

N° d'ordre : 984

50376  
1982  
257

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

I. N. S. E. R. M. U. 42

50376  
1982  
257

## THESE DE TROISIEME CYCLE

**SLOMIANNY Christian**

CONTRIBUTION A L'ETUDE ULTRASTRUCTURALE DU  
PROCESSUS DE DEGRADATION DE L'HEMOGLOBINE  
CHEZ PLASMODIUM CHABAUDI (LANDAU 1965).

- Etude morphologique.
- Etude cytochimique.



Présentée le 7 juillet 1982

devant la Commission d'Examen

JURY :

MM.

E. VIVIER

Président

W. PETERS

Rapporteurs

G. PRENSIER

J. BIGUET

Examineurs

P. CHARET

B.U. LILLE I



D 030 100941 5

L'Homme est absurde par ce qu'il cherche ; grand par ce qu'il trouve...

Paul Valéry

## SOMMAIRE

	pages
INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	3
Entretien de la souche	3
Cryopréservation	3
I - Etude morphologique	4
A - Coupes sériées	4
B - Cryofracture	4
II - Etude cytochimique	6
A - Recherche de la phosphatase acide	6
B - Recherche d'enzymes protéolytiques	6
1 - Préparation des culots	6
2 - Incubation	7
RESULTATS	
I - Rappels - Cycle biologique du parasite	8
A - Cycle parasitaire naturel	8
B - Le trophozoïte	10
II - Etude morphologique	12
A - Organisation interne	12
1 - Etude détaillée des structures	12
a - Vacuoles et vésicules à contenu	
amorphe	12
- Grande vacuole	12
- Vacuoles de taille moyenne	12
- Vésicules de petite taille	12
b - Vacuoles et vésicules à contenu	
cristallin	13
2 - Examen des coupes sériées et	
reconstitution tridimensionnelle	13
a - Structure de la grande vacuole	14
b - Mise en évidence d'un tube	14
3 - Interprétation et résumé de	
l'étude morphologique	16

	Pages
B - Etude des membranes par cryofracture	19
1 - Rappel des conventions	19
2 - Etude des particules intramembranaires	19
a - Membrane plasmique de l'érythrocyte	21
b - Membrane de la vacuole parasitophore	21
c - Membrane plasmique du parasite	22
d - Membranes des vacuoles et vésicules	22
- La "vacuole nutritive"	22
- La vacuole et le tube cytotomal	22
- Les vésicules de pinocytose	22
e - Remarques	22
3 - Les stérols membranaires	23
a - Membrane plasmique de l'hématie	24
b - Membrane de la vacuole parasitophore	24
c - Membrane plasmique du parasite	25
d - Membranes des vacuoles et vésicules	25
e - Remarques	25
4 - Résumé	26
C - Discussion	26
III - Etude cytochimique	31
A - Phosphatase acide	31
B - Enzymes protéolytiques	31
1 - Mise en évidence de l'aminopeptidase	31
a - Principe	31
b - Résultats	32
2 - Mise en évidence de l'endoarylamidase	33
3 - Témoins	33
4 - Résumé	34
C - Discussion	34
CONCLUSION	41
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXE PLANCHES	

## INTRODUCTION

Pour vivre et croître, tout organisme a besoin de se nourrir, au moins à un moment de son existence. S'il ne possède pas de réserves propres, il doit puiser sa nourriture à l'extérieur. Ce problème se pose souvent de façon complexe pour les Protozoaires parasites. La notion de parasitisme implique la notion de dépendance vis-à-vis de l'hôte. Les parasites intracellulaires ont donc le cytoplasme de leur cellule-hôte comme principale source de nourriture.

La nutrition implique la nécessité, pour le parasite, d'ingérer les nutriments c'est-à-dire de les faire passer dans son propre cytoplasme, à travers la membrane plasmique. Il existe ainsi plusieurs théories pour expliquer le passage de la barrière que constitue le plasmalemme : simple diffusion de molécules, pinocytose ou phagocytose avec intervention ou non d'une structure spécialisée de type micropore. A l'heure actuelle, peu de démonstrations probantes ont été faites sur le mécanisme de nutrition des parasites intracellulaires. Les éléments connus sont l'état et les produits de départ ainsi que les supposés produits finals résiduels. Le mécanisme conduisant de l'un à l'autre est mal connu.

Chez les Hémosporidies, l'ingestion du cytoplasme de la cellule-hôte se ferait par l'intermédiaire de vacuoles ou vésicules par un procédé de pinocytose avec l'intervention d'une structure spécialisée, le cytostome. Un produit de digestion de l'hémoglobine est le pigment palustre ou hémozoïne des *Plasmodium*. Cependant, ce composé n'existe pas chez d'autres Hématozoaires tels que *Babesia* et *Theileria*, ce qui tend à montrer un autre mode d'utilisation du stroma érythrocytaire. Or, la molécule d'hémoglobine est beaucoup trop importante pour passer directement à travers le plasmalemme. Cela implique la présence d'enzymes capables de la dégrader en éléments plus facilement assimilables.

Diverses théories ont ainsi été formulées afin d'expliquer les mécanismes présidant à l'ingestion puis à la digestion de l'hémoglobine chez les Hématozoaires. Cependant, de nombreuses incertitudes persistent encore. Personne, à notre connaissance, n'a encore pu montrer avec certitude comment et où est utilisée l'hémoglobine. D'autres problèmes se posent également, concernant la présence et l'utilité de la vacuole nutritive ainsi dénommée parce qu'elle semble contenir du stroma érythrocytaire, le fonctionnement et la structure du micropore, le mécanisme de formation du pigment, l'identification et la localisation exacte des enzymes ainsi que leur mode d'action.

Pour essayer d'apporter quelques éléments de réponse, nous avons pris comme outil biologique *Plasmodium chabaudi* (Landau, 1965), agent du paludisme d'un rongeur africain de la région de Bangui, *Thammomys rutilans* (Peters). Ce parasite est facilement adaptable aux Souris de laboratoire par inoculation sanguine. De par cette facilité et cette adaptabilité, le paludisme murin est devenu un modèle valable de paludisme des Mammifères.

Notre étude consiste à étudier tout d'abord l'aspect morphologique de l'ingestion du stroma érythrocytaire à l'aide de la technique des coupes sériées et reconstitution tridimensionnelle, afin de situer le phénomène dans le temps et l'espace. La cryofracture nous permettra ensuite de suivre les modifications membranaires pendant l'endocytose. Afin de vérifier nos premières hypothèses, nous ferons une étude cytochimique du phénomène en essayant de mettre en évidence des marqueurs de la digestion, en l'occurrence des enzymes protéolytiques spécifiques.

Avant de montrer nos résultats, nous exposerons les différentes techniques ultrastructurales et cytochimiques utilisées puis nous rappellerons le cycle biologique du parasite ainsi que l'organisation interne du stade que nous avons plus précisément étudié, à savoir le trophozoïte.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches de *P. chabaudi* nous ont été aimablement fournies par Mme AISSI E., I.N.S.E.R.M. U. 42, dirigé par le Professeur BIGUET J.

- *Entretien de la souche*

Le cycle parasitaire est entretenu artificiellement sur des Souris blanches par passage mécanique tous les 5 à 6 jours de la manière suivante : du sang (3 gouttes) est prélevé à la queue d'une Souris infestée depuis 5 jours (taux de parasitémie environ 60 %). Ce sang est mélangé à 1,5 ml de milieu MEM ou 199 stérile. Ce mélange est ensuite réinjecté par voie intrapéritonéale à raison de 0,5 ml par Souris. Le nombre de parasites injectés à une Souris est donc d'environ  $5 \cdot 10^5$ . La parasitémie est ensuite surveillée et suivie quotidiennement en faisant des frottis sanguins colorés au MAY GRUNWALD-GIEMSA. Quand le taux d'hématies parasitées atteint 60 %, la souche peut être inoculée à d'autres Souris.

- *Cryopréservation*

La souche peut également être conservée selon la technique de cryopréservation classique. Le sang est mélangé à du DMSO (diméthylsulfoxyde) à 10 % à raison de 10 volumes de sang pour 1 volume de milieu preservativeur. Le mélange est ensuite réparti dans des cryules (environ 1 ml par cryule) qui sont progressivement amenées à  $-196^{\circ}\text{C}$  dans l'azote liquide au moyen d'un dispositif de congélation Biogel (Air Liquide) et stockées en vue d'un usage ultérieur. Avant utilisation, les cryules sont réchauffées à  $37^{\circ}\text{C}$  et leur contenu peut être alors directement réinoculé à des Souris, à raison de 0,5 ml par Souris.

## I - ETUDE MORPHOLOGIQUE

Les préparations des échantillons en vue de l'étude ultrastructurale est faite selon deux techniques : obtention de coupes sériées et cryofracture.

### A - Coupes sériées

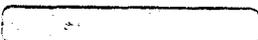
Après quelques essais infructueux, la meilleure technique de fixation et d'inclusion s'est révélée être la suivante:

Quand le taux de parasitémie atteint 60-70 %, le sang (500  $\mu$ l) est prélevé à la queue de la Souris et directement réparti dans des petits tubes contenant chacun 5 ml de fixateur. Celui-ci est composé de glutaraldéhyde 2,5 % dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,4. La fixation dure 1h30 à température ambiante avec de fréquentes agitations. Les tubes sont alors centrifugés à 1700 g pendant 5 mn. Le lavage se fait par remise en suspension des culots dans du tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4 additionné de sucrose 0,15 M. Après une nouvelle centrifugation, les culots sont postfixés dans l'acide osmique 1 % dans le liquide de lavage pendant 1h30 à 4°C. Les échantillons sont ensuite déshydratés dans les alcools croissants puis inclus dans l'Epon après des bains intermédiaires d'oxyde de propylène.

Les coupes sériées sont obtenues en taillant le bloc d'inclusion en une pyramide très fine et régulière afin d'obtenir au minimum 25 coupes par ruban. Les grilles utilisées sont soit des grilles à un trou membranées, soit des grilles à barreaux longitudinaux, le ruban étant alors placé parallèlement aux barreaux. Les coupes sont faites à l'aide de l'ultramicrotome "Porter-Blum" MT 1. Elles sont ensuite colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb et observées directement aux microscopes Hitachi HU 11 E ou Jéol 100 CX. Nous avons abandonné l'étape de carbonation des grilles à cause de la perte excessive de définition de l'image.

### B - Cryofracture

Les échantillons sont préparés de la même façon que celle décrite précédemment mais ils sont laissés dans le liquide fixateur jusqu'à ce qu'ils soient repris pour la cryofracture proprement dite. Cependant cette technique a présenté quelques défauts en ce qui concerne la tenue du culot. Aussi avons-nous procédé d'une autre façon. Le sang est recueilli à la queue de la Souris dans un tube capillaire à microhématocrite et centrifugé pendant 10 mn à 4000 g. Le culot est ensuite extrait du capillaire par soufflage. La carotte ainsi confectionnée est plongée dans le liquide fixateur où elle peut



être stockée pendant plusieurs semaines. Les échantillons sont ensuite lavés dans le tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4 et plongés dans un bain de glycérol 30 %, congelés dans l'azote fondant puis fracturés sous vide dans l'unité de cryofracture Balzer BAF 380. Les culots fracturés sont immédiatement recouverts d'un film de carbone-platine sous un angle de 30° puis d'un film de carbone support (2nm de Pt-C et 20 nm de Carbone). Les débris organiques sont éliminés par flottaison sur un bain d'eau de Javel. Les répliques sont rincées à l'eau distillée, récupérées sur grilles 200 et séchées. La grille est alors prête à l'observation.

Nous avons également cherché à mettre en évidence les stérois membranaires. Pour ce faire, un bain intermédiaire de 30 minutes dans la filipine a été fait avant le bain de glycérol.

Les différentes techniques ont été réalisées grâce à l'aide du Dr TORPIER G., I.N.S.E.R.M. U. 167.

## II - ETUDE CYTOCHIMIQUE

Cette étude a pour but de rechercher l'activité d'enzymes responsables de la dégradation de composants cellulaires.

### A - Recherche de la phosphatase acide

La technique employée est celle de GOMORI (1952) modifiée par MILLER et PALLADE (1964) pour la microscopie électronique.

Le sang est prélevé à la queue de la Souris puis fixé pendant 10 mn à température ambiante dans du glutaraldéhyde 2,5 % dans du tampon phosphate 0,2 M pH 7,2. Après centrifugation, les culots sont lavés soigneusement par resuspension dans du tampon phosphate 0,2 M pH 7,2, dans plusieurs bains successifs. L'incubation se fait dans le milieu suivant :

10 ml de  $\beta$ -glycérophosphate de sodium à 2 % ajusté à pH 5 par HCl N.

10 ml d'eau bidistillée

10 ml de tampon citrate-phosphate 0,2 M pH 5

20 ml de  $Pb(NO_3)_2$  à 0,5 % (préparé dans l'eau et additionné goutte à goutte au milieu)

Les témoins sont préparés par omission du substrat.

L'incubation se poursuit pendant 15 - 30 - 45 - 60 mn à 37°C, le milieu ayant été porté au préalable à la température requise. Les différents échantillons sont ensuite lavés dans le tampon citrate-phosphate pendant quelques minutes puis postfixés à l'acide osmique 1 % dans le tampon phosphate 0,2 M pH 7,2 additionné de sucrose 0,15 M, pendant 1h30 à 4°C. L'étape de lavage dans l'acide acétique est omise. L'inclusion se fait de la manière décrite précédemment.

### B - Recherche d'enzymes protéolytiques

Les deux enzymes recherchées sont l'endoarylamidase (endo-protéase) et l'aminopeptidase (exopeptidase). Cette recherche est entreprise conformément à la technique de SELIGMAN (1970).

#### 1 - Préparation des culots

Le sang est prélevé et fixé, selon la technique habituelle, pendant 1 h à température ambiante. Après centrifugation, les échantillons sont lavés par resuspension dans le liquide de lavage composé de tampon cacodylate 0,2 M pH 7,4.

## 2 - Incubation

Pour la recherche de l'aminopeptidase, le milieu se compose de :

0,5 ml de L-Alanyl-4-méthoxy-2-naphthylamide hydrochloride  
(8 mg/ml)  
5 ml de tampon phosphate 0,1 M  
0,5 ml de KCN  $2 \times 10^{-2}$  M  
1,5 ml d'eau bidistillée  
2,5 ml de 4 APH (4-aminophtalhydrazide) fraîchement  
diazotée (2,5 mg/ml).

Pour la recherche de l'endoarylamidase, nous avons modifié le substrat, en collaboration avec les Drs CHARET P. et MOREAU S., par acétylation de la manière suivante : 50 mg du substrat précédent (L-Ala...) est dissous dans 1 ml de pyridine anhydre. La solution est additionnée alors de 300  $\mu$ l d'anhydride acétique. Le mélange est maintenu à température ambiante, à l'obscurité pendant 48 h. Après complète dissolution, la pyridine est évaporée sous vide. La purification est achevée par adjonction de benzène et évaporation. Le composé acétylé cristallise. Ce dernier est au préalable dissous dans quelques microlitres de méthanol avant d'être repris dans de l'eau et additionné des autres produits nécessaires à la confection du milieu d'incubation.

La diazotation de la 4 APH se fait immédiatement avant l'emploi : 12,5 mg de 4 APH sont dissous dans 0,25 ml de HCl 2N froid puis additionnés de 0,25 ml de NaNO<sub>2</sub> à 2 % froid. La préparation est soigneusement mélangée et laissée reposer 5 mn à 4°C après dissolution totale. 0,5 ml d'acétate de sodium à 8,2 % sont alors ajoutés et le pH est ajusté à 5 par addition de soude 4 %. Le volume est complété à 5 ml par de l'eau froide.

Comme l'incubation dure 2 h, et que les milieux se dégradent excessivement vite, il est nécessaire de refaire les produits au bout d'une heure et de changer les bains. Les témoins sont obtenus par omission du substrat dans le milieu d'incubation.

Le lavage, la postfixation et l'inclusion se font selon la méthode habituelle. Les coupes, recueillies sur grille 200 ne sont pas contrastées et sont observées telles quelles.

RÉSULTATS

## I - RAPPEL - CYCLE BIOLOGIQUE DU PARASITE

Avant d'exposer nos résultats, il est utile de rappeler la biologie de *Plasmodium* et de décrire succinctement le stade parasitaire étudié afin de montrer dans quel contexte se situe notre recherche.

### A - Cycle parasitaire naturel

*P. chabaudi* possède un cycle biologique typique de son espèce. Le cycle naturel est complexe et alterne entre un hôte définitif (Rongeur, *Thamnomys rutilans*) et un hôte intermédiaire (Insecte, certainement un *Anopheles* encore inconnu à l'heure actuelle). En nous référant à la figure A, nous pouvons suivre le cycle complet de développement du parasite.

Le sporozoïte, de structure classique, entre dans la circulation sanguine lors de l'inoculation par un moustique infesté et atteint une cellule-cible probablement par chimiotaxie et reconnaissance cellulaire. Cette cellule peut être un hépatocyte ou une cellule du réticulum endothélial. Jamais un sporozoïte ne pénètre une cellule sanguine. Après pénétration, il s'ensuit un développement intracellulaire qui conduit à une schizogonie tissulaire avec division du noyau. C'est la phase exoérythrocytaire. Des mérozoïtes se forment et la cellule-hôte se lyse. Ceux-ci peuvent alors réinfester une nouvelle cellule hépatique et donc réinitier une nouvelle phase exoérythrocytaire ou pénétrer dans les hématies. Ainsi débute la phase intraérythrocytaire ou cycle asexué qui dure environ 24 heures chez *P. chabaudi*.

