomonas* flagellum.

J. Cell. Biol. 75, 983-989.

BLOODGOOD R.A., LEFFLER E.M. et BOJCZUK A.T., 1979.

Reversible inhibition of *Chlamydomonas* flagellum surface motility.

J. Cell. Biol., 82, 664-674.

BOURGUIGNON G.J. et BOURGUIGNON L.Y.W., 1981.

Isolation and initial characterization of a lymphocyte cap structure.

Biochim. Biochys. Acta., 646, 109-118.

BOURGUIGNON L.Y.W. et SINGER S.J., 1977.

Transmembrane interactions and the mechanism of capping of surface receptors by their specific ligands.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5031-5035.

BOWND D., GORDON-WALKER A., GAIDE-HUGUENIN A.C. et ROBINSON W., 1971.

Characterization and analysis of frog photoreceptor membranes

J. Gen. Physiol., 58, 225-237.

BRANTON D., BULLIVANT S., GILULA N.B., KARNOVSKY M.J., MOOR H., MUHLETHALER K., NORTHCOTE D.H., PACKER L., SATIR P., SPETH V., STAEHLIN L.A., STEERE R.L. et WEINSTEIN R.S., 1975.

Freeze etching nomenclature

Science, 190, 55-56.

BRAUN J., FUJIWARA K., POLLARD T.D. et UNANUE E.R., 1978.

Two distinct mechanisms for redistribution of Lymphocyte surface macromolecules.

J. Cell. Biol., 79, 409-418.

BRAY D., 1979.

Cytochalasin action.

Nature. 282, 671.

BRENNER S.L. et KORN E.D., 1979.

Substoichiometric concentrations of cytochalasin D inhibit Actin polymerization

J. Biol. Chem., 254, 9982.

BRESTCSHER M.S., 1976.

Directed lipid flow in cell membranes

Nature (London), 260, 21-23.

BURCHARD R.P., 1981.

Gliding motility of procaryotes : ultrastructure, physiology and genetics.

Ann. Rev. Microbiol. 35, 497-530.

CONDEELIS J., 1979.

Isolation of concanavalin A caps during various stages of formation and their association with actin and myosin.

J. Cell. Biol., 80, 751.

DASILVEIRA J.F., ABRAHAMSOHN P.A. et COLLI W., 1979.

Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*.

Biochem. Biophys. Acta., 550, 222-231.

DENTLER W.L., 1980.

Structures linking the tips of ciliary and flagellar microtubules to the membrane.

J. Cell. Sci., 42, 207-220.



DEPETRIS S. et RAFF M.C., 1973.

Fluidity of the plasma membrane and its implications for cell movement.

Locomotion of Tissue Cells, CIBA Fdn Symp., 14, 27-41 (Elsevier North Holland, Amsterdam).

D'HAESE J., MEHLHORN H. et PETERS N., 1977.

Comparative study of pellicular structures in Coccidia.

Int. J. of Parasitology, 7, 505-518.

DOETSCHMAN T.C., 1980.

The effects of ConA on cell surface shedding in cell cultures.

J. Cell. Sci., 46, 221-235.

DORAN D.J., 1973.

Cultivation in avian embryos and cell culture

The Coccidia (HAMMOND D.M. et LONG P.L., Eds), 185-252,

(University Park Press, Baltimore).

DORAN D.J. et VETTERLING J.M., 1967a.

Comparative cultivation of poultry Coccidia in mammalian kidney cell cultures.

J. Protozool., 14, 657-662.

DUBREMETZ J.F., 1981.

Le zoïte des Coccidies : Cytologie, Biochimie, physiologie et interactions avec la cellule hôte.

Thèse, Université de Lille I.

DUBREMETZ J.F. et DISSOUS C., 1980.

Characteristic proteins of micronemes and dense granules from *Sarcocystis tenella* zoïtes.

Molec. Biochem. Parasitology, 1, 379-289.

DUBREMETZ J.F. et FERREIRA E., 1978.

Capping of cationised ferritin by coccidian zoïtes

J. Protozool., 25, 9b.

DUBREMETZ J.F. et TORPIER G., 1978.

Freeze fracture study of the pellicule of an eimerian Sporozoite  
(Protozoa, Coccidia).

J. Ultrastruct. Res. 62, 94-109.

DWYER D.M., 1976.

Cell surface saccharides of *Trypanosoma loewisi* II.

Lectin mediated agglutination and ultrastructural localization  
of surface membrane lectin-binding sites.

J. Cell. Sci., 22, 1-19.

DZBENSKI T.H. et ZIELINSKA E., 1976.

Antibody-induced formation of caps in *Toxoplasma gondii*.

Experientia, 32, 354.

EDELMAN G.M., YAHARA I. et WANG J.L., 1973.

Receptor mobility and receptor-cytoplasmic interactions in  
lymphocytes.

Proc-Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 1442-1446.

FAYER R., 1970.

*Sarcocystis* : Development in cultured avian and mammalian cells.

Science, 168, 1104-1105.

FAYER R. et HAMMOND D.M., 1967.

Development of first-generation schizonts of *Eimeria bovis* in  
cultured bovine cells.

J. Protozool., 14, 764-772.

FOWLER V. et BRANTON D., 1977.

Lateral motility of human erythrocyte integral membrane proteins.

Nature, 268, 23-26.

FRENKEL J.K., 1974.

Advances in the Biology of Sporozoa.

Z. Parasitenk., 45, 125-162.

GABBIANI G., CHAPONNIER C., ZUMBE A. et VASSALLI P., 1977.

Actin and tubulin co-cap with surface Immunoglobulins in mouse B lymphocytes.

Nature (London), 269, 697.

GARRELS J.I., 1979.

Two-dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines.

J. Biol. Chem., 254, 7961.

GOODENOUGH U.W. et JURIVICH D., 1978.

Tipping and mating structure activation induced in *Chlamydomonas* gametes by flagellar membrane antisera.

J. Cell. Biol., 79, 680-693.

GRASSE P.P., 1953.

Anatomie - systematique - Biologie

Traité de Zoologie

T.I., fasc. 2. (Masson et C<sup>ie</sup>, Eds).

GRIMWOOD B.G., 1980.

Infective *Toxoplasma gondii* trophozoites attenuated by ultraviolet irradiation.

Infection and Immunity, 28, 532-535.

GRIMWOOD B.G., HECHERY K. et STEVENS R.W., 1979.

*Toxoplasma gondii* : purification of Trophozoites propagated in cell culture.

Exp. Parasit., 48, 282-286.

HALFEN L.N., 1979.

Gliding movements.

Encyclopaedia of plant physiology, 7, 250-267.

HANDMAN E., GODING J.W., REMINGTON J.S., 1980.

Detection and characterization of membrane antigens of  
*Toxoplasma gondii*.

J. Immunol., 124, 2578-2583.

HERTZBERG E.L., ANDERSON D.J., FRIEDLANDER M. and GILULA N.B., 1982.

Comparative analysis of the major polypeptides from liver gap  
junctions and lens fiber junctions.

J. Cell. Biol., 92, 53-59.

HEWITT J.A., 1979.

Surface riding model for cell capping

J. Theor. Biol., 80, 115-127.

HUTCHINSON W.M., DUNACHIE J.F., SIIM CH.R. et WORK K., 1970.

Coccidian like nature of *Toxoplasma gondii*.

Brit. Med. J., 1 (5689), 142-144.

JENSEN J.B. et EDGAR S.A., 1976.