Lors de la pénétration du mérozoïte, la membrane de l'érythrocyte s'invagine pour former une vacuole parasitophore dans laquelle le parasite va vivre et se développer. Il croît alors très rapidement en un jeune trophozoïte entouré de deux membranes : la membrane interne est son propre plasmalemme, la membrane externe est la membrane de la vacuole parasitophore qui dérive de la membrane plasmique de l'érythrocyte. Le parasite n'est donc pas en contact direct avec le stroma érythrocytaire. Le trophozoïte continue sa croissance et c'est à ce stade qu'intervient l'ingestion puis la digestion de l'hémoglobine dont le mécanisme est l'objet de notre étude. Ce phénomène conduit à l'apparition du pigment typique des *Plasmodium*, l'hémozoïne qui est le produit de dégradation du stroma érythrocytaire. Le trophozoïte âgé prend une forme plus ou moins sphérique tandis que le matériel nucléaire augmente de volume et subit plusieurs divisions. C'est le stade préschizonte. Quand la formation des mérozoïtes est achevée, le parasite prend le nom de

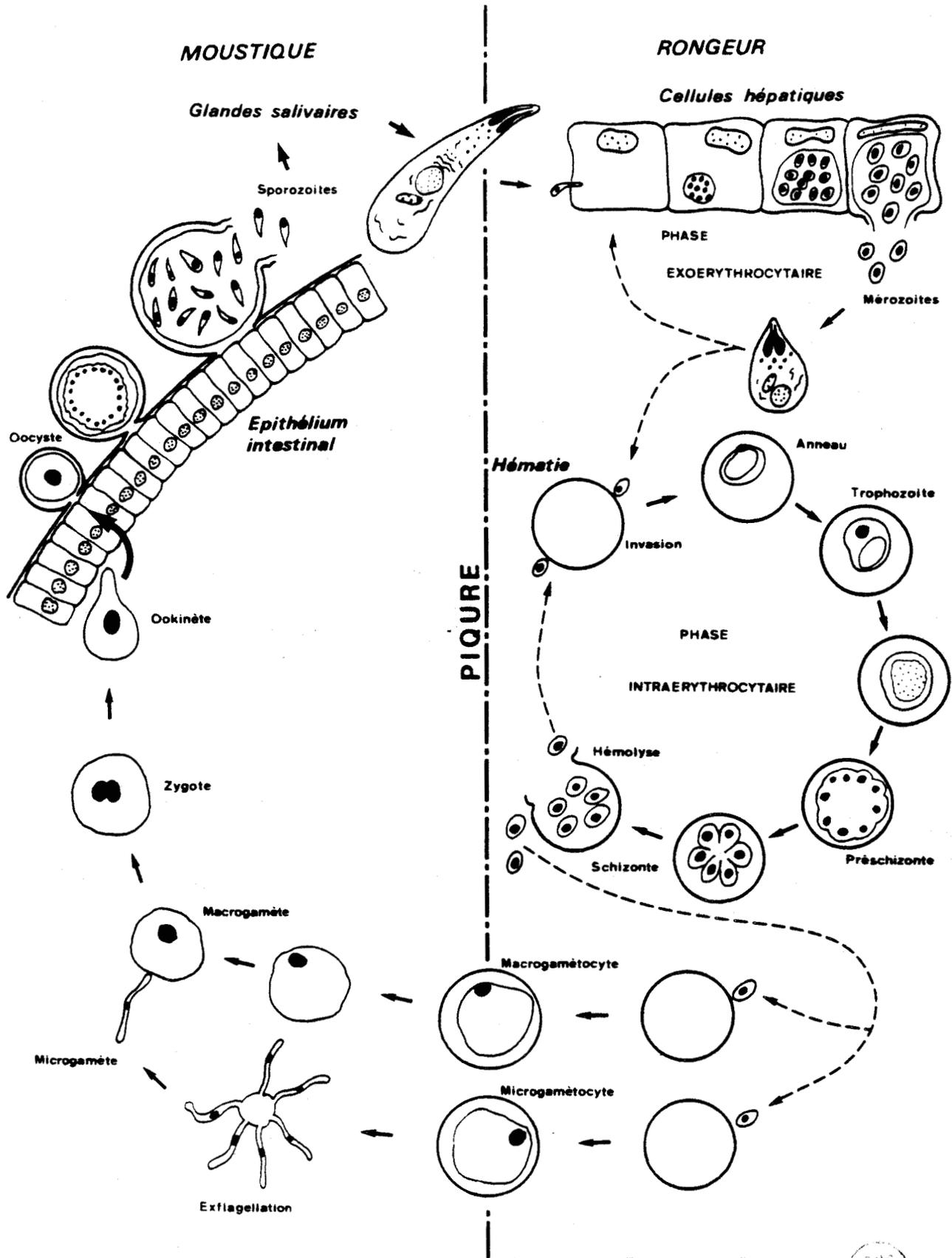


Figure A - Cycle biologique naturel de *Plasmodium chabaudi*.

schizonte. La schizogonie s'achève par l'éclatement de l'hématie (hémolyse) et la libération des mérozoïtes dans le flot sanguin. Ce phénomène correspond à une poussée hyperthermique (fièvre) sans doute provoquée par la libération de toxines dans le sang de l'hôte. Les mérozoïtes ne réinfestent que des hématies (ou des réticulocytes). Une nouvelle schizogonie peut alors débiter ou bien le parasite peut se développer en gamète (gamétocytogenèse).

Le mérozoïte peut se transformer soit en gamétocyte mâle (microgamétocyte) soit en gamétocyte femelle (macrogamétocyte). La durée de cette phase est inconnue. L'évolution parasitaire s'arrête à ce stade et ne reprend que si les gamétocytes sont réaspirés par un nouveau moustique dans l'estomac duquel ils se développent en gamètes (gamétogenèse). Le macrogamétocyte ne se modifie pas beaucoup tandis que le microgamétocyte subit une exflagellation avec division nucléaire multiple et production de plusieurs microgamètes. Ces derniers s'unissent alors avec les macrogamètes pour former les zygotes. Après une période immobile, intervient la fusion nucléaire et le zygote se transforme en ookinète, mobile, qui traverse la paroi intestinale de l'*Anopheles* pour s'enkyster sous la lame basale et devenir un oocyste. Le noyau se divise très activement tandis que la cellule grossit. A la fin de la sporogonie, les sporozoïtes sont libérés dans l'hémolymphe de l'hôte. Ils pénètrent et s'accumulent préférentiellement dans les glandes salivaires de l'insecte où ils attendent une prochaine piqûre grâce à laquelle ils seront réinjectés avec la salive dans la circulation sanguine d'un nouvel hôte et accompliront un nouveau cycle.

Au laboratoire, nous entretenons le cycle parasitaire en recréant artificiellement le cycle intraérythrocytaire ou reproduction asexuée. Nous injectons du sang parasité dans le péritoine d'une Souris saine. Les parasites envahissent alors les hématies saines et réinitient un cycle pendant lequel nous pouvons étudier la croissance du trophozoïte.

#### B - Le trophozoïte

Ce stade cellulaire se caractérise par la phase de croissance du parasite et l'ingestion puis la digestion de stroma érythrocytaire.

Le trophozoïte est généralement polymorphe. Les formes jeunes appelées "anneaux" en raison de leur aspect en microscopie photonique, ont une forme en U ou en fer à cheval sur une section en microscopie électronique, d'où une forme de coupe après reconstitution tridimensionnelle. Au cours de sa croissance, le parasite prend une forme quasi-sphérique, d'environ 2,5  $\mu$  de diamètre. Il vit à l'intérieur d'une vacuole parasitophore qui l'isole du stroma érythrocytaire.

Le noyau est de structure classique mais ne possède pas de nucléole. Sa forme est variable, généralement en forme de coupe chez les stades jeunes, sphérique chez les stades âgés. Le cytoplasme contient de nombreux ribosomes associés ou non au réticulum endoplasmique également abondant. Il n'existe pas d'appareil de Golgi classique, mais des corps multilamellés qui pourraient peut-être en faire fonction bien qu'aucune information précise n'existe à ce sujet. Des organites en forme de vésicules limitées par deux membranes et contenant un matériel amorphe sont parfois considérés comme des mitochondries par certains auteurs. Il n'existe pas de lysosomes.

Le trophozoïte est caractérisé par la présence de nombreuses vacuoles et vésicules quand une seule section du parasite est observée : grandes vacuoles limitées par deux membranes contenant du stroma érythrocytaire, vésicules unimembranaires montrant une matrice éclaircie, ou encore vésicules contenant des cristaux opaques aux électrons (Pl. I, fig. 4). Un orifice percé dans le plasmalemme est également présent : le micropore ou cytostome, souvent en relation avec une vacuole (Pl. V, fig. 4).

Le but de notre recherche est donc l'étude de ce système vacuolaire grâce auquel se fait l'ingestion du stroma érythrocytaire. Nous étudierons d'abord ce système sur le plan morphologique afin de préciser sa localisation dans le temps et dans l'espace.

## II - ETUDE MORPHOLOGIQUE

La première partie de cette étude a porté sur l'organisation interne du parasite grâce à l'observation de sections isolées puis par l'utilisation de la technique de coupes sériées et reconstitution tridimensionnelle.

### A - Organisation interne

#### 1 - Etude détaillée des structures

Mis à part les éléments typiques des *Plasmodium* que nous avons décrits précédemment, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux très nombreuses vacuoles et vésicules présentes dans le cytoplasme parasitaire. Dans un premier temps, nous avons cherché à les classer par type de contenu : deux grandes catégories nous sont ainsi apparues.

##### a - Vacuoles et vésicules à contenu amorphe

Cette catégorie se caractérise par un contenu dont l'aspect est identique à celui du stroma érythrocytaire, c'est-à-dire sans structure définie. Si nous considérons la taille des vacuoles et vésicules, nous pouvons les diviser en trois sous-groupes.

- Grande vacuole : elle est généralement unique chez le trophozoïte et existe dès le stade anneau. Elle a un diamètre d'environ 850  $\mu$ m (Pl. I, fig. 1 ; Pl. VIII, fig. 2, 3). Elle est limitée par deux membranes de type unitaire. Quand le parasite a envahi un réticulocyte, il est fréquent d'observer des mitochondries et des ribosomes appartenant à l'hôte, enfermés dans la vacuole (Pl. I, fig. 1).

- Vacuoles de taille moyenne : leur section est quasi-circulaire (Pl. II, fig. 2, 4, 5, 6 ; Pl. III, fig. 2, 3, 4, 5), d'environ 300  $\mu$ m de diamètre, souvent localisées à la périphérie du cytoplasme parasitaire. Leur nombre est de 2 ou 3 par cellule. Elles sont également limitées par deux membranes de type unitaire.

Dans cet ordre de taille se situent des vacuoles semblables au type précédent tant au point de vue taille (200 à 400  $\mu$ m) que contenu. Cependant, leurs deux membranes sont étroitement accolées et présentent une densification assez importante (Pl. IV, fig. 4).

- Vésicules de petite taille : elles ont un diamètre voisin de 60 à 80  $\mu$ m (Pl. I, fig. 1), sont limitées par deux membranes et contiennent des ribosomes quand le parasite a infesté un réticulocyte. Elles sont toujours accolées à la membrane plasmique parasitaire ou contre la grande vacuole, décrite au début de chapitre, d'où elles semblent bourgeonner (Pl. I, fig. 1).

b - Vacuoles et vésicules à contenu cristallin

Cette catégorie est caractérisée par la présence d'éléments de type cristallin, en plus ou moins grand nombre, à l'intérieur des vacuoles et vésicules. Les vacuoles de taille moyenne (200 à 400  $\mu$ ) contiennent plusieurs cristaux noyés dans une matrice claire, peu dense aux électrons, sans structure définie. Les cristaux sont longs de 150 à 280  $\mu$  et ont une section carrée de 40  $\mu$  (Pl. I, fig. 4). Les vacuoles ne possèdent qu'une seule membrane de type unitaire. Elles sont généralement au voisinage des vacuoles à contenu de type stroma érythrocytaire (Pl. II, fig. 4, 5).

Il existe également des petites vésicules constituées par une membrane unitaire entourant 1, rarement 2 cristaux baignant dans une matrice claire (Pl. I, fig. 4). Leur taille est d'environ 80  $\mu$  et elles sont situées toujours à proximité du plasmalemma parasitaire ou contre la grande vacuole.

Lors de nos investigations, nous avons également observé une catégorie de vacuoles et vésicules de type intermédiaire entre les deux catégories que nous venons de décrire. Leur contenu présente, en effet, à la fois une matrice amorphe et des cristaux. Cependant, la matrice est plus claire que dans la première catégorie et les cristaux moins denses aux électrons que dans la seconde catégorie (Pl. I, fig. 2, 3). De plus, elles ne possèdent qu'une seule membrane unitaire et leur localisation est également périphérique

Devant la diversité de ces structures, il nous est apparu nécessaire de faire des coupes sériées des parasites afin de pouvoir localiser plus précisément tous ces éléments dans l'espace et voir s'il n'existe pas une éventuelle liaison entre-eux.

2 - Examen des coupes sériées et reconstitution tridimensionnelle

Cette étude a été basée sur la technique employée par VIVIER *et al.* (1972) sur *Anthemiosoma garnhami*. Cette méthode consiste à reprendre chaque micrographie de coupe et d'en dessiner les contenus et les éléments intéressants sur des feuilles de papier calque ou de celluloid, puis de superposer les différents profils obtenus. L'épaisseur de la coupe peut être figurée en dessinant les sections sur des plaques de verre. La superposition des dessins conduit à une vue dans l'espace du parasite et permet de concevoir plus précisément son organisation interne.

Nous avons ainsi fait 17 séries d'au moins 25 coupes chacune. Cela nous a permis de faire plusieurs constatations intéressantes et surtout de relier ensemble des éléments qui nous avaient paru disparates au premier abord.

a - Structure de la grande vacuole

En réalité cette vacuole n'en est pas une. Elle possède un orifice qui met en contact le contenu vacuolaire avec le stroma érythrocytaire ou réticulocytaire (Pl. I, fig. 2 ; Pl. V, fig. 1). Cette invagination concerne les deux membranes qui entourent le parasite, c'est-à-dire la membrane de la vacuole parasitophore et la membrane plasmique parasitaire. Ainsi nous pouvons observer que la membrane interne de la "vacuole" est en fait en continuité avec la membrane de la vacuole parasitophore et que la membrane externe est le propre plasmalemma du trophozoïte. L'orifice de cette "vacuole" existe tout au long du développement du parasite, depuis le stade anneau, où il est aussi large que la "vacuole" elle-même, jusqu'au début de la schizogonie où la "vacuole" est résorbée. Le pore a un diamètre moyen de 200  $\mu$ .

b - Mise en évidence d'un tube

Ce tube a été découvert grâce à la superposition des différentes sections des vacuoles de taille moyenne (Pl. II et Pl. III) et reconstitution graphique (Fig. B et C). En effet, les différentes vacuoles que nous avons observées sont en réalité des sections successives d'un tube. Ce dernier s'étend à la périphérie du cytoplasme parasitaire comme le montre la Figure C.

De plus, nous avons remarqué que ce tube est toujours en relation avec le micropore ou cytostome (Pl. II, fig. 6, 7 ; Pl. III, fig. 5). Ce dernier, dont la section est rarement observée lors de sections isolées (Pl. V, fig. 3, 4) a une structure assez difficile à définir. Il semble constitué de deux anneaux concentriques, d'environ 50  $\mu$  de diamètre intérieur et 120  $\mu$  de diamètre extérieur. L'anneau intérieur correspondrait à une densification de la membrane plasmique, ou à une structure dense accolée à cette dernière. L'anneau extérieur est moins dense aux électrons et est accolé au premier. Par le pore créé, passe la membrane de la vacuole parasitophore et vient constituer la membrane interne du tube ; la membrane externe est le plasmalemma du parasite.

Il est également à noter que ce micropore peut être en relation avec une vacuole de taille moyenne limitée par deux membranes dont la provenance est identique à celle que nous venons de décrire (Pl. I, fig. 3 Pl. V, fig. 4).

A l'extrémité du tube, nous pouvons observer la présence de vacuoles dont les deux membranes se sont accolées (Pl. IV, fig. 1, 2, 3, 4). La figure 3 de cette planche montre que le phénomène se produit à partir d'un rétrécissement du tube ce qui nous permet de penser à un bourgeonnement de cette vacuole à partir du tube.

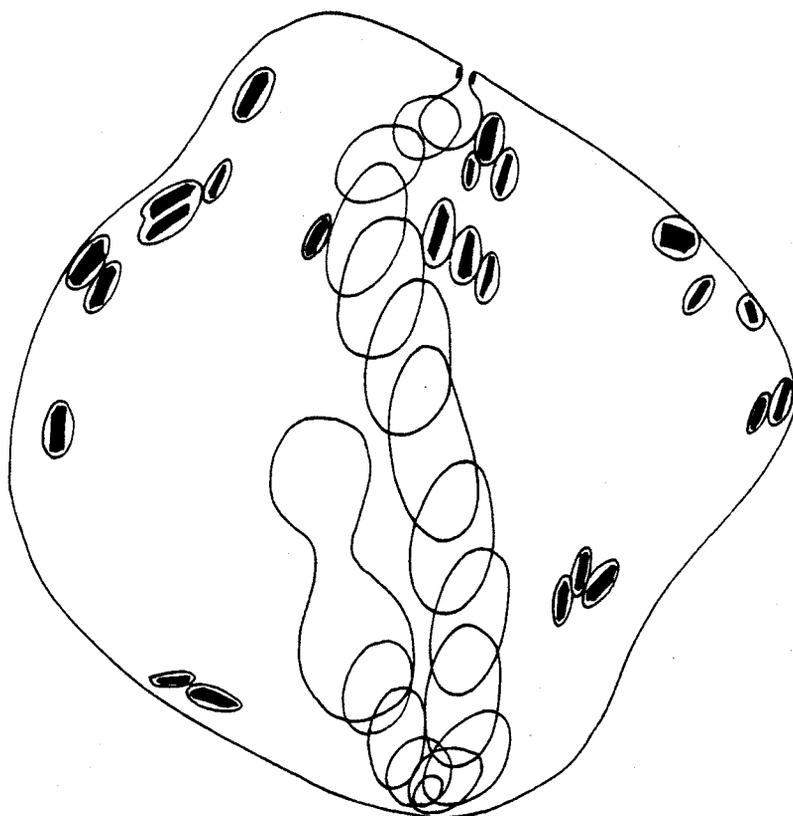
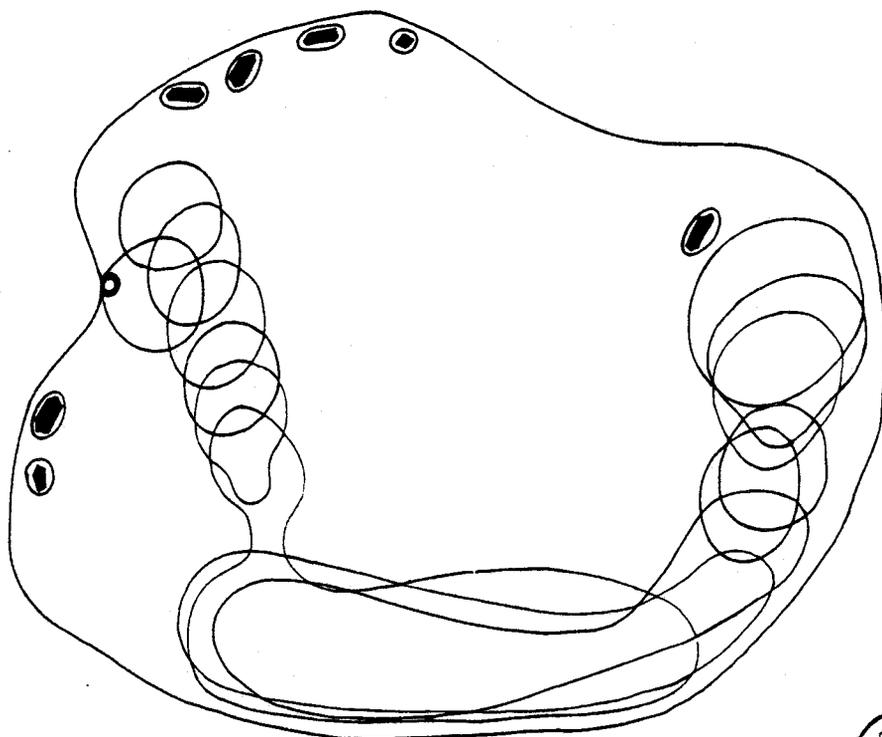


Figure B - Reconstitution graphique de la série de la planche II.



BUS  
LILLE

Figure C - Reconstitution graphique de la série de la Planche III.

### 3 - Interprétation et résumé de l'étude morphologique

A la lumière des différentes observations que nous avons faites, nous pouvons déduire qu'il existe deux grands processus d'endocytose du stroma érythrocytaire chez *P. chabaudi* :

- un système digestif dérivant du cytostome : en relation avec le cytostome, nous trouvons soit une vacuole, que nous appelons vacuole cytotomale, soit un tube, que nous désignerons par tube cytotomal. La concordance de diamètre entre vacuole et tube cytotomaux, leur contenu, ainsi que le rétrécissement qui peut être observé vers la partie proximale du tube (Pl. III, fig. 6), nous ont conduit à penser que ce dernier dériverait de la vacuole par allongement vers la périphérie cytoplasmique. A l'extrémité distale du tube bourgeonneraient des vacuoles dont les deux membranes s'accolent et se densifient.
- un processus de micropinocytose qui prend place à la fois sur la grande vacuole et sur la périphérie du parasite ainsi que sur la vacuole cytotomale (Pl. I, fig. 3). Le phénomène se caractérise par le pincement de petites vésicules limitées par deux membranes, la membrane interne provenant de la vacuole parasitophore, la membrane externe appartenant au parasite.
- les vacuoles et vésicules contenant du pigment, que nous qualifierons de pigmentaires, dériveraient respectivement des deux processus. En effet, la taille et la localisation (proche du tube cytotomal) des vacuoles pigmentaires nous permet cette hypothèse. La même remarque peut être faite à propos des vésicules pigmentaires. Les vacuoles et vésicules de type intermédiaire seraient des structures en évolution, après avoir bourgeonné et s'être détachées, les unes du tube, les autres du plasmalemme. Le processus serait donc le suivant : la vacuole ou vésicule se détache, la membrane interne disparaît, soit par accolement à la membrane externe dans le premier cas, soit par digestion dans le second cas; la matrice s'altère, s'éclaircit tandis que progressivement se forment les cristaux. Le produit final est une vacuole ou vésicule pigmentaire contenant un ou plusieurs cristaux de pigment et limitée par une seule membrane de type unitaire. Nous avons résumé nos hypothèses dans la Figure D.

Nous pouvons faire plusieurs remarques : la grande vacuole correspond en fait à la "vacuole nutritive" ou "food-vacuole" pour les anglosaxons. Cependant elle n'existe pas en tant que telle puisque nous avons vu qu'elle est toujours ouverte. Nous garderons ce terme par convention mais entre guillemets. La "vacuole nutritive" ne serait donc qu'un système permettant d'augmenter la surface de contact entre le parasite et sa cellule-hôte, témoin

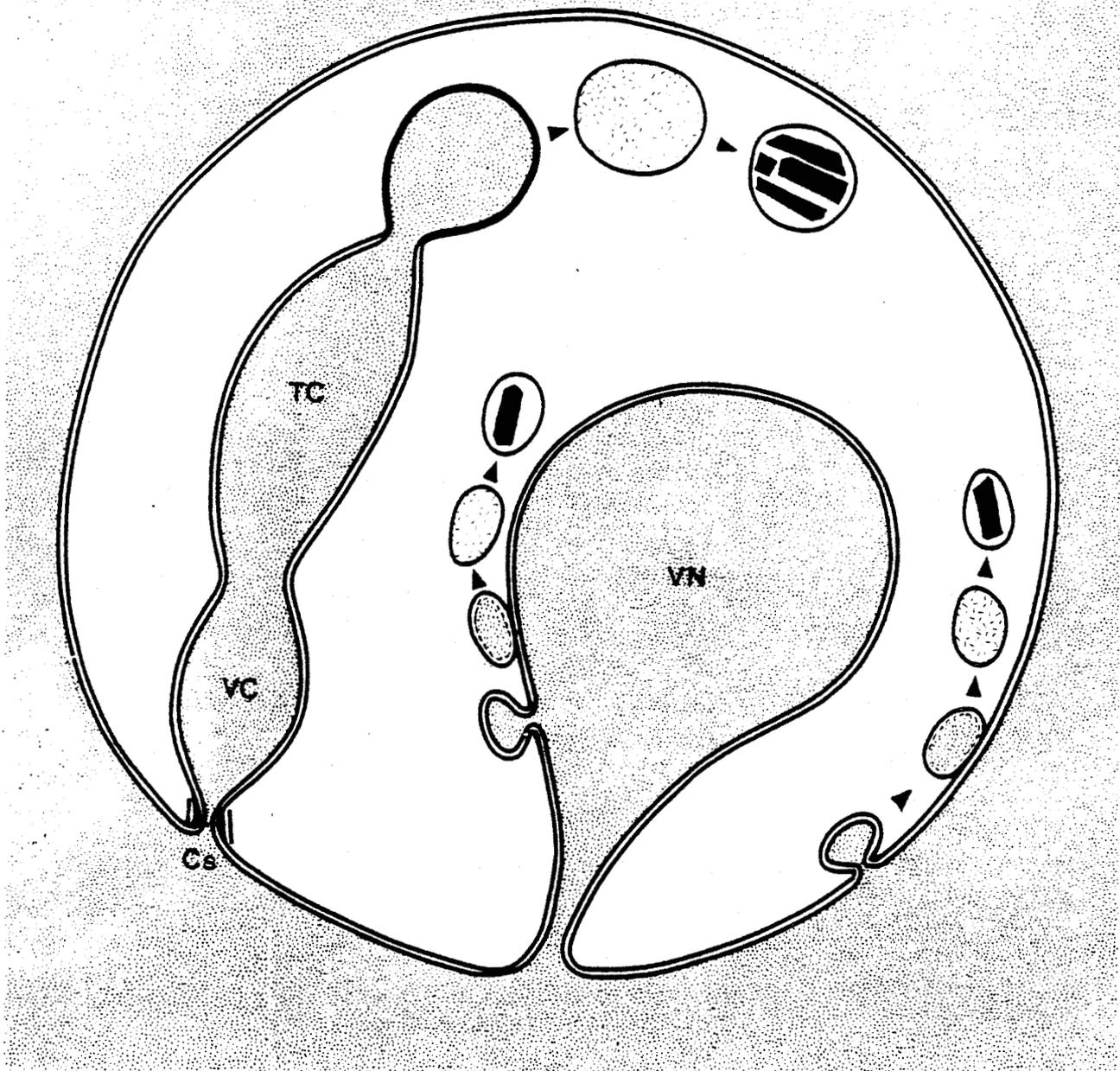


Figure D - Schéma des processus d'endocytose chez *P. chabaudi*.

- . Micropinocytose sur toute la surface de contact parasite-hôte (plasmalemme et "vacuole nutritive") : bourgeonnement de vésicules.
- . Système cytotomal : à partir du cytotome se forme une vacuole cytotomale qui s'étend en un tube cytotomal à la périphérie du parasite. De l'extrémité distale de ce tube, se détachent des vacuoles.

La membrane interne des vacuoles et vésicules disparaît (accolement ou digestion) et le contenu vésiculaire s'altère pour aboutir à un composé final, cristallin, le pigment palustre.

les vésicules de micropinocytose qui peuvent s'y former. Cette invagination augmenterait la surface d'échanges. Les échanges prennent en particulier la forme d'une endocytose de stroma érythrocytaire dans des vacuoles ou des vésicules où celui-ci subit une profonde altération conduisant à la formation du pigment. Comme ce dernier est considéré comme un résidu de dégradation de l'hémoglobine nous pouvons émettre l'hypothèse suivante : la dégradation et la digestion de l'hémoglobine se font dans ces vacuoles et vésicules d'endocytose et non pas dans la soi-disant "vacuole nutritive".

Une dernière remarque concerne le rôle important que semble jouer les membranes lors de l'internalisation du stroma érythrocytaire. Aussi après avoir étudié l'organisation interne du parasite, il nous est apparu nécessaire de suivre plus précisément l'évolution des membranes d'un point de vue structural grâce aux techniques de cryofracture.

## B - Etude des membranes par cryofracture

### 1 - Rappel des conventions

La cryofracture est une technique qui permet de visualiser les différents feuillets constituant la membrane unitaire. Nous avons adopté la nomenclature simple et uniforme proposée par BRANTON *et al.* (1975) pour désigner et décrire les faces de fracture. Nous nommerons le feuillet proche du cytoplasme, nucléoplasme ou contenu vésiculaire, la face "protoplasmique" ou face P ; le feuillet proche de l'espace extracellulaire ou de l'espace exo- ou endoplasmique sera appelé la face (exo- ou endoplasmique (selon le cas) ou face E. Le concept d'espace exoplasmique, comme l'a proposé De DUVE (1969), inclut l'intérieur des vacuoles d'endocytose, des phagosomes, des lysosomes primaires et secondaires, des vacuoles nutritives et des vésicules golgiennes. L'espace endoplasmique désigne les cisternes du réticulum endoplasmique, les cisternes formées entre les membranes interne et externe de l'enveloppe nucléaire et les cisternes formées par les lamelles golgiennes. Le cas qui nous intéresse dans ce travail est donc l'espace exoplasmique.

Il est également nécessaire de préciser que nous travaillons en cryofracture et non en cryodécapage. Ainsi, le fait de savoir si les faces que nous observons sont la surface réelle de la membrane plasmique c'est-à-dire la face directement en contact avec le cytoplasme ou le milieu exoplasmique, n'entre pas en ligne de compte puisque ces surfaces n'apparaissent qu'en cryodécapage.

Nous désignerons donc la membrane plasmique de l'hématie par  $P_H$  et  $E_H$ , la membrane de la vacuole parasitophore par  $P_V$  et  $E_V$ , la membrane plasmique du parasite par  $P_C$  et  $E_C$  (C pour *Chabaudi*), la membrane interne des vacuoles et vésicules par  $P_d$  et  $E_d$  (d pour membrane digérée), enfin la membrane externe de ces dernières par  $P_v$  et  $E_v$  (v pour vésicule). Toutes ces faces sont représentées sur la figure E.

### 2 - Etude des particules intramembranaires

La fracture des membranes biologiques se fait préférentiellement au sein de la zone hydrophobe c'est-à-dire entre les extrémités des acides gras des phospholipides et met en évidence des particules intramembranaires (que nous désignerons par PIM) dont il a été montré qu'elles correspondaient aux protéines intégrales de la membrane. Ces protéines peuvent être soit dans l'un ou dans l'autre feuillet, soit communes aux deux (selon le modèle membranaire universellement adopté de SINGER et NICHOLSON, 1972).

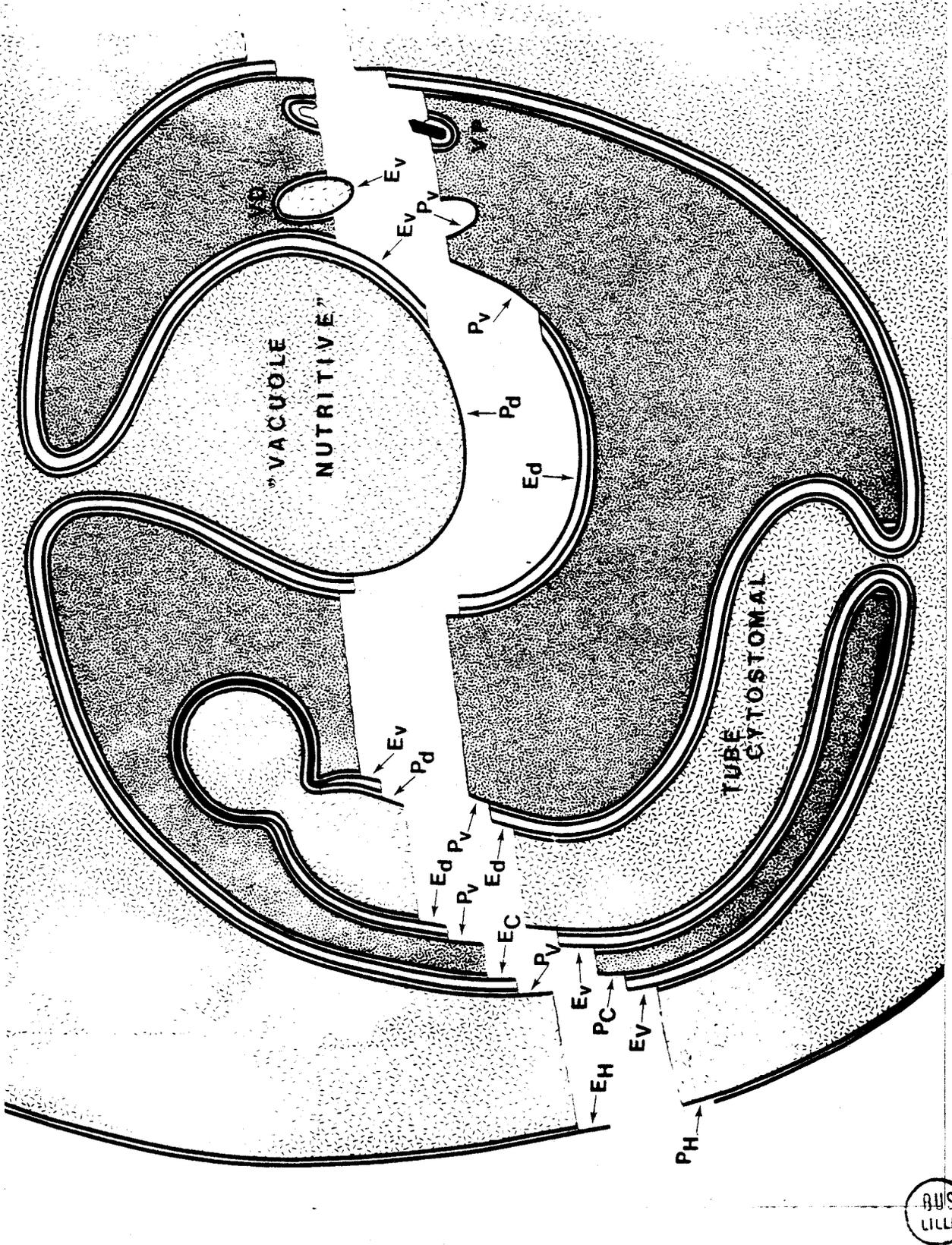


Figure E - Schéma récapitulatif des différentes faces observées lors d'une fracture idéale.

Nous avons vu, dans la première partie de notre étude, que la membrane de la vacuole parasitophore dérive du plasmalemme érythrocytaire. De cette première membrane accolée au plasmalemme du parasite dérivent diverses vacuoles et vésicules. Aussi, nous allons reprendre chaque membrane et l'étudier afin de voir ses caractéristiques et suivre son évolution au cours du cycle parasitaire. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant.

Face de fracture	$P_H$	$E_H$	$P_V$	$E_V$	$P_C$	$E_C$	$P_v$	$P_v$	$P_d$	$E_d$
Nombre de PIM par $\mu^2$ (moyenne)	3500 à 4500	1100	250	150	1500	120	1300	110	0 à 5	0
Rapport P/E	3 à 4		≈ 2		≈ 10		≈ 10		∞	

a - Membrane plasmique de l'érythrocyte

Elle est caractérisée par un grand nombre de PIM (Pl. VI, fig. 1) avec cependant une dissymétrie des deux feuillettes ( $P_H > E_H$ ). Il semble exister des différences entre la membrane plasmique d'une hématie parasitée et d'une hématie saine. De plus, la même remarque peut être faite entre les hématies d'une Souris saine et les hématies saines d'une Souris parasitée. Pour faire cette comparaison, nous avons compté les PIM sur des hématies que nous avons présumées saines quand le plan de fracture ne montrait pas de parasite. Cependant cette méthode présente de grandes incertitudes car le parasite peut être présent et le plan de fracture peut ne pas passer à son niveau. En effet, la cryofracture ne permet que de voir des surfaces et non ce qu'il y a dessous. C'est pourquoi nos résultats présentent autant d'imprécisions. Nous ne considérerons donc que les hématies parasitées, c'est-à-dire où le plan de fracture passe à la fois dans la membrane plasmique et dans le parasite, ce qui est malgré tout assez difficile à trouver.

b - Membrane de la vacuole parasitophore

Cette membrane dérive du plasmalemme érythrocytaire. Il y a encore une différence  $P_v > E_v$  et un rapport P/E légèrement plus faible que dans le cas précédent (Pl. VI, fig. 1). Le nombre de PIM est par contre 10 fois inférieur. Ce nombre de PIM diminue légèrement au fur et à mesure de la croissance du parasite mais pas de façon significative.

c - Membrane plasmique du parasite

La dissymétrie  $P_C > E_C$  existe toujours. Cependant le rapport P/E est nettement plus élevé que chez les membranes précédentes (Pl. VI, fig. 2, 3 et Pl. VII, fig. 1, 2). Il est à noter également que la répartition des PIM n'est pas uniforme sur toute cette membrane. Il existe en effet des zones quasiment nues entourant des dépressions dans la membrane (Pl. VII, fig. 3, 4). La taille de celles-ci peut atteindre 150  $\mu$ . Nous avons pu observer également une diminution du nombre de PIM au cours de la croissance parasitaire. Certaines micrographies montrent le pore de la "vacuole nutritive" ou le cytostome (Pl. VI, fig. 3 et Pl. VII, fig. 2).

d - Membranes des vacuoles et vésicules

La "vacuole nutritive" : elle est facilement reconnaissable en cryofracture de par sa taille (Pl. VIII, fig. 1, 2, 3). Sa membrane externe, c'est-à-dire celle qui appartient au parasite est quasi identique à celle de ce dernier. Le rapport P/E est également très important. Par contre, la membrane interne, donc celle qui appartient à la vacuole parasitophore, présente une disparition totale des PIM sur la face  $E_d$ . Quelques PIM peuvent être observées sur sa face  $P_d$  (Pl. X, fig. 1, 2, 3).

La vacuole et le tube cytostomal : le nombre et la répartition des PIM tendent à être identiques à ceux du type précédent (Pl. X, fig. 2, 4). Cependant, il devient très difficile de distinguer les fractions du tube des vacuoles en cours de bourgeonnement. Il semble que la face  $P_v$  tend à être moins fournie que son équivalent de la "vacuole nutritive". Sur les vacuoles bien formées, les PIM sont absentes et il est alors impossible de les différencier du type suivant, si ce n'est par la taille.

Les vésicules de pinocytose : le nombre de PIM est très réduit et même nul (Pl. IX, fig. 3 et Pl. X, fig. 1, 3). Nous avons rarement observé des fractures passant par des vésicules en cours de formation (Pl. X, fig. 1), ou par des vésicules ayant encore leur deux membranes. Ce stade est d'ailleurs très éphémère. De plus, la taille de ces vésicules est certainement trop petite pour que le plan de fracture passe de façon adéquate. Quand ce dernier passe à travers la vésicule pigmentaire, la forme du cristal peut être observée (Pl. X, fig. 1, 3).

e - Remarques

- Les membranes dérivant du plasmalemma érythrocytaire sont très différentes des membranes appartenant au parasite. En effet, le rapport P/E des premières est de 2 à 4 tandis que les dernières ont un rapport supérieur ou égal à 10. Nous pouvons ainsi conclure que la composition protéique de ces membranes est très différente.