Possible secretory function of the rhoptries of *Eimeria magna*  
during penetration of cultured cells.

J. Parasit., 62, 988-992.

KENDALL M.G. et STUART A., 1963.

The advanced theory of statistics vol. 1-Distribution theory.

Griffin London., 257-259.

KEPES A., 1978.

Aspects moléculaires des fonctions membranaires.

(Masson. Ed.)

KING C.A., 1981.

Cell surface interaction of the Protozoa *Gregarina* with ConA beads. Implication for models of *Gregarina* gliding.  
Cell. Biol. Int. Rep., 5, 297-306.

KING C.A., DAVIES A.H. et PRESTON T.M., 1981.

Lack of substrate specificity on the speed of Amoeboid locomotion in *Naegleria grubei*  
Experientia., 37, 709.

KING C.A. et PRESTON T.M., 1977.

Fluoresceinated cationised ferritin as a membrane probe for anionic sites at the cell surface.  
F.E.B.S. Letters, 73, 59-63.

KOPPEL D.E. et SHEETZ M.P., 1981.

Fluorescence photobleaching does not alter the lateral mobility of erythrocytes membrane glycoproteins.  
Nature 293, 159-160.

LAEMMLI U.K., 1970.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4.  
Nature (London), 227, 680-685.

LASKEY R.A. et MILLS A.D., 1975.

Quantitative film detection of  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$  in polyacrylamide gels by fluorography.  
Eur. J. Biochem., 56, 335-344.

LEVINE N.D., 1970.

Taxonomy of the Sporozoa.  
J. Parasit., 56, 208-209.

MACKENZIE C., 1980.

Gliding in *Gregarina garnhami* : movement without actin?  
Cell. Biol. Int. rep., 4, (8), 769.

MARCHALONIS J.J., CONE R.E., et SANTER V., 1971.

Enzymatic iodination : a probe for accessible proteins of normal  
and neoplastic lymphocytes.  
Biochem. J., 124, 921-927.

MAURAS G., DODEUR M., LAGET J.M.S. et BOURRILLON R., 1980.

Partial resolution of the sugar content of *Toxoplasma gondii*  
membrane.  
Biochem. Biochys. Res. Comm., 97, 906-912.

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

Les modalités de la transmission des Protozoaires parasites  
des genres *Sarcocystis* et *Theileria* agents de graves maladies.  
Ann. Biol., 18, 98-120.

MERRIL C.R., DUNAU M.L. et GOLDMAN D., 1981.

A rapid sensitive silver stain for polypeptides in Polyacrylamide  
gels.  
Anal. Biochem., 110, 201.

MICHEL R., SCHUPP K., RAETHER W. et BIERATHER F.W., 1980.

Formation of a close junction during invasion of erythrocytes  
by *Toxoplasma gondii* in vitro  
Int. J. Parasit., 10, 309-314.

MONSIGNY M., SENE C. et OBRENOVITCH A., 1979.

Quantitative fluorometric determination of cell surface glyco-  
conjugates with fluorescein substituted lectins.  
Eur. J. Biochem., 96, 295.

NAKAJIMA Y. et BRIDGMAN P.C., 1981.

Absence of filipin - sterol complexes from the membranes of active zones and acetylcholine receptor aggregates at frog neuromuscular junctions.

J. Cell. Biol., 88, 453-458.

NAKAMURA S. et KAMIYA R., 1978.

Bending notion in split flagella of *Chlamydomonas*

Cell. structure and function, 3, 141-144.

NICOLSON G.L., 1976a

Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells.

I Cytoplasmic influence over cell surface components.

Biochem. Biophys. Acta, 457, 57-108.

NOGUEIRA N. 1981.

*Trypanosoma cruzi*. Surface antigens of blood and culture forms.

J. Exp. Med., 153, 629-639.

OCHS D.C., Mc CONKEY E.H. et SAMMONS D.W., 1981.

Silver stains for proteins in polyacrylamide gels : A comparison of six methods.

Electrophoresis, 2, 304-307.

O'FARRELL P.H., 1975.

High resolution two-dimensional electrophoresis of Proteins.

J. Biol. Chem., 250, 4007-4021.

OLIVER J.M. et BERLIN R.D., 1982.

Mechanisms that regulate the structural and functional architecture of cell surfaces.

Int. Rev. Cytol., 74, 55-92.

OLIVER J.M., LALCHANANDI R. et BECKER E.L., 1977.

Actin redistribution during Concanavalin A cap formation in rabbit neutrophils.

J. Reticuloendoth. Soc., 21, 359.

PETERSON J.A. et RUBIN H., 1969.

The exchange of phospholipids between cultured chick embryo fibroblasts and their growth medium.

Exp. Cell. Res., 58, 365-378.

PHILIPPE M., FOURNET B., CAIGNEAUX E. et SCHREVEL J., 1979.

Les polysaccharides associés à la surface cellulaire d'une grégarine (Protozaire Parasite).II Caracterisation cytochimique et analyse biochimique des "ghosts".

Bio. Cell., 35, 165-174.

PHILIPPE M., VINCKIER D., DUBREMETZ J.F. et SCHREVEL J., 1982.

The three cortical membranes of the Gregarines (Parasitic Protozoa) III. Comparative studies of the membrane proteins among different Sporozoan species during their vegetative phase.

J. Protozool., 29, 424-430.

PORCHET-HENNERE E., 1982.

Observations recentes sur la biologie du Toxoplasme.

J. Protozool., 29, 310.

PORCHET-HENNERE E. et TORPIER G., 1977.

Etude du germe infectieux de *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii* par la technique du cryodécapage.

Z. Parasitenk., 54, 101-124.

PORCHET-HENNERE E., TORPIER G. et RICHARD A., 1982.

Etude après cryofracture du merozoïte de la Coccidie *Aggregata eberthi*.

Z. Parasitenk., 66, 257-271.



PORCHET-HENNERE E. et VIVIER E., 1971.

Ultrastructure comparée des germes infectieux (Sporozoïtes, mérozoïtes, schizozoïtes, endozoïtes) chez les Sporozoaires.  
Ann. Biol., 10, 77-113.

PRESTON T.M. et KING C.A., 1978.

Cell substrate associations during the amoeboid locomotion of Naegleria.  
J. Gen. Microbiol., 104, 347-351.

PUCK T.T., CIECIURA S.J. et FISHER H.W., 1957.

Clonal growth in vitro of human cells with fibroblast morphology. Comparison of growth and genetic characteristics of single epithelioid and fibroblast like cells from a variety of human organ.  
J. Exp. Med., 106, 145-158.

ROBERTSON J.D., 1957.

New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers.  
J. Biophys. Biochem., 3, 1043-1047.

ROBERTS W.L., SPEER C.A. et HAMMOND D.M., 1971.

Penetration of *Eimeria larimerensis* sporozoïtes into cultured cells as observed with light and electron microscopes.  
J. Parasitol., 57, 625-625.

ROUDABUSH R.L., 1937.

The endogenous phases of the life cycles of *Eimeria nieschulzi*, *Eimeria separata* and *Eimeria miyarii*. Coccidian parasites of the rat.  
Iowa State Coll. J. Sci., 2, 135-163.

ROVIS L. et BAEKKESKOV S., 1980.

Sub-cellular fractionation of *Trypanosoma brucei*. Isolation and characterization of plasma membranes.  
Parasitology, 80, 507-524.