- Le nombre de PIM de la vacuole parasitophore est 10 fois inférieur à celui de la membrane plasmique érythrocytaire dont elle dérive. Lors de sa pénétration, le parasite a donc profondément modifié la membrane dans laquelle il va vivre.

- Il n'y a quasiment pas de différences entre le plasmalemma parasitaire et la membrane externe de la "vacuole nutritive". Nous pouvons donc dire que c'est une seule et même membrane et cela conforte l'hypothèse de l'accroissement de surface.

- Les membranes internes de la "vacuole", du tube et des vésicules de pinocytose subissent une profonde perturbation. Ce sont également des membranes très mobiles puisqu'en cours d'internalisation. Ces changements montrent qu'elles doivent subir l'influence du parasite qui se traduit par une disparition des PIM. Ces constatations peuvent être faites sur les vésicules pigmentaires.

Après avoir étudié l'évolution des protéines de la membrane au cours du cycle parasitaire, nous allons observer la répartition et le devenir des stérois membranaires grâce à la filipine.

### 3 - Les stérois membranaires

Les stérois membranaires sont des constituants lipidiques qui contribuent à la rigidité de la membrane. Ils peuvent être mis en évidence en cryofracture grâce à l'action de la filipine. La filipine est un antibiotique polyénique et est employée comme réactif dans les études biologiques sur la structure membranaire car elle se lie très spécifiquement à certains stérois notamment les cholestérois et les  $\beta$ -hydroxystérois. Cette liaison forme des complexes filipine-stérois. Ceux-ci ont une forme caractéristique "en cratère" et le fait qu'ils altèrent la membrane de façon spécifique permet d'utiliser cet antibiotique pour visualiser les stérois au niveau ultrastructural, en cryofracture. Les protubérances (Pl. XI, fig. 1) ont environ 20 à 25 nm de diamètre. Il est à noter que les complexes provoquent des déformations qui sont asymétriques par rapport au plan de la membrane (ORCI *et al.*, 1980). A la fracture nous aurons donc une succession de creux et de bosses (Fig. F).

Nous considérerons qu'une bosse signifie l'existence de stérois dans le feuillet observé ; par contre le creux sera considéré comme l'empreinte d'une bosse sur le feuillet adjacent donc ne montrant pas de stérois sur le feuillet observé.

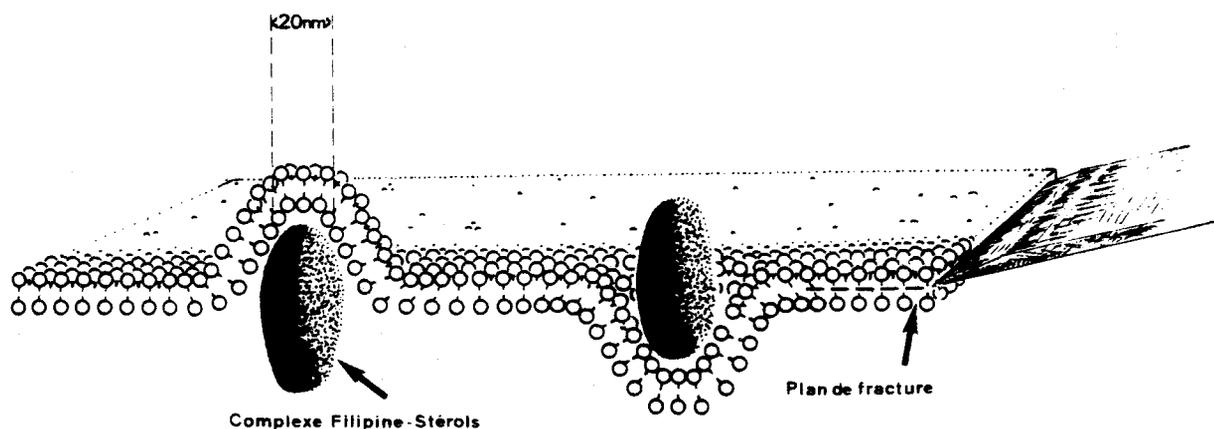


Figure F - Formation et localisation des complexes filipine-stérois en cryofracture.

En observant le nombre et la répartition des protubérances, nous pouvons ainsi étudier l'évolution des stérois au cours de la croissance parasitaire. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant.

Faces de fracture	P <sub>H</sub>	E <sub>H</sub>	P <sub>V</sub>	E <sub>V</sub>	P <sub>C</sub>	E <sub>C</sub>	P <sub>v</sub>	E <sub>v</sub>	P <sub>d</sub>	E <sub>d</sub>
Nombre de protubérances par $\mu^2$	160	100	0 à 320	0 à 300	0	0	0	0	0 à 350	0

a - Membrane plasmique de l'hématie

Nous avons eu les mêmes problèmes de comptage que dans le cas des PIM. Aussi ne donnons-nous ici que les résultats concernant les hématies dont nous sommes sûrs de l'infestation. Les stérois sont régulièrement répartis sur la face P<sub>H</sub> (Pl. XI, fig. 2) ainsi que sur la face E<sub>H</sub> bien qu'il soit plus difficile d'en juger devant le peu de plans de fracture corrects. Les PIM ne semblent pas affectées par la présence des altérations de la membrane.

b - Membrane de la vacuole parasitophore

La répartition des stérois est très variable. Il existe des zones nues (Pl. XI, fig. 3, 4) ou des zones de répartition à peu près régulière des protubérances (Pl. XI, fig. 4). Des agrégats très serrés peuvent

être observés sur la face  $E_V$ . Cependant nous pouvons remarquer qu'ils sont plus rares que sur le feuillet adjacent (Pl. XII, fig. 3) et que le plus souvent, ce sont les empreintes de  $P_V$  qui marquent cette surface (Pl. XI, fig. 3).

c - Membrane plasmique du parasite

La membrane du parasite est remarquable par l'absence totale de lésions, que ce soit sur la face  $P_C$  ou sur la face  $E_C$  (Pl. XI, fig. 3, 4 et Pl. XII, fig. 3). Nous pouvons ainsi remarquer que la répartition des PIM est peu perturbée par le traitement.

d - Membranes des vacuoles et vésicules

Les membranes dérivant de l'hématie montrent des agrégats de lésions (Pl. XIII, fig. 1, 2) uniquement sur la face P. Il existe de nombreuses régions dépourvues de stérols. Les membranes appartenant au parasite ne montrent jamais de protubérances (Pl. XIII, fig. 1). La micrographie de la planche XIII, figure 2 montre une vésicule possédant quelques lésions. Cependant, devant le rapport taille de la vésicule et taille de la lésion, il est très probable que ces bosses soient dues, en fait, à la membrane interne qui boursoufle la membrane adjacente.

e - Remarques

- Comme pour les PIM, il existe une différence très nette de composition entre les membranes dérivant de l'hématie et les membranes appartenant au parasite. Les premières possèdent des stérols tandis que les secondes en sont totalement dépourvues, dans la limite de sensibilité de l'expérience.

- Les faces P sont en général pourvues de plus de complexes filipine-stérols que les faces E. La dissymétrie se retrouve donc comme pour les PIM.

- Il y a une évolution nette de la répartition des stérols des membranes dérivant de l'hématie. Les lésions sont d'abord régulièrement réparties sur le plasmalemma érythrocytaire pour former des agrégats très denses sur les membranes en cours d'internalisation et sur le point d'être dégradées (vacuoles d'endocytose).

- La morphologie des lésions est légèrement différente sur la membrane érythrocytaire où elles sont légèrement arrondies et sur les membranes de la vacuole parasitophore et des dérivées où elles ont nettement la forme "en cratère". Ceci peut montrer une différence de composition des stérols.

#### 4 - Résumé

L'étude en cryofracture des différentes membranes au cours de la croissance du parasite nous a permis de montrer une nette évolution de la composition de celles-ci. En effet, nous avons observé une nette diminution de la densité des PIM qui s'annule sur les vésicules dont le contenu se dégrade. De plus, nous avons montré une augmentation du nombre des lésions dues à la filipine sur les membranes en cours d'internalisation.

La composition des membranes dérivant de l'hématie est nettement différente de celle des membranes appartenant au parasite.

L'internalisation de ces membranes semble donc s'accompagner d'une diminution du taux de protéines parallèlement à une augmentation du taux des stérols. Ces deux phénomènes sont toujours accomplis quand se fait la dégradation de l'hémoglobine.

#### C - Discussion

Le mécanisme de nutrition chez les *Plasmodium* est étudié depuis de nombreuses années. Ces parasites sont connus pour digérer l'hémoglobine de l'hématie-hôte et produire un résidu appelé hémozoïne ou pigment palustre dont la nature chimique a été récemment démontrée comme étant de l'hématine (SHERMA *et al.*, 1960 ; THEAKSTON *et al.*, 1970), ou tout au moins un composé à base d'hématine (MORSELT *et al.*, 1973).

Les auteurs qui, les premiers, ont étudié *Plasmodium*, pensaient que l'hémoglobine devait diffuser à travers la membrane plasmique dans le cytoplasme parasitaire. Cependant cette théorie fut rapidement éliminée avec l'avènement de la microscopie électronique qui montra que le parasite se nourrissait par un système d'endocytose. Ce furent FULTON et FLEWETT (1956) qui démontrèrent que les trophozoïtes envacuolisaient de larges portions de stroma érythrocytaire dans lequel ils vivent. Mais ce sont RUDZINSKA et TRAGER (1957) qui ont appliqué le terme "phagotrophie" à ce type de nutrition et ont montré également la provenance du pigment chez *P. lophurae*, puis chez *P. berghei* (1959). Dès lors, nombreux sont les auteurs qui ont confirmé cette théorie basée sur l'observation de grandes vacuoles limitées par deux membranes et contenant de l'hémoglobine (vacuoles nutritives).

Chez *P. chabaudi*, SCALZI *et al.* (1968) ont décrit une grosse vacuole unique chez les jeunes stades alors que KILLBY *et al.* (1969) ont noté plusieurs petites vacuoles chez les stades âgés. Notre propre étude, utilisant la technique des coupes sériées puis la reconstitution tridimensionnelle, nous permet d'affirmer que cette large invagination ne forme pas une vraie vacuole nutritive car elle ne se ferme jamais. Le mécanisme de formation de cette

"vacuole" est difficile à démontrer étant donné la taille respective du parasite et de la "vacuole". Celle-ci se formerait dès le stade anneau par englobement d'une fraction de stroma érythrocytaire à l'aide de pseudopodes (témoin la mitochondrie piégée par le mouvement du parasite qui a infesté un réticulocyte, Pl. I, fig. 1) plutôt que par invagination des deux membranes par un pore et accroissement de la "vacuole". Nous sommes donc en faveur de l'hypothèse de COX *et al.* (1966) qui proposent que cette "vacuole" augmente simplement la surface de contact, donc d'échanges entre le parasite et sa cellule hôte. Cependant, il semble exister des différences entre les espèces de *Plasmodium*, notamment entre les espèces aviaires et les espèces mammaliennes. Dans le premier cas, la digestion de l'hémoglobine se ferait dans la vacuole nutritive qui semble être fermée et où se forment des cristaux pigmentaires (RUDZINSKA *et al.*, 1957, 1961, 1965 ; RISTIC *et al.*, 1964 ; AIKAWA *et al.*, 1966 ; LANGRETHE 1976 ; AIKAWA, 1977). Dans le second cas la dégradation a été supposée extravacuolaire (RUDZINSKA *et al.*, 1959, 1960 ; FLETCHER *et al.*, 1962 ; AIKAWA *et al.*, 1964, 1966, 1974 ; PETERS *et al.*, 1965 ; COX *et al.*, 1966 ; TRAGER *et al.*, 1966 ; SEED *et al.*, 1976). En effet, un processus de pinocytose a été pressenti pour la première fois par RUDZINSKA *et al.* (1960) chez *P. berghei* dont le mécanisme présentait le pincement de petites vésicules à partir de la "vacuole nutritive". Chez *P. chabaudi*, nous avons vu ce phénomène prendre place tout autour de la "vacuole" mais aussi sur toute la périphérie du parasite, donc sur toute la surface d'échanges hôte-parasite. Cela confirme l'hypothèse de COX *et al.* et donc explique pourquoi la "vacuole" n'est pas fermée.

Un deuxième mécanisme d'endocytose a été découvert : AIKAWA *et al.* (1966) puis RUDZINSKA *et al.* (1968) ont observé une structure annulaire, le micropore, qui est une différenciation du plasmalemme parasitaire. Il était déjà décrit chez les autres Sporozoaires et a d'abord été appelé micropyle par GARNHAM (1960, 1962) chez les sporozoïtes de *P. gallinaceum* et *Lankestrella garnhami*, mais selon une fausse interprétation. Il pensait effectivement que cette structure était l'orifice de sortie du parasite. VIVIER *et al.* (1964) ont alors soupçonné l'intervention de cet élément soit dans la nutrition selon un processus pinocytose-phagocytose, soit dans l'excrétion. Aussi ont-ils préféré le terme de micropore, sans préjuger de la fonction. Ce fut finalement CHEISSIN *et al.* (1965) qui l'appelèrent "ultracytostome" sans pouvoir cependant apporter la preuve de son rôle dans la nutrition. Le terme de micropore sera donc employé tant que sa fonction dans un processus d'endocytose n'est pas montrée. Bien que le micropore puisse être observé chez de nombreux groupes de Sporozoaires (SCHOLTISECK *et al.*, 1970) où sa structure est relative-

ment comparable (VIVIER *et al.*, 1970 ; PORCHET *et al.*, 1971), rares sont les espèces où la fonction nutritive a été clairement définie. A part les *Plasmodium*, certaines preuves ont pu être apportées chez les *Eimeria* notamment par RILEY (1969) puis par STROUT *et al.* (1970) chez *E. tenella* où des vacuoles nutritives ont été vues en relation avec le micropore. Chez ces groupes, le terme de cytostome peut être justifié et c'est ainsi que nous dénommerons le micropore de *P. chabaudi* chez qui nous avons montré qu'il est à l'origine d'un véritable système digestif. Comme chez les autres *Plasmodium* (selon la revue de synthèse de SINDEN, 1978), le cytostome serait constitué de deux anneaux concentriques à travers lesquels s'invaginent les deux membranes interne et externe. Il semble être unique chez *P. chabaudi* bien que deux structures de ce type aient été décrites chez *P. vinckei* par THEAKSTON *et al.* (1968). Nous ne pouvons préciser s'il apparaît *de novo* comme le prétend LADDA (1969). Nous avons décrit qu'une vacuole naît du cytostome et s'allonge en un tube cytostomal, limité par deux membranes, qui s'étend à la périphérie du cytoplasme cellulaire. Ce phénomène semble, à notre connaissance, être tout à fait spécifique de ce parasite car aucun auteur ne l'a jamais montré ailleurs. Certains auteurs ont cependant remarqué la présence de petites vacuoles de section circulaire (KILLBY, 1969, chez *P. chabaudi* en particulier) dans le cytoplasme du parasite. Personne n'a pourtant vu que c'étaient, en réalité, des sections d'un seul et même tube contourné, comme nous l'avons montré.

Ces deux processus qui coexistent chez *P. chabaudi* s'accompagnent d'un profond remaniement membranaire comme tend à le montrer notre étude en cryofracture. Les travaux de cryofracture sur les Sporozoaires n'ont débuté qu'assez récemment. Les premières études sont apparues avec MESZOELY *et al.* (1972) sur *P. gallinaceum*, puis SEED *et al.* (1973) sur différentes espèces de *Plasmodium*. De nombreux travaux ont porté sur le germe infectieux ou le sporozoïte de *Sarcocystis* et *Toxoplasma* (PORCHET *et al.*, 1977), *Eimeria* (DUBREMETZ *et al.*, 1978), *P. yoelii* (DUBREMETZ *et al.*, 1979). Rares sont les études qui ont porté plus précisément sur les membranes du trophozoïte ou des autres stades intraérythrocytaires. Aussi n'avons-nous que peu d'éléments de comparaison.

L'invasion du globule rouge (BANNISTER, 1977) s'accompagne d'un profond bouleversement des membranes. Le remaniement membranaire débute dès la pénétration du mérozoïte (LANGRETH, 1977 ; AIKAWA *et al.*, 1981). Nous avons effectivement noté que la membrane de la vacuole parasitophore possède moins de PIM que le plasmalemma de l'érythrocyte dont elle dérive. De plus, la répartition des stérols est fortement modifiée. Au cours du développement du

trophozoïte, le nombre de PIM diminue encore légèrement contrairement à ce qu'ont affirmé Mc LAREN *et al.* (1979) chez *P. knowlesi* où la densité de PIM réaugmente au stade schizonte, ce qui a été considéré par ces auteurs comme une synthèse de protéines nouvelles par le parasite pour la vacuole parasitophore. Nous nous permettons de critiquer ces résultats car il est extrêmement difficile de reconnaître avec certitude le stade d'un parasite en cryofracture. C'est pourquoi nos propres résultats ne sont en fait qu'une moyenne de différents comptages. Nous n'avons pas fait non plus de calculs statistiques (écart-type, variance,...) car ils se sont avérés totalement inexploitable. Des travaux que nous sommes actuellement en train d'effectuer cherchent à apporter une solution à ce problème en essayant de séparer les parasites en fonction de leur stade puis de faire l'étude statistique sur un stade bien précis et connu. Nous pensons cependant que chez *P. chabaudi*, la membrane de la vésicule parasitophore est quasiment inerte et suit simplement l'accroissement du parasite. Le plasmalemme du trophozoïte voit son nombre de PIM diminuer de façon peu significative, ce qui tend à montrer que cette membrane reste bien vivante et croît en surface en même temps que le parasite croît en volume. La répartition des PIM est régulière et aléatoire, non pas réticulée comme l'ont décrit MAZEN *et al.* (1975) et Mc LAREN *et al.* (1977). Cependant, nous avons remarqué des zones nues entourant des dépressions de la membrane. Celles-ci sont probablement le lieu de formation des vésicules de pinocytose qui ne possèdent plus de PIM. C'est l'inverse qui se produit chez la cellule musculaire lisse comme l'ont montré ORCI *et al.* (1973). La disparition des PIM serait due à une baisse du pH intravésiculaire comme l'a observé ALLEN (1976) dans les vacuoles digestives de *Paramecium*. La disparition des PIM s'accompagne d'une hausse du nombre de lésions dues aux complexes filipine-stéroïls, donc à une augmentation du taux de stéroïls membranaires. Ce phénomène ne s'observe que sur des membranes destinées à disparaître. Selon ELIAS *et al.* (1979) et ROBINSON *et al.* (1980), l'altération du contenu en cholestérol influence la perméabilité, la fluidité et l'activité enzymatique des membranes cellulaires. Nous avons constaté que cette altération ne touche que les membranes internes des vésicules ou vacuoles qui disparaissent soit par digestion chez les vésicules de pinocytose, soit par accolement chez les vacuoles bourgeonnant à partir du tube cytostomal. Ces remaniements conduisent à la formation d'une vésicule ou vacuole unimembranée et ce n'est qu'à ce moment que le contenu commence à s'altérer. Le processus se déroule de la même façon dans les deux cas : la matrice s'éclaircit tandis qu'apparaissent progressivement les cristaux d'hémozoïne qui se densifient. L'altération du

contenu achevée, la vésicule reste inerte et aucune modification ne l'affecte plus. A aucun moment nous n'avons vu la fusion de lysosomes secondaires sur ces vésicules pour former des phagolysosomes comme l'ont observé STERLING *et al.* (1973) chez un *Plasmodium* aviaire. Le pigment final est considéré comme un résidu de dégradation de l'hémoglobine bien que MOORE *et al.* (1974) l'aient considéré comme un composé d'excrétion. Le vieux trophozoïte montre donc un cytoplasme rempli de vésicules pigmentaires produites par deux systèmes d'endocytose qui ont coexisté tout au long de la croissance parasitaire ; la micropinocytose a cependant précédé le second processus car elle apparaît dès le stade anneau. C'est en opposition avec SCALZI *et al.* (1968) qui pensent que la pinocytose n'existe que chez les jeunes stades et est remplacée par le cytotome chez les stades âgés. Une preuve en notre faveur est la superposition de la micropinocytose sur la vacuole cytotomale comme l'a observée également HOWELLS (1969).

La somme de ces observations nous a conduit à formuler l'hypothèse suivante : la dégradation de l'hémoglobine se fait dans les vésicules et vacuoles d'endocytose, après que la membrane interne se soit modifiée et ait disparu. Une étude cytochimique s'avère donc nécessaire pour nous permettre de vérifier cette théorie.

### III - ETUDE CYTOCHIMIQUE

Après avoir étudié et discuté les processus morphologiques de l'endocytose, nous allons examiner la digestion de l'hémoglobine d'un point de vue cytochimie ultrastructurale.

Dans une cellule, les agents responsables de la dégradation des composants cellulaires sont les enzymes. Nous allons donc essayer de mettre en évidence l'activité de certaines enzymes en les faisant agir sur des substrats spécifiques. Lors de l'étude morphologique, nous n'avons pas observé de vésicules de type lysosomes venir s'accoler aux vésicules d'endocytose pour former des phagolysosomes. Cependant, afin de vérifier cette absence, nous avons tenté de détecter une enzyme liée à la notion de lysosome, c'est-à-dire la phosphatase acide qui libère les groupements phosphates d'esters phosphatés. Ensuite, nous avons cherché à visualiser les sites d'action d'enzymes spécifiques de la dégradation de gros peptides. Elles font partie de la famille des protéases et sont l'endoarylamidase qui est une endoenzyme (elle coupe à l'intérieur de la chaîne peptidique), et l'aminopeptidase qui est une exoenzyme (elle découpe la chaîne peptidique à partir de l'extrémité de celle-ci et donc libère des acides aminés un par un).

#### A - Phosphatase acide

Par la technique employée nous n'avons pu mettre en évidence cette enzyme. Il ne semble donc pas exister de phosphatase acide chez *P. chabaudi*, ce qui confirme l'absence de lysosomes. La réaction est positive sur les plaquettes (Pl. V, fig. 5).

#### B - Enzymes protéolytiques

##### 1 - Mise en évidence de l'aminopeptidase

Nous désignerons cette enzyme par AP.

##### a - Principe

.....

Le principe de la détection est résumé sur le graphique suivant (figure G)

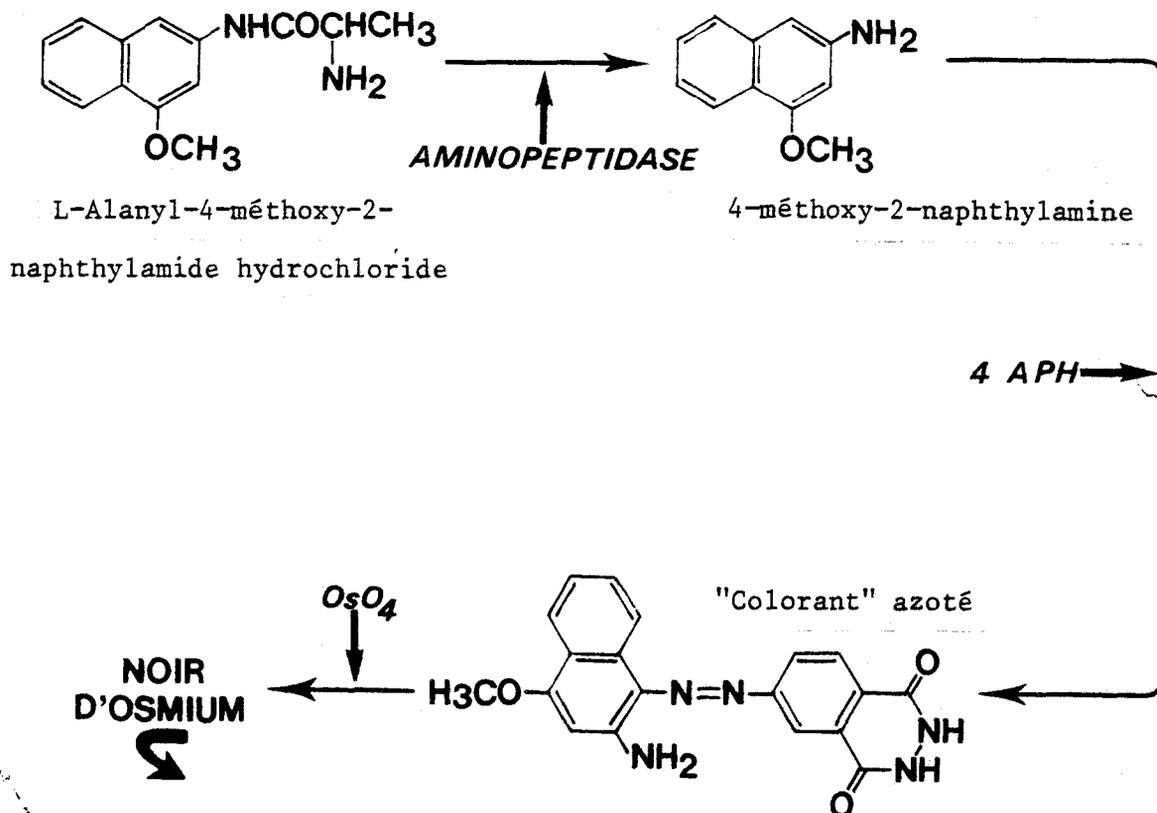


Figure G - Principe de la réaction de mise en évidence de l'activité protéolytique.

L'action de l'enzyme sur un substrat spécifique libère un résidu qui est couplé ensuite avec le 4 APH fraîchement diazoté pour former un colorant azoïque hydrophobe, lipophobe mais fortement osmiophile. Aussi, lors de la postfixation, l' $OsO_4$  se lie à ce colorant pour former un composé, le noir d'osmium, qui précipite. Le précipité est très dense aux électrons donc facilement repérable en microscopie électronique. Cette réaction est très spécifique et permet de localiser très précisément le site d'action de l'AP recherchée.

#### b - Résultats

Le marquage de l'activité AP est très intense chez le parasite. Des précipités très fins sont visibles chez les très jeunes stades (Pl. XIV, fig. 1) au niveau du cytoplasme. Ils sont répartis de façon éparse mais semblent se superposer aux ribosomes dont ils ont la taille. Quand apparaissent les vésicules de pinocytose, le marquage forme tout d'abord un très fin liseré à la périphérie de celles-ci (Pl. XIV, fig. 1, 2). Le précipité recouvre finalement la totalité du contenu de la vésicule et est alors très intense (Pl. XV, fig. 3). Il existe par contre des vésicules non marquées, mais ce sont essentiellement des vésicules pigmentaires (Pl. XV, fig. 2) dont le pigment est en fin de formation. Chez les trophozoïtes âgés, le marquage cytoplasmique est très faible (Pl. XIV, fig. 3) ou inexistant.

Au cours de cette recherche, nous avons pu remarquer un marquage très net de la membrane plasmique de l'érythrocyte (Pl. XIV, fig. 3 ; Pl. XV, fig. 1, 3 ). Des précipités très intenses sont également observés dans le cytoplasme de macrophages (Pl. XVIII, fig. 5) ou dans les réticulocytes (Pl. XVIII, fig. 6) où ils possèdent une répartition identique à celle des ribosomes.

## 2 - Mise en évidence de l'endoarylamidase

Cette enzyme sera désignée par EAA. Le principe de mise en évidence est identique à celui de l'AP (voir Fig. G).

L'intensité générale du marquage est faible. Cependant, un léger précipité peut être observé au niveau du cytoplasme du parasite où il se superpose aux ribosomes. Des vésicules de pinocytose sont également marquées (Pl. XVI, fig. 1, 2 ). Les cristaux sont marqués très fortement au début de leur évolution (Pl. XVI, fig. 2).

Nous avons pu également noter des grains de précipité dans le stroma érythrocytaire (Pl. XVI, fig. 1, 4).

## 3 - Témoins

Les témoins ont été faits en mettant le substrat dans le milieu d'incubation. Aucun précipité n'a été observé ni dans le cytoplasme, ni dans les vésicules d'endocytose (Pl. XVI, fig. 3 ). Cette micrographie montre la légère osmiophilie des cristaux bien formés.

Comme nous nous sommes posé le problème de la spécificité et de la validité de notre expérience, nous avons cherché des témoins internes dont la richesse en enzymes protéolytiques est parfaitement reconnue et démontrée. Le premier témoin est le leucocyte ou plus exactement le macrophage. Nous avons vu que la réaction est positive chez ce dernier. Nous avons ensuite testé notre technique, en parallèle avec *Plasmodium*, sur un autre Hématozoaire qui vit dans les mêmes conditions, *Babesia hylomyisci*. Ce parasite a été étudié biochimiquement par divers auteurs (WRIGHT *et al.*, 1973; AISSI *et al.*, 1981 ) qui ont montré qu'il possédait de l'AP mais pas d'EAA. Nos résultats sont conformes à ces observations : le cytoplasme de *Babesia* montre des précipités lorsque la réaction de mise en évidence de l'AP a été faite ; aucun marquage n'existe dans ce parasite lors de la recherche d'EAA. Par contre, un précipité correspondant à l'EAA peut être observé dans le stroma érythrocytaire (Pl. XVIII, fig. 1, 2, 3 ). Les témoins blancs ne font voir aucun marquage (Pl. XVIII, fig. 4).

#### 4 - Résumé

La recherche d'enzymes protéolytiques nous a permis de montrer que l'AP et l'EAA existent chez *P. chabaudi* et semblent suivre la même évolution; l'activité se localise au niveau cytoplasmique où elle décroît au fur et à mesure du développement du trophozoïte. Elle disparaît chez les stades âgés. La réaction est d'abord faible dans les vésicules d'endocytose puis elle croît progressivement jusqu'à devenir très intense. Quand apparaissent les cristaux de pigment, son intensité décroît et devient nulle lorsque le pigment est bien formé.

#### C - Discussion

Pour croître, les parasites doivent se nourrir à partir de l'hôte qui les héberge, à défaut de posséder des réserves propres. Ce problème se pose pour les *Plasmodium*. N'ayant pas de réserves de quelque type que ce soit, ils sont obligés de prélever les nutriments à l'extérieur, c'est à-dire soit du globule rouge qu'ils parasitent (ou de l'hépatocyte lors du cycle exoérythrocytaire) soit du plasma sanguin. Ces deux voies ont été examinées par de nombreux auteurs.

La voie extracellulaire fait appel à ce qui a été nommé "fenêtre métabolique" ou "metabolic window" pour les anglosaxons. Les *Plasmodium* seraient capables de modifier la membrane cellulaire de l'hôte de manière à faciliter les échanges métaboliques avec le milieu extracellulaire (AIKAWA *et al.*, 1964 ; HOWELLS *et al.*, 1968 ; KILLBY *et al.*, 1969 ; LADDA, 1969 ; BODAMMER *et al.*, 1973). Cependant, cette formation pourrait bien être de nature artéfactuelle (COX *et al.*, 1966) ou d'origine dégénérative comme peut le suggérer l'accroissement du nombre de ces structures lors d'un traitement par la chloroquine (MACOMBER *et al.*, 1967 ; HOWELLS, 1970). N'ayant pas observé de telles structures chez *P. chabaudi*, nous penchons donc pour la théorie artéfactuelle et n'envisageons pas cette voie.

La voie intracellulaire que nous avons étudiée nécessite l'utilisation du stroma de l'érythrocyte par le parasite. Or HOMEWOOD (1980) a montré que le contenu en hémoglobine des cellules infestées décroît durant la période de développement du parasite, ceci selon les espèces étudiées. *Plasmodium* utilise donc en partie l'hémoglobine pour l'incorporer à ses propres protéines. Cependant, cette grosse molécule doit être d'abord dégradée pour obtenir des acides aminés. Le parasite doit donc posséder des enzymes capables de digérer la globine, qui avec l'hème compose l'hémoglobine. Ces constatations et l'étude morphologique de l'endocytose nous ont poussé à rechercher les activités enzymatiques.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité phosphatasique acide, enzyme témoin des lysosomes. Ceci est en accord avec les travaux de SCORZA *et al.* (1972) et LEVY *et al.* (1973) mais en contradiction avec les résultats de AIKAWA *et al.* (1971) chez *P. berghei* et *P. gallinaceum*. Dans le sang, la phosphatase acide se retrouve dans les leucocytes, notamment les mononucléaires et les macrophages ainsi que dans les plaquettes (SEEMAN, 1967 ; WETZEL *et al.*, 1967) ; ce que nous avons retrouvé. L'absence de détection d'une telle enzyme chez *P. chabaudi* pose un problème de spécificité de la réaction. En effet, il existe beaucoup d'agents inhibiteurs qui peuvent influencer sur la réaction. JANIGAN (1965) a montré que le choix de l'aldéhyde dans le fixateur joue un grand rôle. La qualité du glutaraldéhyde a une action sur le marquage (SABATINI *et al.*, 1963 ; FAHIMI *et al.*, 1968). Le meilleur glutaraldéhyde (distillé) inhibe encore l'activité de 50 %. Selon HOURDRY (1974), se pose le problème de la visualisation des précipités opaques aux électrons. En effet, il existe plusieurs phosphatases acides dont les isoenzymes diffèrent par leur pH et leur température optimaux d'action. La phosphatase peut également se trouver sous une forme inactive parce que liée à des composants membranaires. Cependant, chez *P. chabaudi*, l'absence de lysosomes concorde avec l'absence de marquage. Cela favorise l'hypothèse de l'inexistence de phosphatase acide. Un autre argument en cette faveur peut être celui de l'inutilité d'une telle enzyme : celle-ci est en effet incapable de dégrader l'hémoglobine, principale source de nourriture du parasite.

La dégradation de la grosse molécule qu'est la globine nécessite l'intervention d'enzymes protéolytiques hydrolysant les liaisons peptidiques : des endoprotéases qui coupent à l'intérieur de la chaîne peptidique donc découpent la protéine en peptides, puis des exopeptidases qui découpent les peptides en acides aminés à partir d'une extrémité. L'EAA et l'AP sont des protéases faisant respectivement partie de ces catégories et dont la présence a été démontrée biochimiquement chez *Plasmodium* (CHARET *et al.*, 1980 ; AISSI *et al.*, 1982). Le but de notre étude était donc de localiser avec précision le lieu de dégradation de l'hémoglobine afin de vérifier nos hypothèses précédemment émises. Nous avons donc fait agir les enzymes sur un substrat spécifique en vue de la production d'un composé facilement repérable en microscopie électronique. Comme dans le cas de la phosphatase acide, le choix du fixateur était important. MONIS *et al.* (1965) ont montré que le glutaraldéhyde est le meilleur moyen de fixation, et bien que fortement inhibée, l'activité protéolytique est suffisamment bien préservée pour son étude cytochimique. Plusieurs essais de substrats ont été faits sans résultats satisfaisants. L'adaptation des travaux de BURSTONE *et al.* (1956)

pour la microscopie électronique n'a pu être menée à bien du fait de l'impossibilité d'obtenir des résidus opaques aux électrons. NACHLAS *et al.* (1956, 1960) ont mis au point une technique de couplage de sels de cuivre mais sans avoir une résolution satisfaisante. La tentative de couplage de sels d'osmium de RUTENBURG *et al.* (1969), après que HOLT *et al.* (1966) en aient montré l'importance, a grandement amélioré la résolution mais s'est alors posé le problème de diffusion des résidus et de la spécificité. Le même problème nous est apparu avec la technique de ADNET *et al.* (1973). Finalement, la meilleure méthode s'est révélée être celle de SELIGMAN *et al.* (1970) qui, bien que complexe dans sa réalisation, a conduit à la production de résidus terminaux insolubles dans l'eau donc non diffusibles, lipophobes et osmiophiles. Nos témoins internes ont montré la spécificité de la réaction : les macrophages sont fortement marqués, or il a été démontré par ailleurs qu'ils contiennent beaucoup de protéases. Nous avons de plus effectué des travaux en parallèle avec *Babesia hylomyisci* (1982) qui ont confirmé les études biochimiques effectuées par WRIGHT *et al.* (1973) et AISSI *et al.* (1981). L'AP existe bien chez les Piroplasmés et non l'EAA. Un autre témoin de la spécificité de la réaction est le marquage de la membrane plasmique de l'érythrocyte dont PENNEL (1974), parmi d'autres, a montré la richesse en enzymes protéolytiques.

Nos résultats nous permettent donc de préciser l'évolution de la dégradation de l'hémoglobine chez *P. chabaudi*. Dans les formes jeunes, ces protéases sont localisées au niveau des ribosomes où elles sont probablement synthétisées. Dès leur formation, les vésicules d'endocytose montrent une activité enzymatique, d'abord sur leur pourtour puis dans la totalité de leur contenu. Les enzymes semblent donc apportées dans les vésicules par un mécanisme dont nous ne pouvons encore préciser la nature au vu de l'état actuel d'avancement de nos travaux. Le transit doit certainement se faire par le réticulum. L'activité protéolytique des vésicules diminue au fur et à mesure de la formation des cristaux pigmentaires. Ceci tend à montrer qu'il peut y avoir un effet rétroactif exercé soit par les acides aminés soit plus probablement par la quantité croissante du pigment formé de résidus ferreux, qui donc inhiberaient la réaction enzymatique. L'activité du cytoplasme décroît et devient inexistante chez les stades âgés évoluant vers la schizogonie. Il doit donc exister un contrôle de la production d'enzymes.

La nature du pigment n'est pas encore totalement définie. Les premiers auteurs considéraient que c'était de la mélanine ou un dérivé de mélanine. Mais très vite, il a été suggéré que ce résidu était formé à partir

de l'hémoglobine et devait être composé de la partie non protéique de la molécule, c'est-à-dire l'hème. THEAKSTON *et al.* (1970) ont confirmé cette hypothèse. Une autre théorie, plus récente, propose que ce pigment ne constitue pas une molécule bien définie mais plutôt une série de molécules de transition entre l'hémoglobine et le produit final de dégradation. Dans cet ordre d'idée, MORSELT *et al.* (1973) ont montré que les grains de pigment d'un même parasite, pris individuellement, ont des spectres d'absorption différents, représentant probablement des étapes différentes dans la constitution d'un résidu terminal de composition inconnue. Notre mise en évidence de la décroissance progressive de l'activité enzymatique au fur et à mesure de la formation des cristaux est en accord avec cette dernière théorie.