- ROVIS L., BARBET A.F. et WILLIAMS R.O., 1978.  
Characterisation of the surface coat of *Trypanosoma congolense*.  
Nature (London), 271, 654-656.
- RUIZ A. et FRENKEL J.K., 1976.  
Recognition of cyclic transmission of *Sarcocystis muris* by cats.  
J. Infectious Diseases, 133, 409-417.
- RUSSELL D.G. et SINDEN R.E., 1981.  
The role of the cytoskeleton in the motility of Coccidian Sporozoites  
Cell. Sci., 50, 345-359.
- RUSSELL D.G. et SINDEN R.E., 1982.  
Three-dimensional study of the intact cytoskeleton of Coccidian  
Sporozoites.  
Int. J. Parasit., 12, 221-226.
- RUSSELL D.G., 1982.  
Host Cell invasion by apicomplexa : an expression of the para-  
site's contractile system ?  
Sous presse.
- SAMPSON J.R., HAMMOND D.M. et ERNST J.V., 1971.  
Development of *Eimeria alabamensis* from cattle in mammalian  
cell cultures  
J. Protozol., 18, 120-128.
- SATIR P., 1968.  
Studies on cilia III - Further studies of the cilium tip and a  
"sliding filament" model of ciliary motility.  
J. Cell. Biol., 39, 77-94.
- SCHLESSINGER J., AXELROD D., KOPPEL D.E., WEBB W.W. et ELSON E.L., 1976.  
Lateral transport of a lipid probe and labeled proteins on a  
cell membrane.  
Science, 195, 307-308.

SCHLIWA M., 1979.

Stereo high voltage electron microscopy of melanophores, Matrix transformations during pigment movements and the effects of cold and colchicine.

Exp. Cell. Res., 118, 323.

SCHREINER G.F. et UNANUE E.R., 1976.

Membrane and cytoplasmic changes in Blymphocytes induced by ligand-surface Immunoglobulin interaction.

Adv. Immund., 24, 38-165.

SCHREVEL J., 1972.

Les polysaccharides associés à la surface cellulaire des Gregarines (Protozoaires parasites) I. Ultrastructure et cytochimie.

J. Microscopie, 15, 21-40.

SJÖSFRAND F.S. et KREMAN M., 1978.

Molecular structure of outer segment disks in photoreceptor cells.

J. Ultrastruct. Res., 65, 195-226.

SPEER C.A., DAVIS L.R. et HAMMOND D.M., 1971.

Cinmicrographic observations on the development of *Eimeria larimerensis* in cultured bovine cells.

J. Protozool. 18, (suppl.), 11.

STECK T.L. et DAWSON G., 1974.

Topographical distribution of complex carbohydrates in the erythrocyte membrane.

J. Biol. Chem., 249, 2135-2142.

SUNDQVIST K.G. et EHRNST A., 1976.

Cytoskeletal control of surface membrane mobility.

Nature (London), 264, 226.

TAKAHASHI Y., YAMADA K et SHERMANI W., 1980.

*Plasmodium lophurae* : Antibody - induced movement and capping of surface membranes of erythrocyte-free Malarial parasites  
Exp. Parasit., 50, 201-211.

TO L.P. et MARGULIS L., 1978.

Ancient locomotion : Procaryotic motility systems.  
Int. Rev. Cytol., 54, 267-294.

TOH B.H. et HARD G.C., 1977

Actin Co-caps with ConcanavalinA receptors.  
Nature (London), 269, 696.

TURNER D.P. et GREGSON N.A., 1982.

The Cell surface of *Plasmodium gallinaceum* Sporozoïte : microelectrophoretic and lectin binding characteristics.  
Parasitology, 84, 227-238.

VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIECHLAG E. et ROSS T.G., 1971.

A method for producing specific antisera with small doses of immunogen.  
J. Clin. Endocr. metabol., 33, 988-991.

VANDERBERG J.P., 1974.

Studies on the motility of *Plasmodium* sporozoïtes.  
J. Protozool., 21, 527-537.

VERMEULEN A.N., VANMUNSTER J.C. et MEUWISSEN J.H.E.Th., 1982.

*Plasmodium berghei* : immunologically active proteins on the sporozoïte surface.  
Exp. Parasit., 53, 199-208.

VIVIER E., 1968.

L'organisation ultrastructurale corticale de la Gregarine *Lecudina pellucida* et ses rapports avec l'alimentation et la locomotion.  
J. Protozool., 15, 230-246.

VIVIER E., DEVAUCHELLE G., PETITPREZ A., PORCHET-HENNERE E., PRENSIER G., SCHREVEL J. et VINCKIER D., 1970.

Observations de cytologie comparée chez les Sporozoaires. I. Les structures superficielles chez les formes végétatives.  
Protistologica, 6, 127-150.

VIVIER E. et PETITPREZ A., 1969.

Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus fils chez *Toxoplasma gondii*.  
J. Cell. Biol., 43, 329-342.

WAGENBACH G.E., 1969.

Purification of *Eimeria tenella* sporozoites with glass beads columns.  
J. Parasitol., 55, 833-838.

WATANABE S., TOYOHARA A., SUZAKI T. et SHIGERAKA Y., 1981.

The relation of ConcanavalinA receptor distribution to the conjugation process in *Tetrahymena thermophila*.  
J. Protozool., 28, 171-172.

WEATHERBEE J.A., 1981.

Membranes and cell movement : interactions of membranes with the proteins of the cytoskeleton.  
Int. Rev., Cytol., 12, 113-164.

WILLIAMS D.A., BOXER L.A., OLIVER J.M. et BAEHNER R.L., 1977.

Cytoskeletal regulation of ConcanavalinA capping in pulmonary alveolar macrophages.  
Nature (London), 276, 255.

YAHARA I. et KAKIMOTO-SAMESHIMA F., 1980

Decrease in the density of intramembrane particles associated with ligand-independent cap formation.  
Cell. Struct. and function, 5, 223-232.

ANNEXE PLANCHES

Planche I :

Figure 1 : Pellicule de bradyzoïte de *Sarcocystis muris*  
Le complexe interne (Ci) est formé d'une double membrane adjacente au plasmalemme(P).  
(x 80 000).

Figure 2 : Bradyzoïte de *Sarcocystis muris*  
(x 5 000)

Figures 3 et 4 : Résultats préliminaires lors de la mise au point d'isolement de la pellicule des bradyzoïtes de *Sarcocystis muris* : homogénéisation à 50 kg/cm<sup>2</sup>.

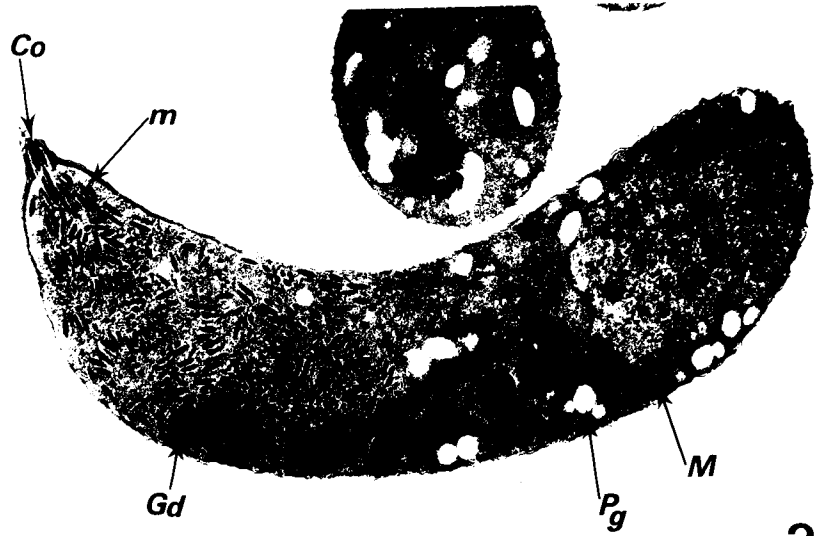
Fig. 3 : Culot 113 000 g<sub>max</sub> de l'interface 1 - 0.25M  
La fraction enrichie en "ghosts" dans lesquels persistent de nombreux microtubules sous pelliculaires (flèches) ainsi que des organites.  
(x 5 000).

Fig. 4 : Culot 113 000 g<sub>max</sub> de l'interface 1.6 - 1.4M  
La fraction riche en organites : mitochondries (M), granules denses (Gd) et micronèmes (m) renferme des pellicules.  
(x 5 000).

Abbréviations:

Ci:complexe interne  
Co:conoïde  
Cr: corps réfringent  
Gd:granules denses  
m:micronèmes  
M:mitochondries  
p:plasmalemme  
Pg:paraglycogène





2



4



Planche II:

ANALYSE DE LA PELLICULE DE *Sarcocystis muris* PAR  
CRYOFRACTURE

- Figure 1 : Fracture montrant les différentes faces de la pellicule. Au niveau de la face Pi, noter les lignes de suture (flèches) délimitant les plaques du complexe interne. Chaque plaque contient de nombreux alignements longitudinaux de P.I.M. parmi lesquels 2 sont plus riches en particules (flèches longues).  
(x 60 000).
- Figure 2 : Correspondance entre les petits alignements de P.I.M. de la face Pe et les lignes de suture de la face Em.  
(x 40 000).
- Figure 3 : Les alignements plus riches en particules de la face Pi sont séparés par 9 rangées simples de P.I.M. ; et sont situés à environ 6 rangées du bord de la plaque.  
(x 40 000).
- Figure 4 : Rosette apicale (x 81.000).
- Figure 5 : Même région en cryofracture. Des rangées de P.I.M. sont orientées dans la même direction que les microtubules.  
(x 120 000).
- Figures 5 et 6 : Région apicale du bradyzoïte
- Fig. 6 : Les microtubules sous pelliculaires (petites flèches) viennent s'insérer au niveau d'un anneau (grande flèche) entourant le conoïde des rhoptries.  
(x 20 000).

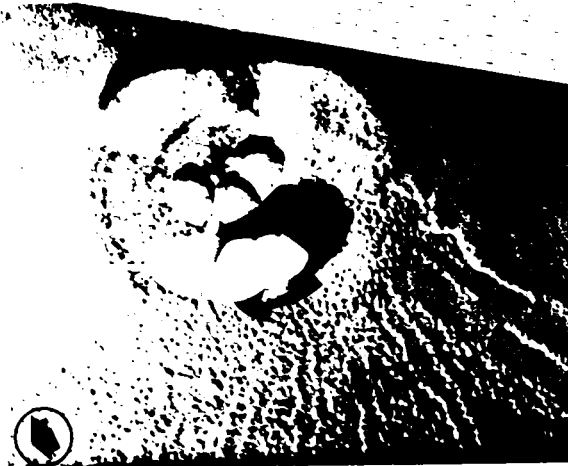
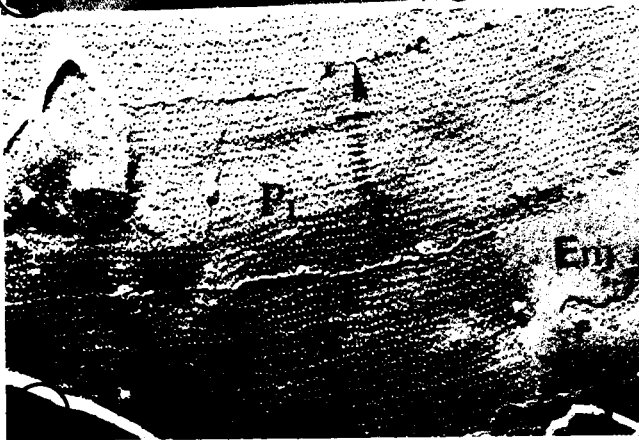
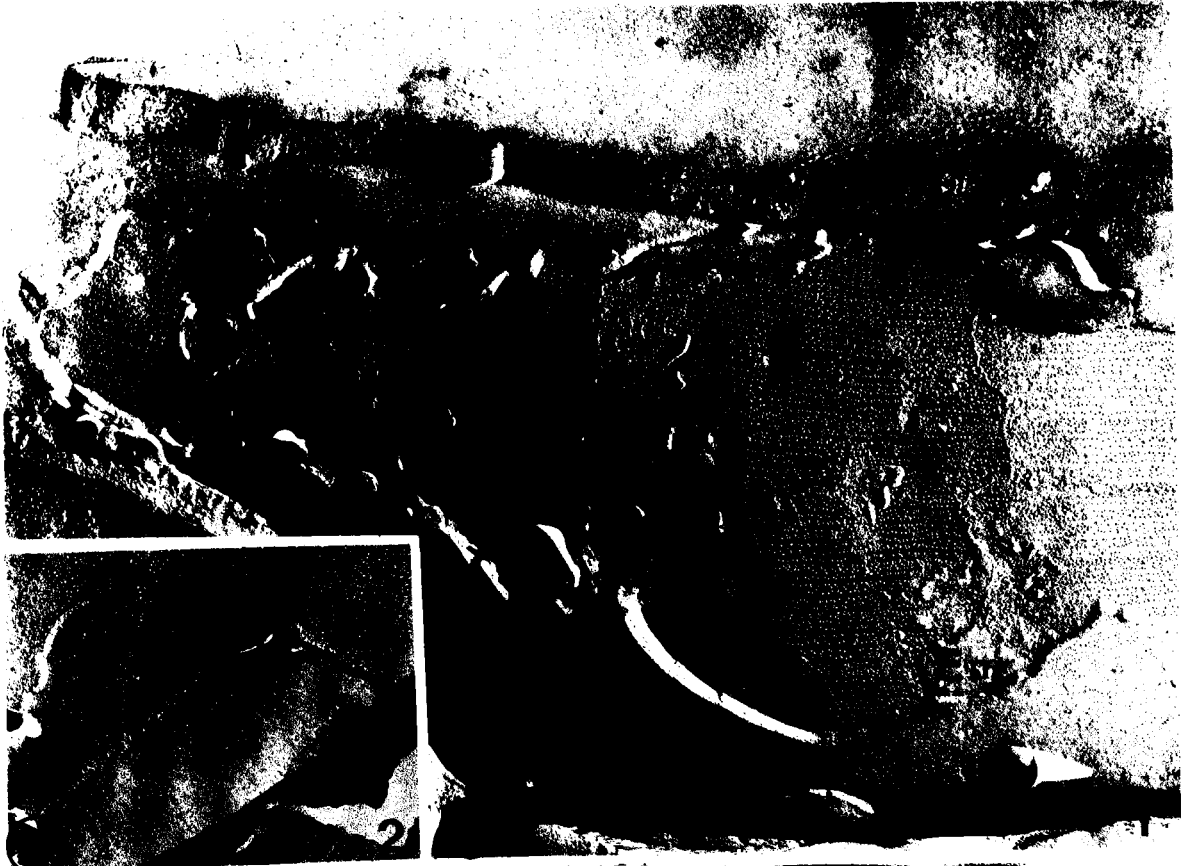


Planche III : IODINATION ENZYMATIQUE DES ZOÏTES

- A : Bradyzoïtes de *Sarcocystis muris*
- B : Sporozoïtes d'*Eimeris nieschulzi*
- C, D, E et F, Action de la trypsine sur les protéines superficielles du bradyzoïte de *Sarcocystis tenella*
- C : surnageant de la trypsine de D.
- D : iodés puis trypsinés
- E : iodés sans trypsination
- F : zoïtes trypsinés puis iodés

La bande à 87 Kd apparue en A, B, E et F disparaît en D à la suite de la trypsination ; elle pourrait correspondre à la lactoperoxydase.