Cependant, la dégradation de l'hémoglobine nécessite l'intervention d'autres enzymes que celles que nous avons mises en évidence. Sachant que l'EAA et l'AP hydrolysent seulement des peptides et non des protéines, il est nécessaire que cette protéine soit prédégradée avant que ces protéases ne puissent opérer. L'enzyme responsable serait une cathepsine D, dont la présence a été démontrée biochimiquement par LEVY *et al.* (1973, 1974). Ce type d'enzyme hydrolyse spécifiquement l'hémoglobine. A l'heure actuelle, la détection de la cathepsine D ne semble pas encore pouvoir être faite par des méthodes simples, adaptables à la microscopie électronique et compatibles avec les conditions de vie du parasite. Des travaux récents semblent pourtant nous ouvrir la voie (MATTHEWS *et al.*, 1981). Cette enzyme travaille à pH très acide (2,5) tandis que les enzymes telles que l'AP ou l'EAA opèrent à pH neutre ou basique. Comment peut-on expliquer que des enzymes dont les conditions d'activité sont si différentes peuvent agir au même endroit ? Notre étude morphologique peut donner un élément de réponse. En effet, nous avons observé la disparition de la membrane interne des vésicules de pinocytose suivie par le début de la digestion du contenu vésiculaire. Cette disparition peut entraîner une diminution du pH intravésiculaire en concordance avec la disparition des PIM (ALLEN, 1976, chez *Paramecium*). Le pH augmenterait ensuite au fur et à mesure de la dégradation de l'hémoglobine en peptides, permettant ainsi l'action de l'AP et l'EAA. La faible réactivité de l'EAA peut s'expliquer par le fait que la température optimale de travail est 37°C ; or notre technique se fait à température ambiante, d'où une moindre efficacité. Augmenter la température de l'expérience s'avère techniquement impossible du fait de l'excessive rapidité avec laquelle le milieu d'incubation se dégrade.

Il est ainsi tentant de suggérer que la dégradation de l'hémoglobine puisse se faire selon le schéma de la figure H, bien qu'aucune autre information ne nous permette de clarifier le mode d'action de l'EAA chez *P. chabaudi*.

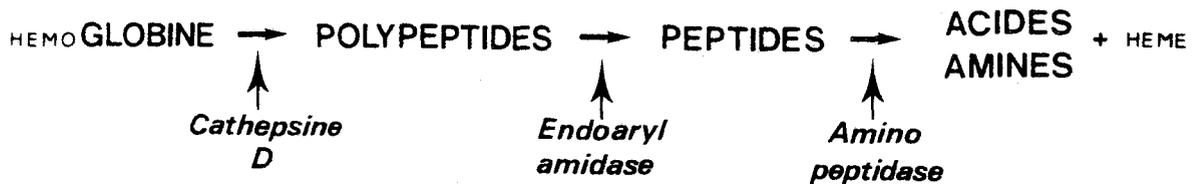
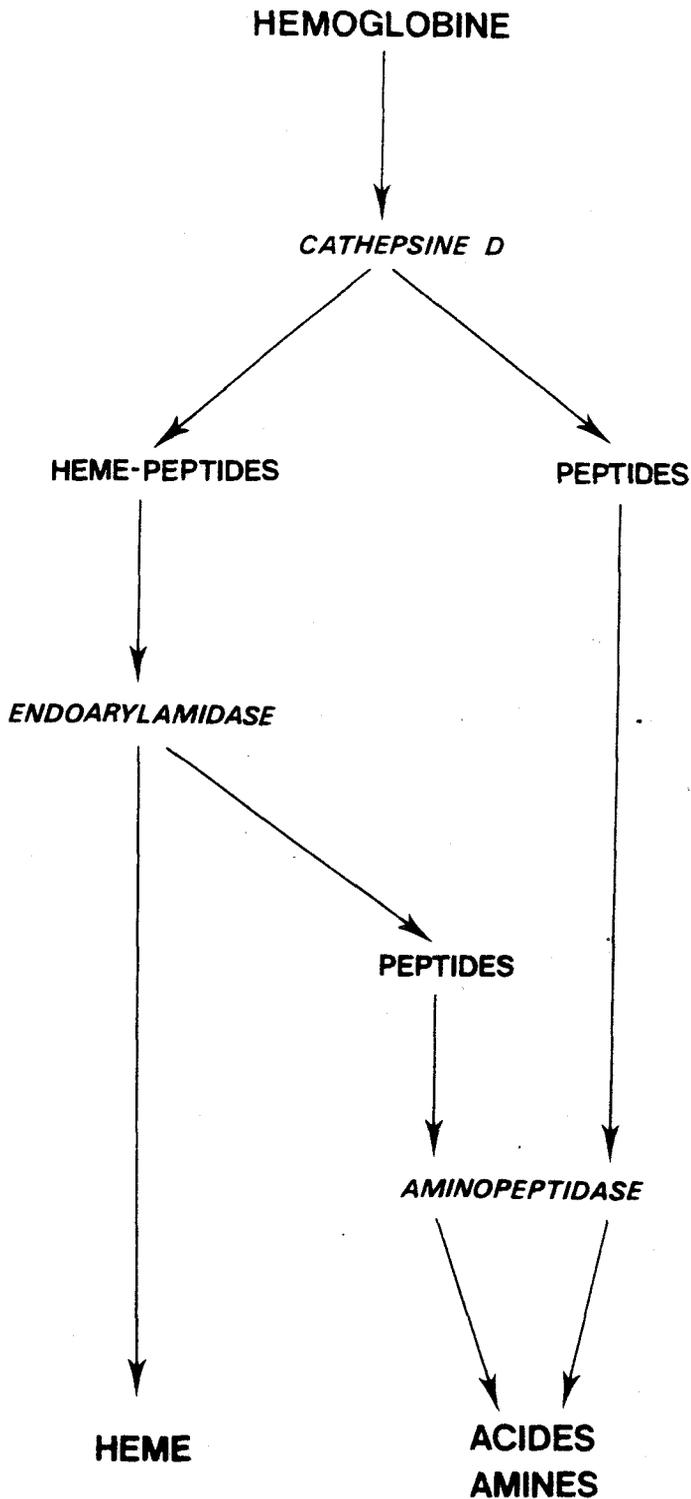


Figure H - Dégradation de l'hémoglobine en acides aminés : système protéolytique.

Cependant, nous avons remarqué, lors de notre étude comparée avec *Babesia* que nous considérons comme un témoin, que l'EAA est absente chez le Piroplasme. Bien que *Plasmodium* et *Babesia* vivent dans les mêmes conditions, ils montrent une grande différence : le Piroplasme vit directement en contact avec le stroma érythrocytaire comme le montre la micrographie (Pl. XVII, fig. 1) d'une coupe classique du parasite, ou la micrographie (Pl. XVII, fig. 2) en cryofracture. Ce parasite ne présente pas de système responsable de l'ingestion de l'hémoglobine (contrairement à ce qu'ont dit RUDZINSKA *et al.* (1962) ou LANGRETH (1976) chez *Babesia microti*), ni de structure spécialisée dans la dégradation intracellulaire du stroma [en opposition avec RUDZINSKA (1976) et RUDZINSKA *et al.* (1976)] ou dans l'ingestion intracellulaire du plasma (comme le prétendent FRERICHS *et al.* (1974) chez *Babesia equi*). *Babesia hylomysci* semble par contre posséder un système vacuolaire identique à celui qu'ont décrit VIVIER *et al.* (1972) chez *Anthemiosoma garnhami*, qui ne servirait qu'à augmenter la surface d'échanges entre le parasite et son hôte. Grâce à l'absence de la double barrière membranaire, les nutriments peuvent donc passer directement à travers le plasmalemma sans nécessiter l'intervention d'un système complexe de pinocytose et peuvent donc être directement dégradés dans l'organisme. Nous ne

pouvons pas assurer que les éléments nutritifs proviennent de l'hémoglobine car ce parasite ne produit pas de pigments supposés dériver du stroma érythrocytaire. Mais il est très probable que l'hémoglobine ne soit pas totalement dégradée et que l'hème reste associé à un fragment de globine. Or le composé hème-peptide est soluble et ne précipite pas comme l'hème seul, donc ne peut être repéré morphologiquement. Cela peut expliquer l'absence d'EAA chez *Babesia* puisque l'AP peut dégrader directement les peptides produits. L'EAA servirait donc à dissocier l'hème des peptides. Sachant cela nous pouvons proposer un schéma plus précis de la dégradation de l'hémoglobine chez *Plasmodium*. Le schéma de la figure I est fait en collaboration avec CHARET (communication personnelle). Nous y avons mis, en parallèle avec le déroulement de la digestion, les modifications morphologiques susceptibles de se faire à des moments donnés de la réaction.



Endocytose

- micropinocytose
- vacuole puis tube cytotomal

Disparition des PIM  
Diminution du pH  
Disparition de la membrane interne

Eclaircissement de la matrice vésiculaire

Apparition progressive du (des) cristal (aux) pigmentaires

Vésicule pigmentaire



Figure 1 - Système protéolytique de *P. chabaudi*. Correspondance cytochimie-morphologie.

CONCLUSION

L'étude du mécanisme de nutrition chez *P. chabaudi* nous a permis d'observer deux grands processus d'endocytose du stroma érythrocytaire et d'apporter quelques données et précisions supplémentaires sur certains points de sa biologie. Ces résultats portent tant sur le plan morphologique que sur le plan cytochimique.

1 - Etude morphologique - Coupes sériées et cryofracture

Les deux processus d'endocytose sont :

- la micropinocytose sur toute la périphérie du parasite, y compris la "vacuole nutritive" que nous avons montré n'être qu'un procédé destiné à accroître la surface de contact, donc d'échanges, entre le parasite et son hématie-hôte. La "vacuole nutritive" reste toujours ouverte et diminue de volume jusqu'à disparaître en début de schizogonie.

- le système digestif dérivant du cytostome. Par cette ouverture dans le plasmalemme s'invaginent les deux membranes entourant le parasite pour former une vacuole cytotomale. Cette dernière s'allonge en un tube limité par deux membranes à l'extrémité duquel bourgeonnent des vacuoles. Après que les membranes interne et externe de celles-ci se soient accolées, le contenu intravacuolaire s'altère. Ce système digestif semble particulier à *P. chabaudi*.

Le premier processus peut venir se greffer sur le second, notamment sur la vacuole cytotomale. Ils coexistent durant la croissance du trophozoïte.

Le mouvement d'internalisation du stroma érythrocytaire s'accompagne d'un profond remaniement membranaire. La cryofracture et l'utilisation de marqueur spécifique (filipine) nous a permis de mettre en évidence une baisse et même une disparition des PIM sur les membranes dérivant du plasmalemme érythrocytaire (membrane de la vacuole parasitophore, membrane interne des vacuoles et vésicules) alors que la densité en stérols augmente considérablement. PIM et stérols disparaissent quand les vésicules d'endocytose sont bien formées. Parallèlement, les membranes propres au parasite ne subissent pas de grandes modifications (plasmalemme, membrane externe des vacuoles et vésicules) excepté sur les vésicules pigmentaires où les PIM disparaissent.

Ces constatations tendent à montrer que la disparition des PIM et l'augmentation des stérols sont synonymes d'une mobilité accrue puis d'une dégradation membranaire. La disparition de la membrane interne vésiculaire précède l'altération du contenu des vacuoles et vésicules : la matrice s'éclaircit progressivement tandis que se forment un ou plusieurs cristaux de pigment. Aucun lysosome n'est venu s'accoler aux vésicules d'endocytose.

L'étude de l'endocytose nous a donné la preuve morphologique de la digestion de l'hémoglobine. La seconde partie de notre travail a cherché à apporter la preuve cytochimique.

## 2 - Etude cytochimique

Afin de vérifier l'absence de lysosomes, nous avons montré l'inexistence de phosphatase acide chez le parasite, également justifiée par l'absence de substrat à dégrader par cette enzyme. En effet, le principal substrat à digérer est l'hémoglobine. La globine, associée à l'hème, peut être dégradée par des enzymes protéolytiques que nous avons mises en évidence et localisées au niveau des vésicules d'endocytose. Ces enzymes sont l'endoarylamidase et l'aminopeptidase. Leur synthèse se fait au niveau des ribosomes, puis elles sont amenées par un mécanisme à déterminer sur leur site d'action. Le taux d'activité diminue au fur et à mesure de la formation du pigment, probablement sous l'action inhibitrice de ce dernier. Il doit également exister un mécanisme de régulation de la synthèse d'enzyme qui cesse à la schizogonie. En comparant *Plasmodium* et *Babesia*, nous avons déduit et proposé un mécanisme de dégradation de l'hémoglobine en parallèle avec les modifications morphologiques observées.

Des travaux actuellement en cours visent à affiner davantage les résultats. Ils cherchent à établir une cinétique de dégradation de l'hémoglobine grâce aux marqueurs mis au point au cours de la présente étude, après avoir obtenu des fractions pures de parasites (séparation sur gradient). Un autre problème étudié est le devenir des acides aminés fabriqués dont nous pouvons suivre la trace grâce à un marquage radioactif. Une analyse détaillée des processus d'endocytose sera également faite, sur la base du travail précédent, après action de diverses drogues, notamment des antipaludiques, afin d'en observer les effets sur la digestion et préciser des points encore inexplicables à ce jour.

## BIBLIOGRAPHIE

## BIBLIOGRAPHIE

### A

- ADNETT J.J., HOPFNER C., PLUOT M. et CAULET T. 1973. Détection ultrastructurale des leucine-aminopeptidases par chélation au plomb. *Biomed*, 19, p. 492-494.
- AIKAWA M., 1977. Variations in structure and function during the life cycle of malarial parasite. *Bull. W.H.O.*, 55, p. 139-156.
- AIKAWA M. et ANTONOVITCH T.T., 1964. Electron microscopic observations of *Plasmodium berghei* and Kupfer cell in the liver of rats. *J. Parasit.* 50, p. 620-629.
- AIKAWA M., HEPLER P.K., HUFF C.G. et SPRINZ H., 1966 a. The feeding mechanism of avian malarial parasites. *J. Cell Biol.*, 28, p. 355-373.
- AIKAWA M., HUFF C.G. et SPRINZ H., 1966 b. Comparative feeding mechanism of avian and primate malarial parasites. *Milit. Med. (Suppl.)*, p. 969-983.
- AIKAWA M., MILLER L.H., RABBEGE J.R. et EPSTEIN N., 1981. Freeze-fracture study on the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion. *J. Cell Biol.*, 91, p. 55-62.
- AIKAWA M. et STERLING C.R., 1974. *Intracellular Parasitic Protozoa*. Academic Press New York, San Francisco, London.
- AIKAWA M. et THOMPSON P.E., 1971. Localization of acid phosphatase activity in *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum* : an electron microscopic observation. *J. Parasit.*, 3, p. 603-610.
- AISSI E. et CHARET P., 1981. Proteolytic system in *Babesia nylomyisci*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 70 B, p. 133-139.
- AISSI E., CHARET P. et BOUQUELET S., 1982. Endoproteases in *Plasmodium yoelii nigeriensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* (soumis pour publication).
- ALLEN R.D., 1976. Freeze-fracture evidence for intramembrane changes accompanying membrane recycling in *Paramecium*. *Cytobiol.*, 12, p. 254-273.

## B

- BANNISTER L.J., 1977. The invasion of red cells by *Plasmodium*. Taylor R. et Muller R. eds. 15th Sym. Brit. Soc. Parasitol. Oxford, p. 27-55.
- BODAMMER J.E. et BAHR G.F., 1973. The initiation of a "metabolic window" in the surface host erythrocytes by *Plasmodium berghei* NYU-2. Lab. Invest., 28, p. 708-718.
- BRANTON D., BULLIVANT S., GILULA N.B., KARNOVSKY M.J., MOOR H., MUHLETHALER K., NORTHCOTE D.H., PACKER L., SATIR B., SATIR P., SPETA V., STAEHLIN L.A., STEERE R.L. et WEINSTEIN R.S., 1975. Freeze-etching nomenclature. Science, 190, p. 55-56.
- BURSTONE M.S. et FOLK J.E., 1956. Histochemical demonstration of leucine amino-peptidase. J. Histochem. Cytochem., 4, p. 217-226.

## C

- CHARET P., AISSI E., BOUQUELET S. et BIGUET J., 1980. Aminopeptidase in rodent *Plasmodium*. Comp. Biochem. Physiol., 65 B, 519-524.
- CHEISSIN E.M. (KHFYSIN E.M.) et SNIGIREVSKAYA E.S., 1965. Some new data on the fine structure of the merozoites of *Eimeria intestinalis* (Sporozoa. Eimeriidea). Protistologica, 1, p. 121-128.
- COX F.E.G. et VICKERMAN K., 1966. Pinocytosis in *Plasmodium vinckei*. Ann. Trop. Med. Parasit., 60, p. 293-296.

## D

- De DUVE C., 1969. Lysosomes in Biology and Pathology. Dingle J.T. et Fell H.B. Eds. North-Holland., Vol. 1, p. 3-40.
- DUBREMETZ J.-F., COLWELL D. et MAHRT J., 1975. Etude de l'oocyste de la Coccidie *Eimeria nieschulzi* par cryodécapage. C. R. A. S. Paris, 280, p. 2117-2119.
- DUBREMETZ J.-F. et TORPIER G., 1978. Freeze-fracture study of the pellicle of an eimerian sporozoite (Protozoa, Coccidia). J.U.R., 62, p. 94-109.
- DUBREMETZ J.-F., TORPIER G., MAUROIS P., PRENSIER G. et SINDEN R., 1979. Structure de la pellicule du sporozoïte de *Plasmodium yoelii* : étude par cryofracture. C. R. A. S. Paris, 288, p. 623-626.

## E

- ELIAS P.M., FRIEND D.S. et GOERKA J., 1979. Membrane sterol heterogeneity. Freeze-fracture detection with saponin and filipin. *J. Histochem. Cytochem.*, 27, p. 1247-1260.

## F

- FAHIMI H.D. et DROCHMANS P., 1968. Purification of glutaraldehyde. Its significance for preservation of acid phosphatase activity. *J. Histochem. Cytochem.*, 16, p. 199-204.
- FLETCHER K.A. et MAEGRAITH B.G., 1962. Intracellular phagotrophy by *Plasmodium knowlesi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 56, p. 492-495.
- FRERICHS W.M. et HOLBROOK A.A., 1974. Feeding mechanisms of *Babesia equi*. *J. Protozool.*, 21, p. 707-709.
- FULTON J.D. et FLEWETT T.H., 1956. The relation of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium knowlesi* to their respective red cell hosts. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 50, p. 150-158.

## G

- GARNHAM P.C.C., BAKER J.R. et BIRD R.G., 1962. The fine structure of *Lankestrella garnhami*. *J. Protozool.*, 9, p. 107-114.
- GARNHAM P.C.C., BIRD R.G., BAKER J.R. et BRAY R.S., 1960. Electron microscope studies of motile stages of malaria parasites. I. The fine structure of the sporozoite of *Haemoeba (Plasmodia) gallinacea*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 54, p. 274-278.
- GOMORI G., 1952. *Microscopic histochemistry : principles and practice*. Chicago University Press. Chicago.