- G et H : tachyzoïte de *Toxoplasma gondii*
- G : zoïtes issus d'ascite.
- H : zoïte issus de cellules en culture.

Quantité de radioactivité déposée : 10 000 cpm  
temps d'exposition : 8 jours.



A B

←87kd

C D E F

←87kd

←28

←30

←17

←17

←14

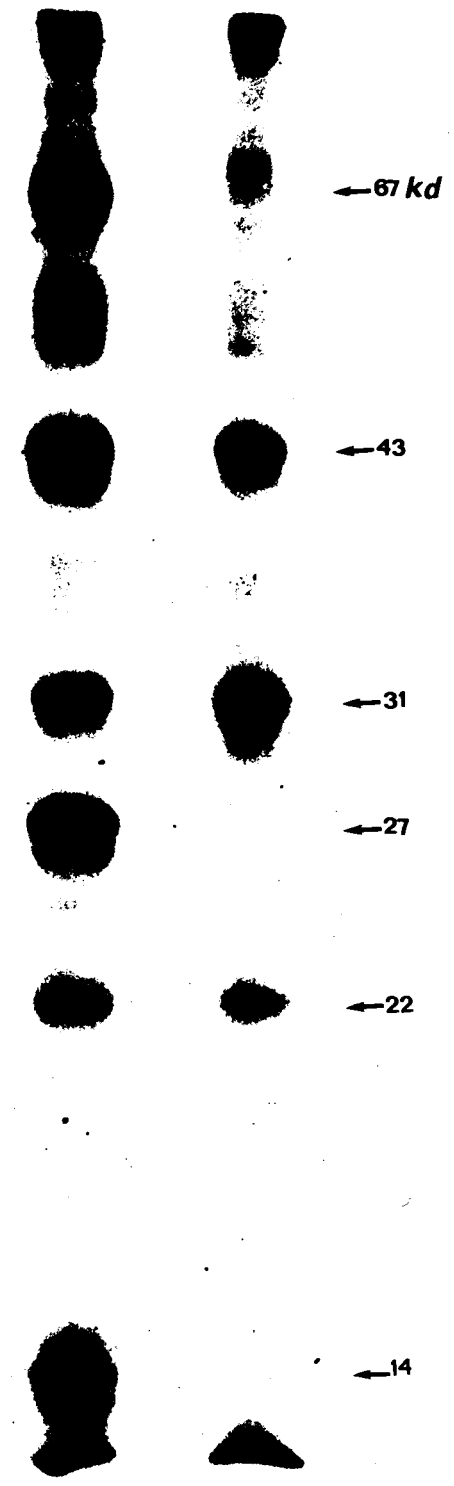


Planche IV :

ANALYSE DES PELLICULES DE *Sarcocystis muris*

Figure 1 : Culot 11 3000 g<sub>max</sub> de l'interface 1 - 0,25M.  
Les microtubules sous pelliculaires persistent  
dans certains "ghosts" (flèche).  
(x 13.500).

Figures 2 et 3 : Vues détaillées des "ghosts" isolés. La  
structure trimembranaire est conservée. Le  
complexe interne tend à se fragmenter en vé-  
sicules de petites tailles (flèches)  
fig. 2 (x 40.000).  
fig. 3 (x 67.000).

A, B, et C Analyse électrophorétique de la fraction  
"ghosts".

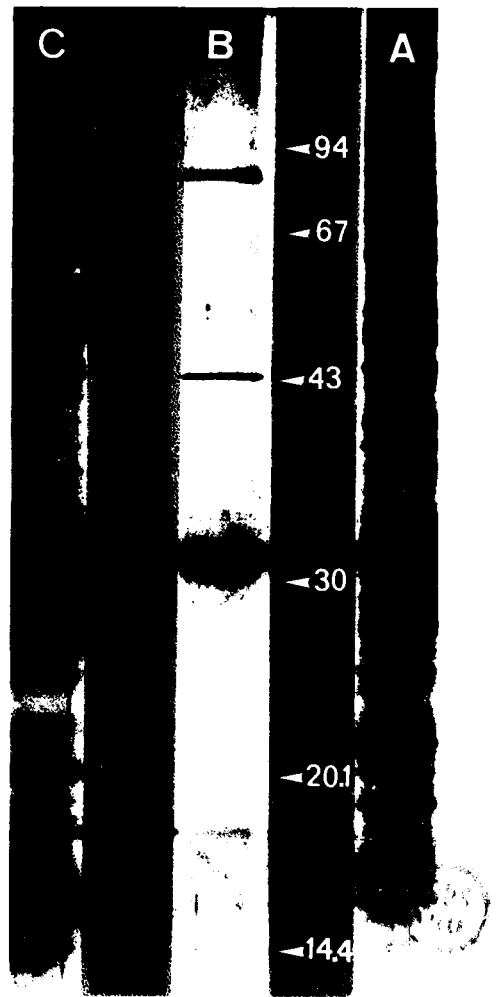
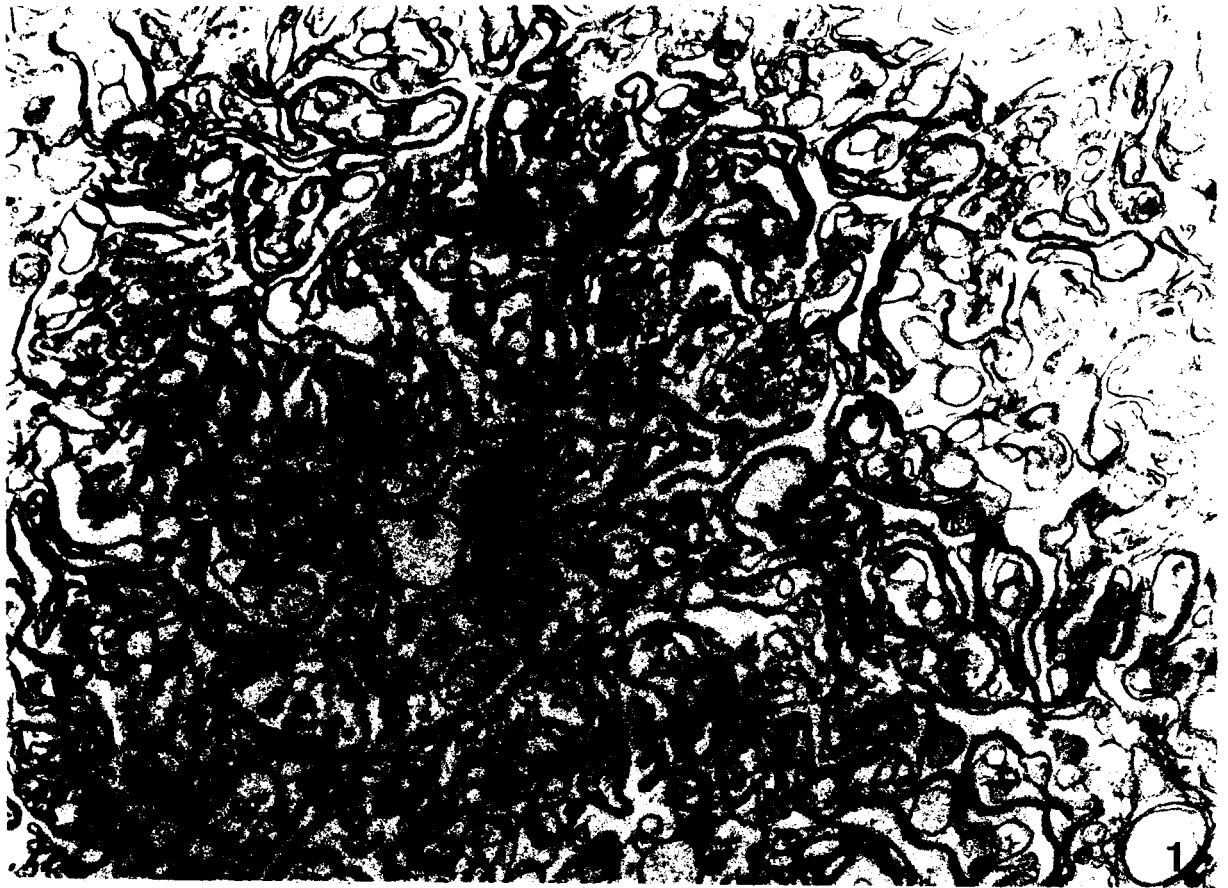
A : zoïtes entiers (quantité de protéines déposée  $4 \cdot 10^{-6}$  g.)

B : fraction "ghosts" ( " " " "  $1,2 \cdot 10^{-6}$  g)

C : fraction granules denses ( $2 \cdot 10^{-6}$  g.)

coloration des gels à l'argent.





Figures 1, 2, 3 et 4 : Différentes faces de fracture montrant la désorganisation des P.I.M. Les lignes de sutures sont préservées (flèches). E, 2 la tendance à la vésiculation du complexe interne apparaît.

figs. 1 et 4 (x 30.000).

figs. 2 et 3 (x 50.000).

Figure 5 : Grand fragment de pellicule fracturé transversalement et ayant conservé la structure trimembranaire.  
(x 50.000).

Figure 6 : Figure évoquant une rosette apicale (Ra)  
(x 50.000).





Planche VI :

ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE DES PELLICULES

DE *Sarcocystis muris*

Figure 1 : fraction "ghosts" P : Protéine majeure

Figure 2 : zoïtes entiers D ; Protéine des granules denses

quantité de protéines déposées  $160 \cdot 10^{-6}g$  ; 2:  $250 \cdot 10^{-6}g$   
coloration des gels à l'argent.

marqueurs de poids moléculaires de haut en bas  
94, 67, 43, 30, 20,1 et 14,4 kd



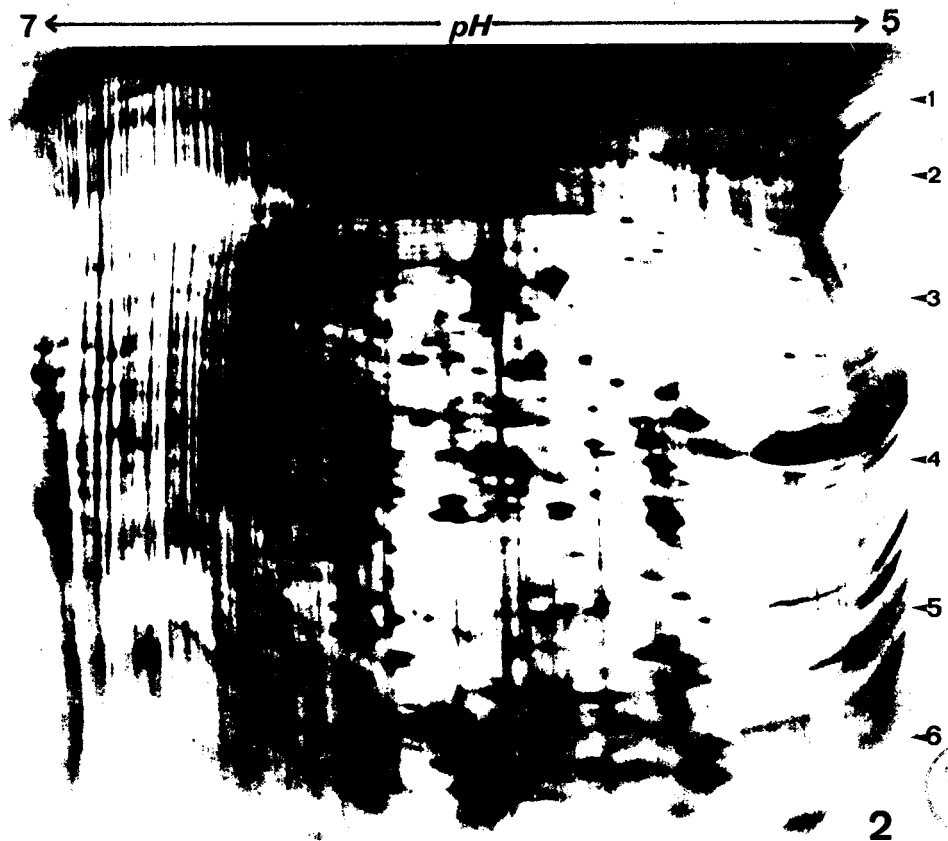
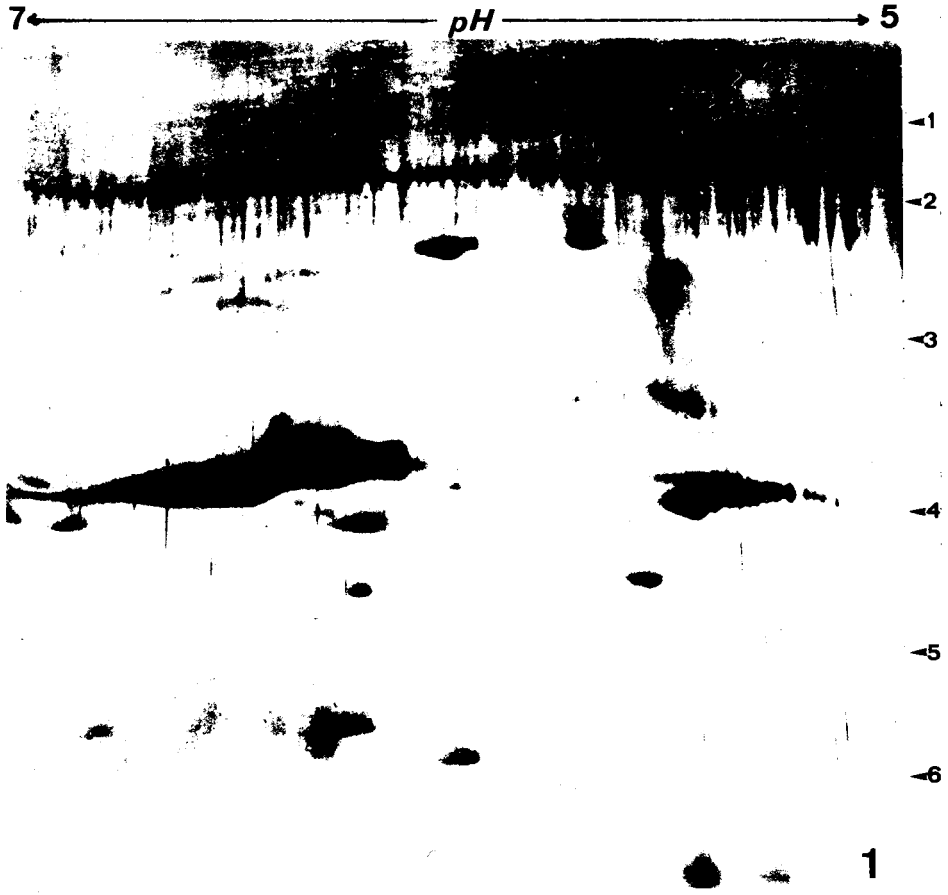