## H

- HOLT S.J. et HICKS R.M., 1966. The importance of osmiophilia in the production of stable azoindoxyl complexes of high contrast for combined enzyme cytochemistry and electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 29, p. 361-373.

- HOMEWOOD C.A. et NEAME D., 1980. Biochemistry of Malaria. "Malaria". Tome I. J.P. Kreier Ed. Academic Press, p. 345-405.
- HOURDRY J., 1974. Mise en évidence d'une activité phosphatasique acide dans les cellules animales et problèmes posés par cette visualisation. J. Microscopie, 21, p. 245-252.
- HOWELLS R.E., 1970. Electron microscope observations on the development and schizogony of the erythrocytic stages of *Plasmodium berghei*. Ann. Trop. Med. Parasit., 64, p. 305-307.
- HOWELLS R.E., PETERS W. et FULLARD J., 1969. Cytochrome oxidase activity in a normal and some drug-resistant strains of *Plasmodium berghei*. A cytochemical study. I. Asexual erythrocytic stages. Milit. Med. (Special issue). p. 893-915.
- HOWELLS R.E., PETERS W. et THOMAS E.A., 1968. Host parasite relationships. Part 4 : The relationship between haemozoin formation and host cell age in chloroquine and primaquine resistant strains of *Plasmodium berghei*. Ann. Trop. Med. Parasit., 62, p. 271-276.

J

- JANIGAN D.T., 1965. The effects of aldehyde fixation on acid phosphatase activity in tissue blocks. J. Histochem. Cytochem., 13, p. 476-483.

K

- KILLBY V.A.A. et SILVERMAN P.H., 1969. Fine structural observations of the erythrocytic stages of *Plasmodium chabaudi* (Landau 1965). J. Protozool., 16, p. 354-370.

L

- LADDA R.L., 1969. New insights into the fine structure of rodent malaria parasites. Milit. Med., 134, p. 825-865.
- LANDAU I., 1965. Description de *Plasmodium chabaudi* n. sp., parasite de Rongeurs africains. C. R. A. S. Paris, 260, p. 3758-3761.

- LANGRETH S.G., 1976. Feeding mechanism in extracellular *Babesia microti* and *Plasmodium lophurae*. J. Protozool., 23, p. 215-233.
- LANGRETH S.G., 1977. Electron microscope cytochemistry of host-parasite membrane interactions in malaria. Bull. W.H.O., 55, p. 171-178.
- LEVY M.R. et CHOU C., 1973. Activities and some properties of an acid proteinase from normal and *Plasmodium berghei* infected red cells. J. Parasit., 59, p. 1064-1070.
- LEVY M.R. et CHOU C., 1974. Acid proteases activity in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium knowlesi*, and ghost of their respective host cell. Nature, 247, p. 546-549.

M

- MACOMBER P.B., SPRINZ H. et TOUSIMIS A.J., 1967. Morphological effects of chloroquine on *Plasmodium berghei* in mice. Nature, 214, p. 937-939.
- MATTHEWS I.T.W., DECKER R.S. et KNIGHT C.G., 1981. The localization of cathepsin D with a biotin-labelled pepsatin. FEBS letters, 134, p. 253-256.
- MAZEN L., GULL K. et GUTTERIDGE W.E., 1975. A freeze-fracture study of the host parasite interface of the malarial parasite *Plasmodium chaubaudi*. J. Protozool., 22, p. 54 A.
- MC LAREN D.J., BANNISTER L.H., TRIGG P.I. et BUTCHER G.A., 1977. A freeze-fracture study on the parasite-erythrocyte interrelationship in *Plasmodium knowlesi* infection. Bull. W.H.O., 55, p. 199-203.
- MC LAREN D.J., BANNISTER L.H., TRIGG P.I. et BUTCHER G.A., 1979. Freeze-fracture studies on the interrelationship between the malaria parasite and the host erythrocyte in *Plasmodium knowlesi* infection. Parasitol., 79, p. 125-139.
- MESZOELY A.M., STEERE R.L. et BAHR G.F., 1972. Morphologic studies on the freeze-etched avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum*. Proc. Helminth. Soc. Washington, 39, p. 149-173.
- MILLER F. et PALLADE G.E., 1964. Lytic activities in renal protein absorption droplets. An electron microscopical cytochemistry study. J. Cell. Biol., 23, p. 519-522.
- MONIS B., WASSERKRUG H. et SELIGMAN A.M., 1965. Comparative fixatives and substrats for aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem., 13, p. 503-509.

- MOORE G.A. et BOTHROYD B., 1974. Direct resolution of the lattice planes of malarial pigment. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 68, p. 489-496.
- MORSELT A.F.W., GLASTRA A. et JAMES J., 1973. Microspectrophotometric analysis of malarial pigment. *Exp. Parasitol.*, 33, p. 17-22.

## N

- NACHLAS M.M., CRAWFORD D.T. et SELIGMAN A.M., 1956. The histochemical demonstration of leucine-aminopeptidase. *J. Histochem. Cytochem.*, 5, p. 264-278.
- NACHLAS M.M., MONIS M., ROSENBLATT D. et SELIGMAN A.M., 1960. Improvement of the histochemical localization of leucine-aminopeptidase with a new substrate, L-leucyl-4-methoxy-naphthylamide. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 7, p. 261-276.

## O

- ORCI L., MILLER R., MONTESANO A., PERRELET A., AMHERDT M. et VASSALI P., 1980. Opposite polarity of filipin-induced deformations in the membrane of condensing vacuoles and zymogen granules. *Science*, 210, p. 1019-1021.
- ORCI L. et PERRELET A., 1973. Membrane associated particles : increase at sites of pinocytosis demonstrated by freeze-etching. *Science*, 181, p. 868-869.

## P

- PENNEL R.B., 1974. Composition of normal human red cells. "The red blood cell" (2nd edition). D. Mc Surgenor Ed. Academic Press. New York. Vol. 1, p. 93-146.
- PETERS W., FLETCHER K.A. et STAÜBLI W., 1965. Phagotrophy and pigment formation in chloroquine resistant strain of *Plasmodium berghei* (Vincke and Lips 1948). *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 59, p. 126-135.
- PORCHET-HENNERE E. et TORPIER G., 1977. Etude du germe infectieux chez *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii* par la technique de cryo-décapage. *Z. Parasitenk.*, 54, p. 101-124.

PORCHET-HENNERE E. et VIVIER E., 1971. Ultrastructure comparée des germes infectieux (sporozoïtes, mérozoïtes, schizozoïtes, endozoïtes...) chez les Sporozoaires. Ann. Biol., 10, p. 77-113.

## R

- RISTIC M. et KREIER J.P., 1964. The fine structure of *Plasmodium gallinaceum* as revealed by electron microscopy. Am. J. Trop. Med. Hyg., 13, p. 509-514.
- ROBINSON J.M. et KARNOVSKY M.J., 1980. Evaluation of the polyene antibiotic filipin as a cytochemical probe for membrane cholesterol. J. Histochem. Cytochem., 28, p. 161-168.
- RUDZINSKA M.A., 1969. The fine structure of malaria parasites. Int. Rev. Cytol., 25, p. 161-199.
- RUDZINSKA M.A., 1976. Ultrastructure of intraerythrocytic *Babesia microti* with emphasis on the feeding mechanism. J. Protozool., 23, p. 224-233.
- RUDZINSKA M.A., BRAY R.S. et TRAGER W., 1960. Intracellular phagotrophy in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium gonderii*. J. Protozool., 7, (suppl.), p. 24-25.
- RUDZINSKA M.A. et TEAGER W., 1957. Intracellular phagotrophy by malaria parasites : an electron microscopic study of *Plasmodium lophurae*. J. Protozool., 4, p. 190-199.
- RUDZINSKA M.A. et TRAGER W., 1959. Phagotrophy and two new structures in the malaria parasite *Plasmodium berghei*. J. Biophys. Biochem. Cytol., 6, p. 103-112.
- RUDZINSKA M.A. et TRAGER W., 1961. The role of the cytoplasm during reproduction in a malarial parasite (*Plasmodium lophurae*) as revealed by electron microscopy. J. Protozool., 8, p. 307-322.
- RUDZINSKA M.A. et TRAGER W., 1962. Intracellular phagotrophy in *Babesia rodhoni* as revealed by electron microscopy. J. Protozool., 9, p. 279-288.
- RUDZINSKA M.A. et TRAGER W., 1968. The fine structure of trophozoites and gametocytes in *Plasmodium coatneyi*. J. protozool., 15, p. 73-88.
- RUDZINSKA M.A., TRAGER W. et BRAY R.S., 1965. Pinocytic uptake and the digestion of haemoglobin in malaria parasite. J. Protozool., 12, p. 563-576.

- RUDZINSKA M.A., TRAGER W., LEWENGRUB S.J. et GUBERT E., 1976. An electron study of *Babesia microti* invading erythrocytes. Cell Tiss. Res., 169, p. 323-334.
- RUTENBURG A.M., KIM H., FISCHBEIN J.W., HANKER J.S., WASSERKRUG H.L. et SELIGMAN A.M., 1969. Histochemical and ultrastructural demonstration of  $\gamma$  glutamyl transpeptidase activity. J. Histochem. Cytochem., 17, p. 517-526.
- RYLEY J.F., 1969. Ultrastructural studies on the sporozoite of *Eimeria tenella*. Parasitol., 59, p. 67-72.

S

- SABATINI D.E., BENSCH K. et BARNETT R.J., 1963. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. J. Cell Biol., 17, p. 19-58.
- SCALZI H.A. et BAHR G.F., 1968. An electron microscopic examination of erythrocytic stages of two rodent malarial parasites, *Plasmodium chabaudi* and *Plasmodium knowlesi*. J. U. R., 24, p. 116-133.
- SCHOLTYSECK E. et MEHLHORN H., 1970. Ultrastructural study of characteristic organelles (paired organelles, micronemes, micropores) of Sporozoa and related organisms. Z. Parasitenk., 34, p. 97-127.
- SCORZA J.V., De SCORZA C. et MARTEIRO M.C.C., 1972. Cytochemical observations of three acid hydrolases in blood stages of malaria parasites. Ann. Trop. Med. Parasit., 66, p. 167-172.
- SEED R.M., AIKAWA M., PRIOR R.B., KREIER J.P. et PFISTER R.M., 1973. *Plasmodium* sp. : topography of intra- and extracellular parasite. Z. Tropenmed. Parasit., 24, p. 525-535.
- SEED R.M., STERLING C.R., AIKAWA M. et RABBEGE J., 1976. *Plasmodium simium* : ultrastructure of erythrocytic phase. Exp. Parasit., 39, p. 262-276
- SEEMAN P.M. et PALLADE G.E., 1967. Acid phosphatase localization in rabbit eosinophils. J. Cell Biol., 34, p. 746-756.
- SELIGMAN A.M., WASSERKRUG H.L., PLAPINGER R.E., SEITO T. et HANKER J.S., 1970. Membranous ultrastructural demonstration of aminopeptidase and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activities with a new diazonium salt that yields a lipophobic, osmiophilic azo dye. J. Histochem. Cytochem., 18, p. 542-551.

- SHERMAN I.W. et HULL R.W., 1960. The pigment (hemozoin) and proteins of the avian malaria parasite, *Plasmodium lophurae*. J. Protozool., 7, p. 409-416.
- SINDEN R.E., 1978. Cell Biology. in "Rodent Malaria", Killick-Kendrick R. and Peters W. eds, London, Academic Press, p. 85-168.
- SLOMIANNY C., CHARET P. et PRENSIER G., 1982. Ultrastructural localization of enzymes involved in the feeding process in *Plasmodium chabaudi* and *Babesia hyalomysci*. J. Protozool. soumis pour publication.
- STERLING C.R. et AIKAWA M., 1973. A comparative study of gametocyte ultrastructure in avian Haemosporidia. J. Protozool., 20, p. 81-92.
- STROUT R.G. et SCHOLTYSECK F., 1970. The ultrastructure of first generation development of *Eimeria tenella* (Railliet and Lucet 1891) Fautham, 1909 in cell cultures. Z. Parasitenk., 35, p. 87-96.

T

- THEAKSTON R.D.G., FLETCHER K.A. et MAEGRAITH B.G., 1968. The fine structure of *Plasmodium vinckei*, malaria parasite of rodents. Ann. Trop. Med. Parasit., 62, p. 122-134.
- THEAKSTON R.D.G., FLETCHER K.A. et MAEGRAITH B.G., 1970. The use of electron microscope autoradiography for examining the uptake and degradation of haemoglobin by *Plasmodium berghei*. Ann. Trop. Med. Parasit., 64, p. 63-71.
- TRAGER W., RUDZINSKA M.A. et BRADBURY P.C., 1966. The fine structure of *Plasmodium falciparum* and its host erythrocytes in natural malarial infection in man. Bull. W.H.O., 35, p. 883-885.

V

- VIVIER E., DEVAUCHELLE G., PETITPREZ A., PORCHET 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, p. 127-147.
- VIVIER E. et PETITPREZ A., 1972. Etude du système vacuolaire de l'hématozoaire *Anthemiosoma garnhami* à l'aide des coupes sériées et de reconstitutions tridimensionnelles. J. U. R., 41, p. 219-237.

VIVIER E., SCHREVEL J. et HENNERE E., 1964. L' ultrastructure de la paroi de quelques Sporozoaires, ses rapports avec certains organites cytoplasmiques, son rôle possible dans la nutrition. Proceed. 1<sup>st</sup>. Internat. Congr. Parasit. Rome, 1, p. 290-291.

W

WETZEL B.K., SPICER S.S. et HORN R.G., 1967. Fine structural localization of acid and alkaline phosphatases in cells of rabbit blood and bone marrow. J. Histochem. Cytochem., 15, p. 311-324.

WRIGHT I.G. et GOODGER B.V., 1973. Proteolytic enzyme activity in the intra-erythrocytic parasites *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. Z. Parasitenk., 42, p. 213-220.

ANNEXE

PLANCHES

PLANCHE I

Micropinocytose chez le trophozoïte

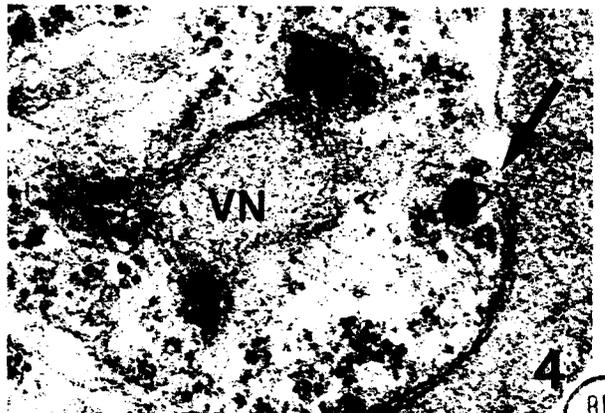
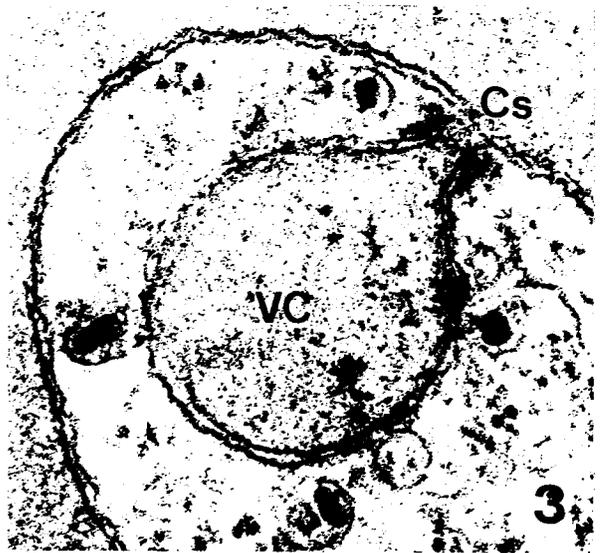
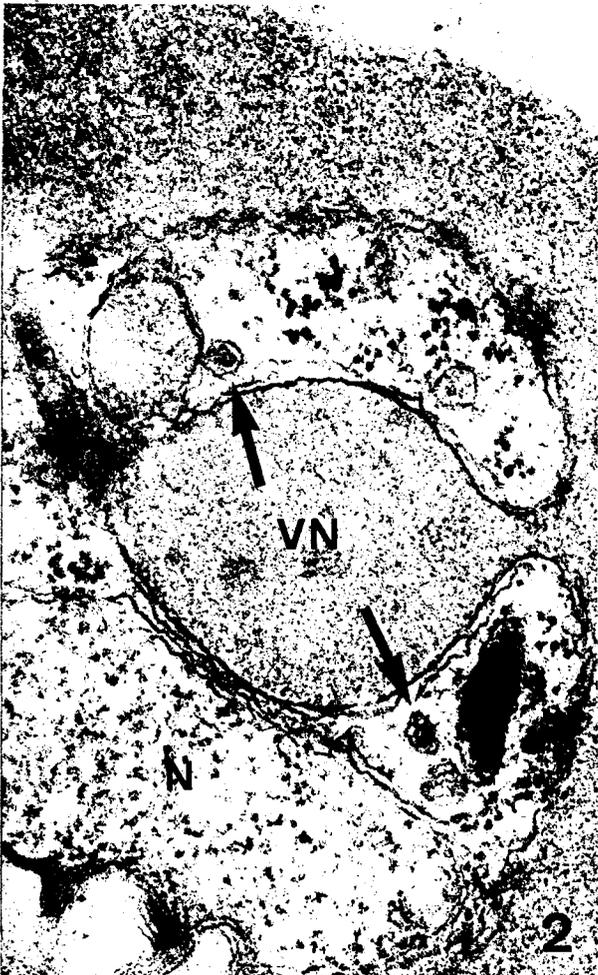
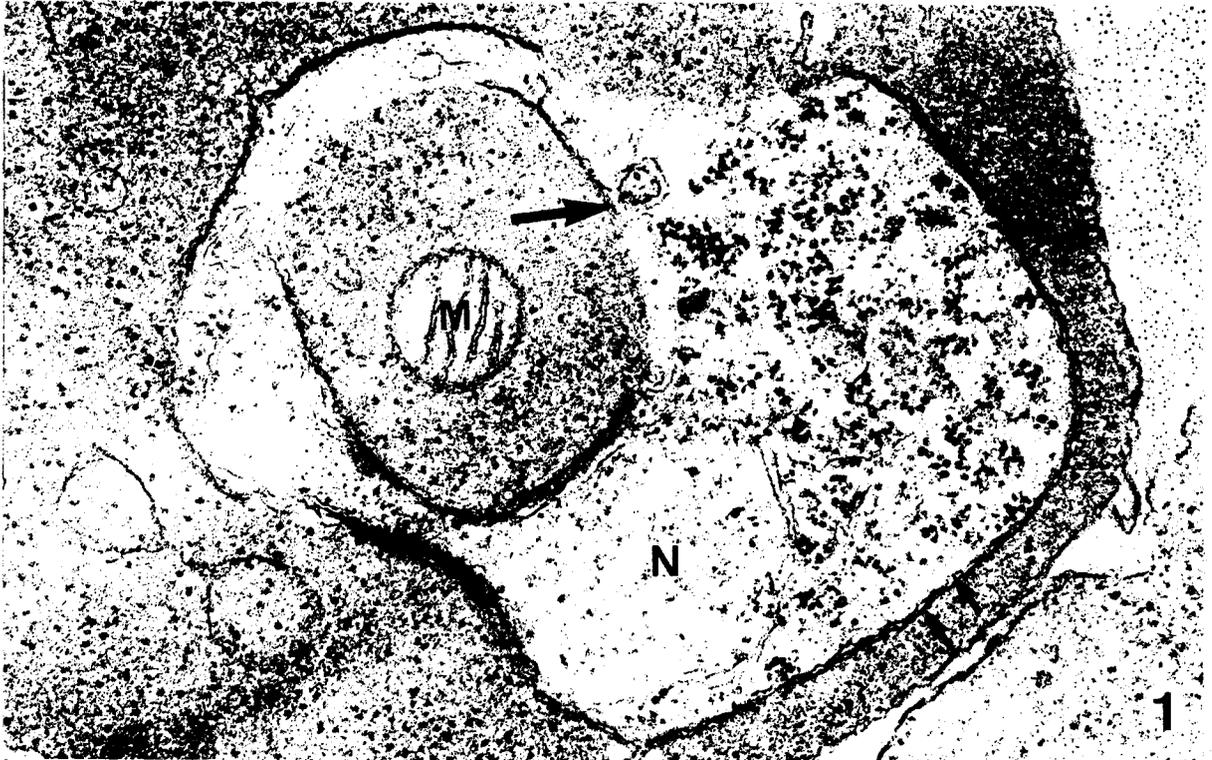
Figure 1 - Vue générale d'un trophozoïte parasitant un réticulocyte. Le parasite est limité par deux membranes (petites flèches). Une vésicule bourgeonne à la périphérie de la "vacuole nutritive" (grande flèche).  
x 72 000.