Figure 1 : Pellicules traitées aux ultrasons pendant 30 secondes les pellicules commencent à se fragmenter, mais les fragments plurimembranaires persistent.  
(x 10.000).

Figure 2 : Traitement aux ultrasons pendant 2 minutes deux types de vésicules sont observés : certaines à membrane épaisse et contrastée (flèche), d'autres plus petites à membrane mince (\*).  
(x 20.000).

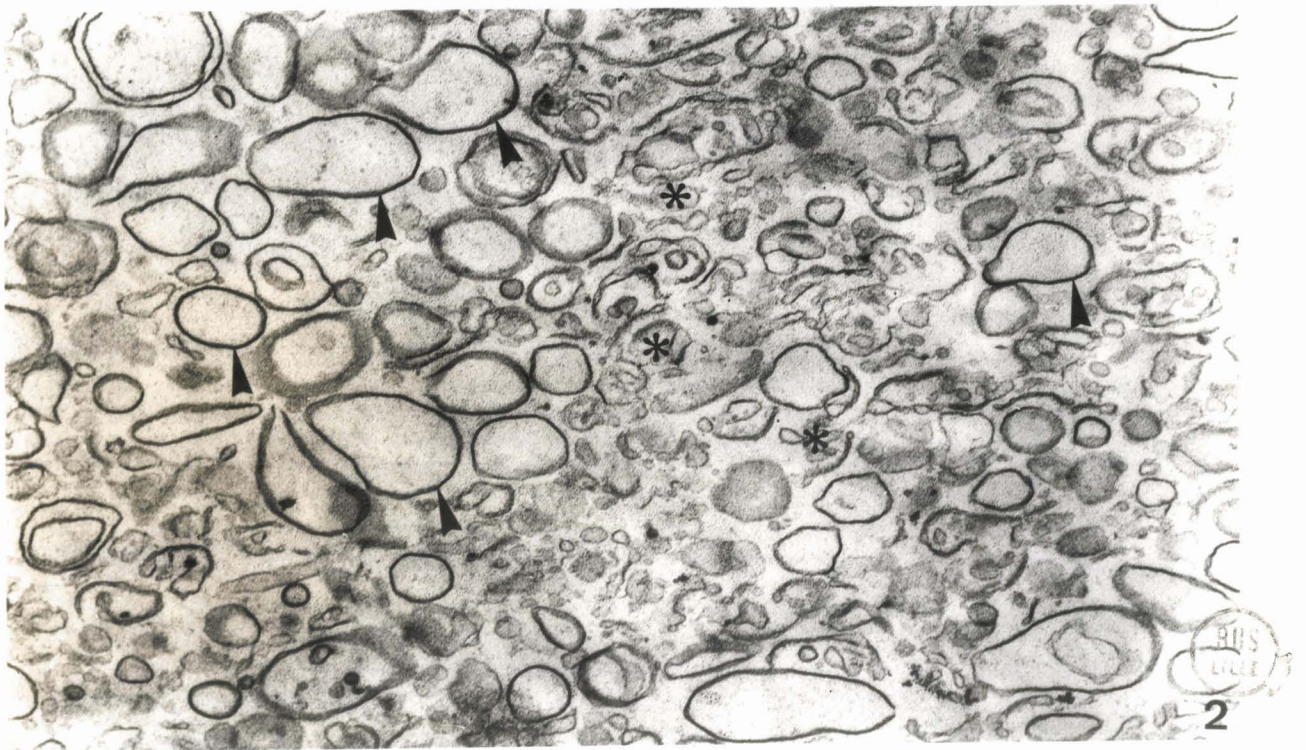
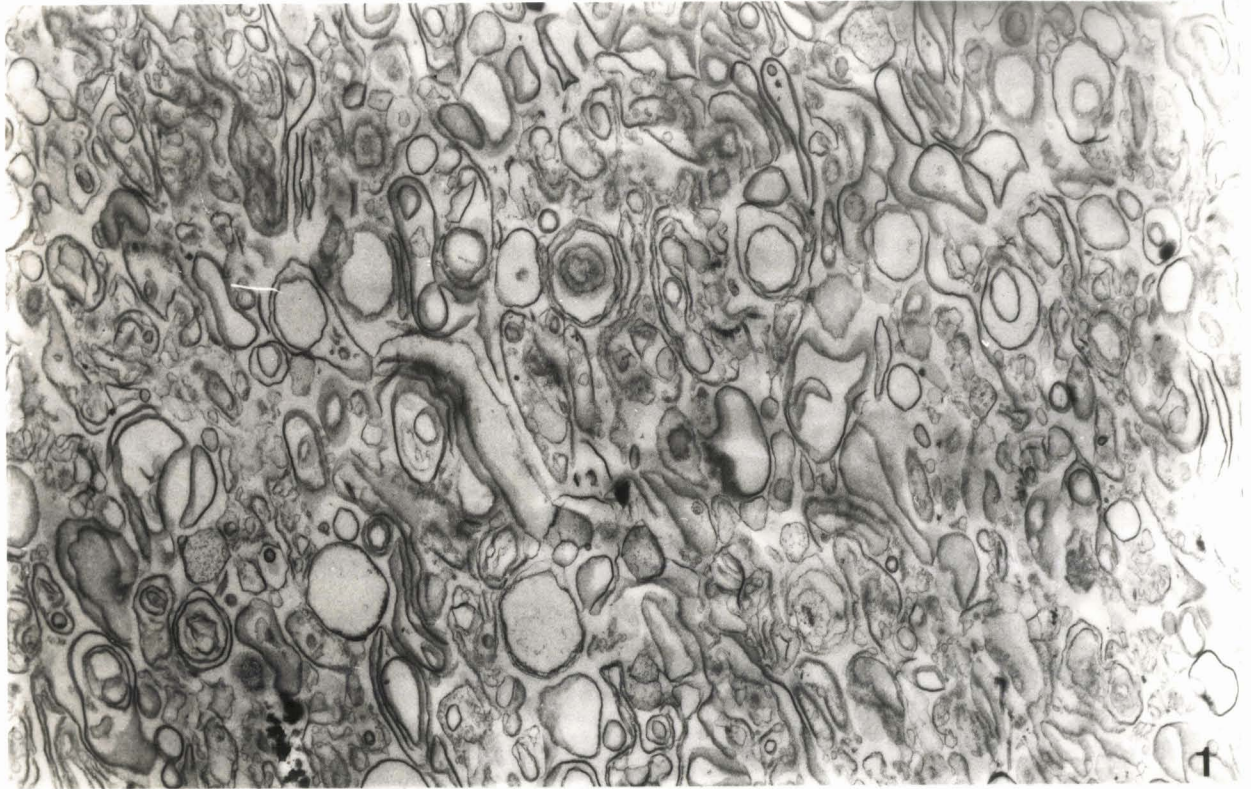


Planche VIII : ANALYSE DES PELLICULES D'*Eimeria nieschulzi*

Figure 1 : Analyse ultrastructurale des "ghosts" quelques contaminants (flèches) peuvent subsister.  
(x 4.000).

Figures 2 et 3 : Les pellicules conservent leur structure trimembranaire, le complexe interne se résout parfois en vésicules (flèches).  
(x 33.500).

A, B, C et D : Analyse électrophorétique des pellicules

A : Fraction "ghosts" ( $8 \cdot 10^6$ g de protéines)

C : zoïtes entiers

B et D : marqueurs de poids moléculaires

Les gels de A et B sont colorés à l'argent

Ceux de C et D sont colorés au bleu de Coomassie.



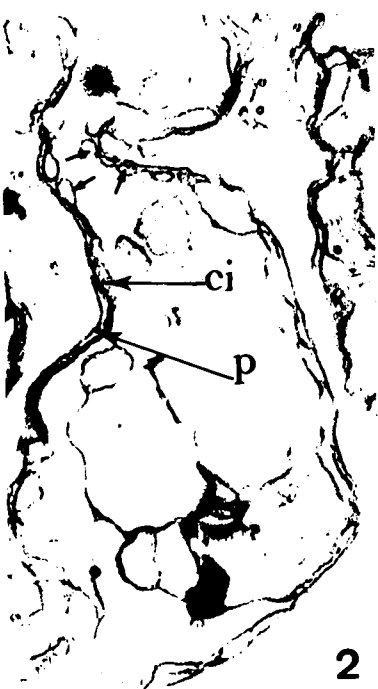
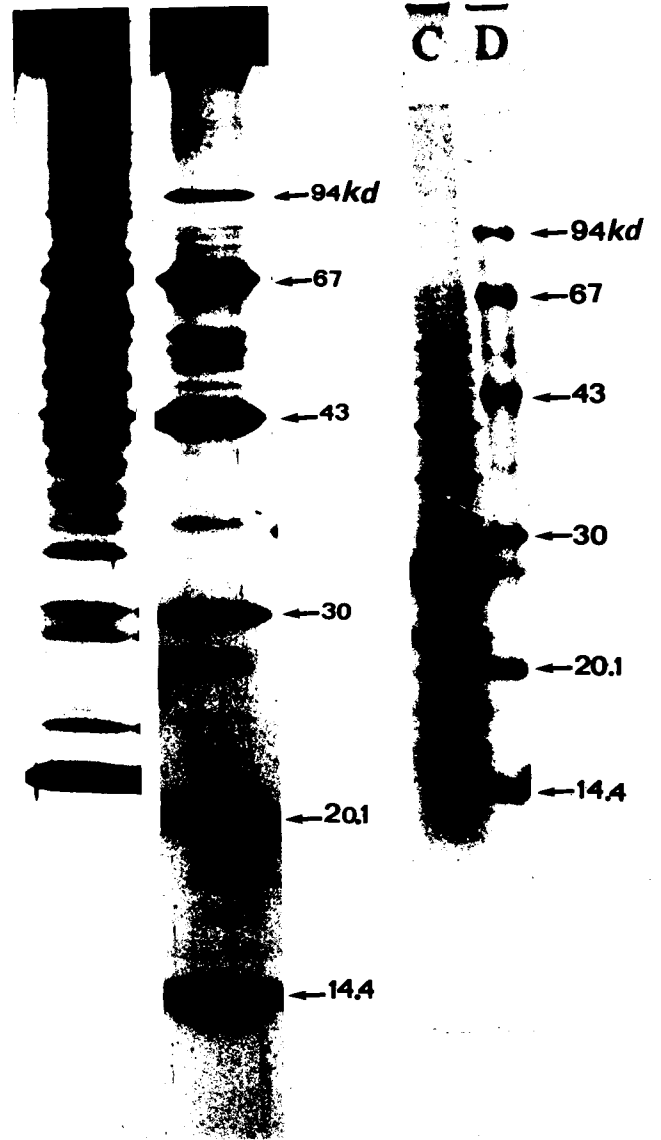
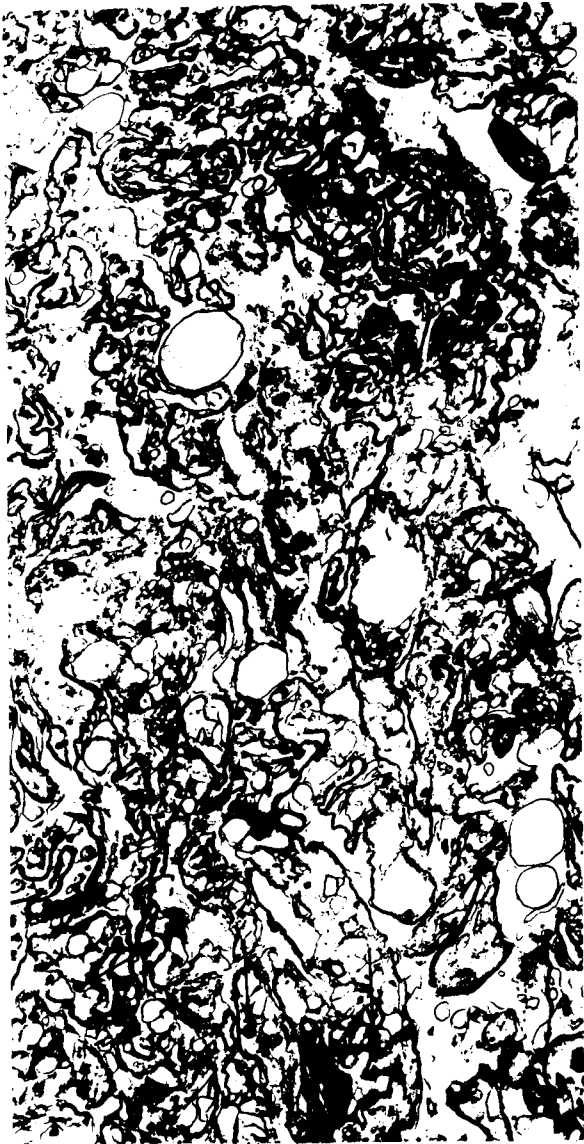


Planche IX : MISE EN EVIDENCE DE LA DYNAMIQUE SUPERFICIELLE  
CHEZ LE SPOROZOÏTE D'*Eimeria nieschulzi*

Figures 1 et 2 : marquage des sporozoïtes par la lectine (H P A) fluorescente.

Fig. 1 : marquage à 4°C : zoïtes groupés en agrégats .

Fig. 2 : incubation à 37°C : le marquage est redistribué en cape postérieure fluorescente (cercles).

Figure 3 : Sporozoïtes marqués par des I g G fluorescents ; capes sous forme de trainées (flèches).

Figures 4, 5 et 6 : Marquage par des anticorps ant sporozoïtes révélés par des antiimmunoglobulines fluorescentes.

Fig. 4 : Sporozoïtes ayant abandonné leurs trainées sur le support.

Fig. 5 : Marquage à 4°C.

Fig. 6 : Passage à 37°C : les capes se forment (flèches).