Figure 2 - "Vacuole nutritive". Stades un peu plus évolués de vésicules de micropinocytose (flèches).  
x 75 000.

Figure 3 - Différents stades évolutifs de vésicules de micropinocytose entourant une vacuole cytotomale.  
x 130 000.

Figure 4 - Détail d'une vésicule pigmentaire (flèche).  
x 70 000.

31  
spha.



BUS  
LILLE

PLANCHE II

Coupes s riees d'un trophozoite

Tube cytotosomal

Les figures 2, 4 et 5 montrent des vacuoles pigmentaires issues du système cytotosomal.

Les figures 6 et 7 montrent le cytotome (flèches).

Toutes les sections ne sont pas représentées sur cette planche

x 40 000.

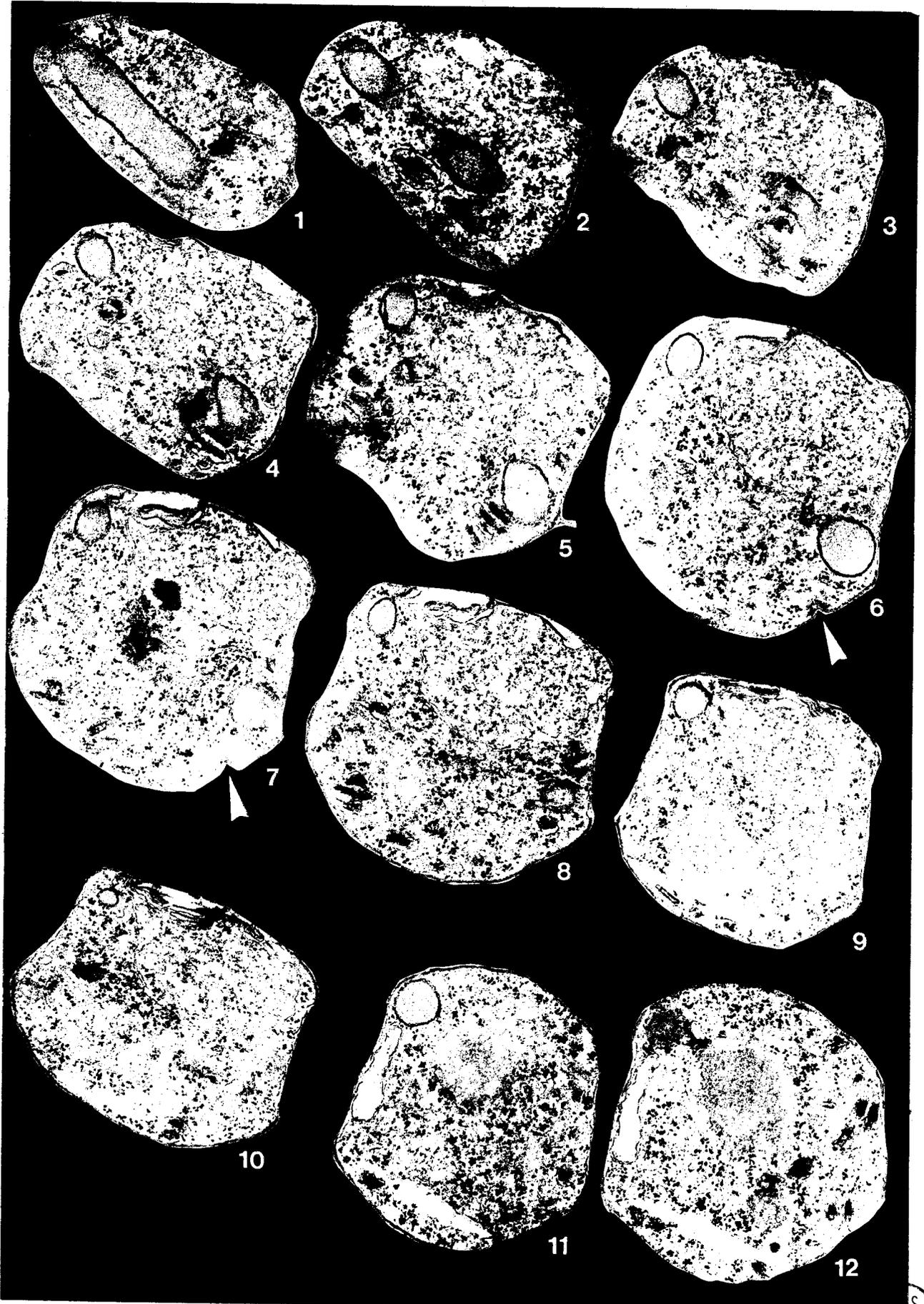


PLANCHE III

Coupes s riees d'un trophozoite

Tube cytotomal

La figure 5 montre une section du cytotome (flèche).

La figure 8 montre la localisation périphérique du tube cytotomal.

Toutes les coupes ne sont pas représentées sur cette planche.

x 50 000.

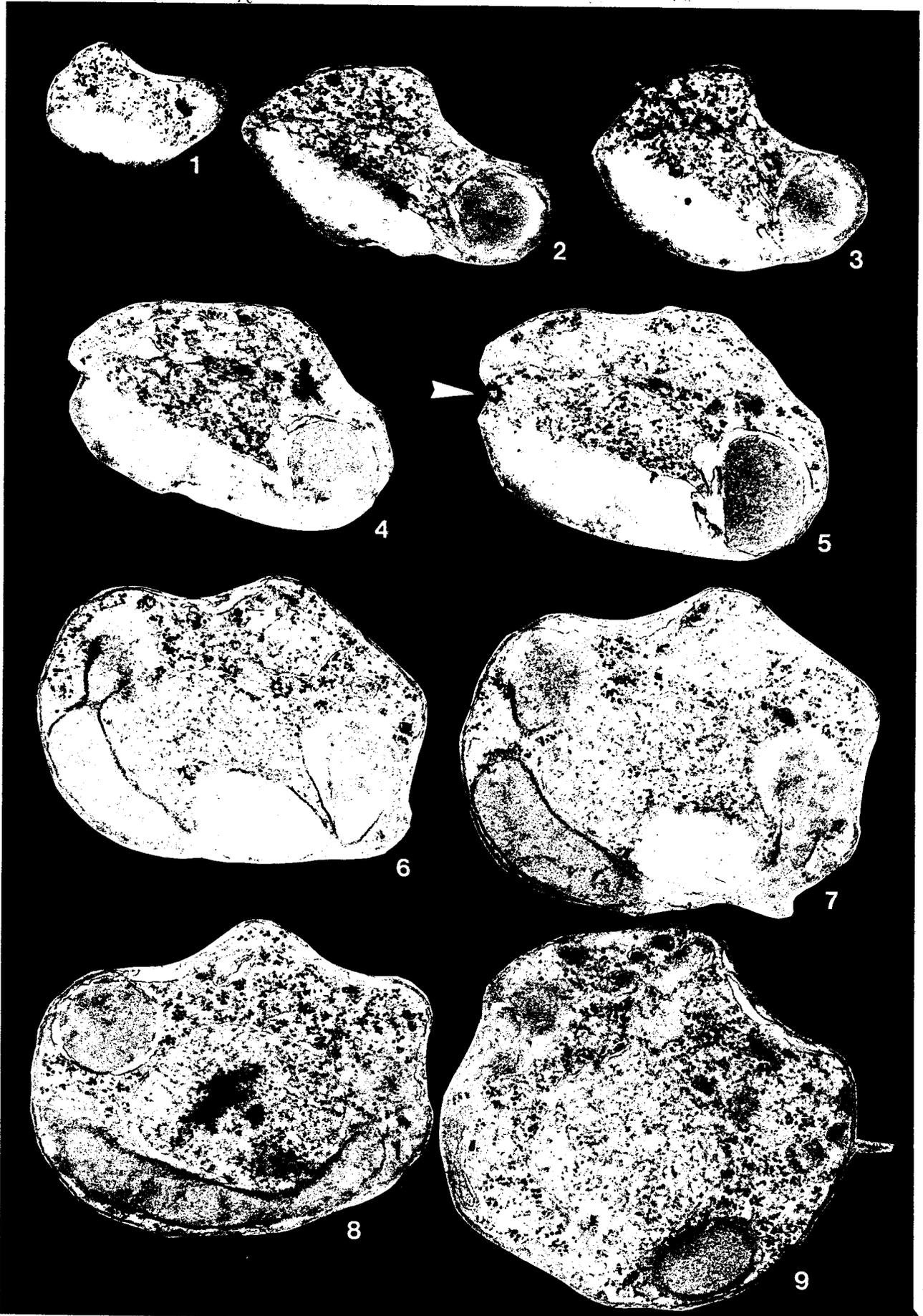


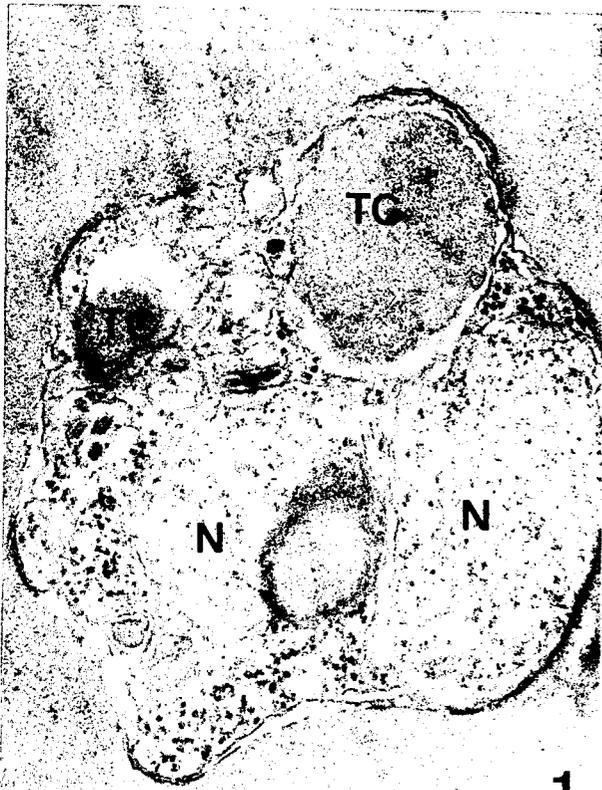
PLANCHE IV

Fraction d'une série de coupes sériées

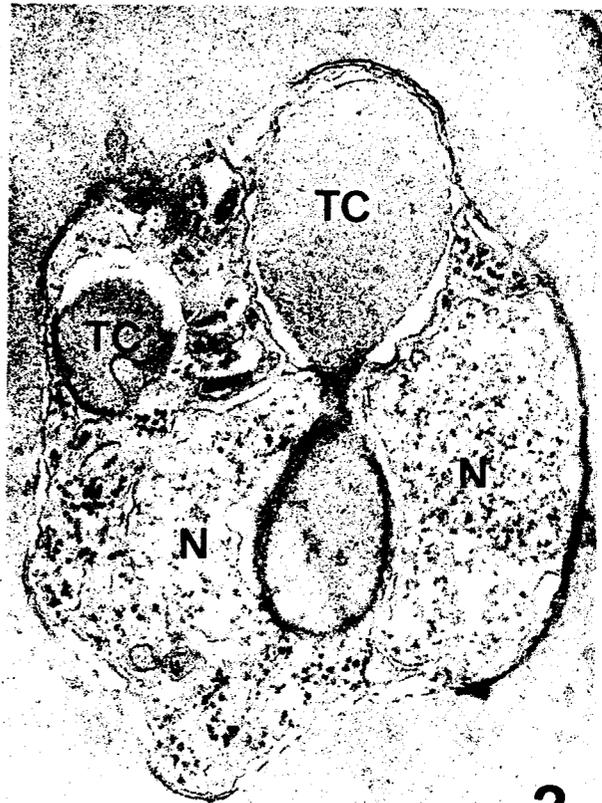
Tube cytotosomal

La figure 3 montre le pincement de la vésicule d'endocytose à partir de l'extrémité du tube cytotosomal. Noter que le phénomène d'accolement et de densification des deux membranes débute au niveau de l'étranglement.  
x 60 000.

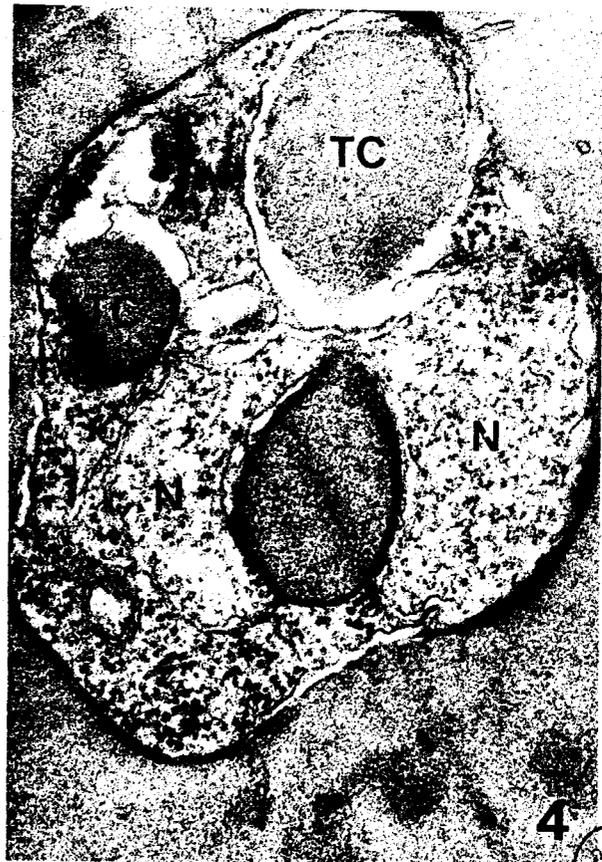
50  
Cyto



1



2



4

BUS  
LILLE

PLANCHE V

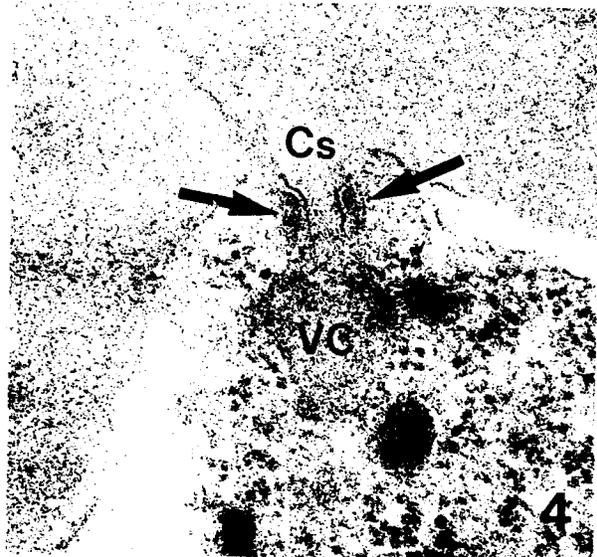
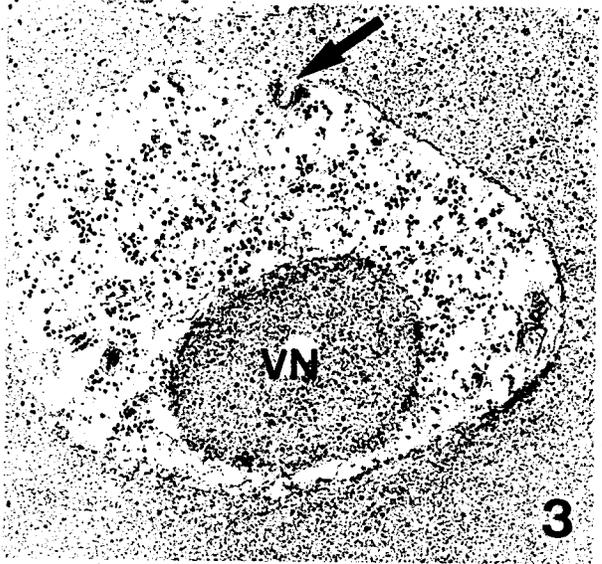
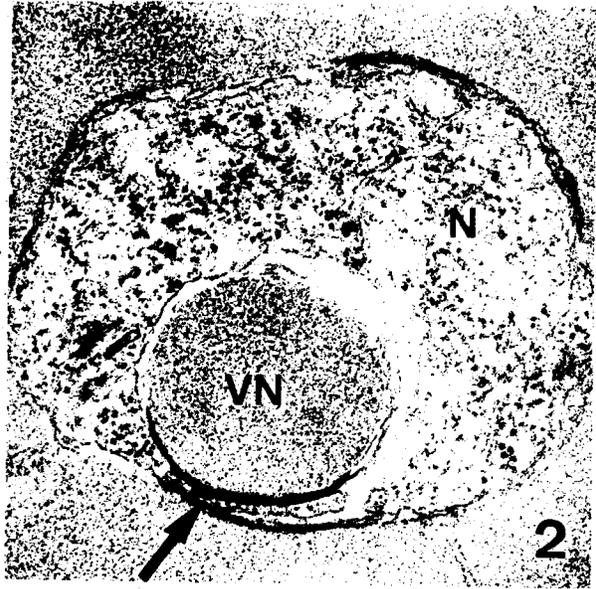
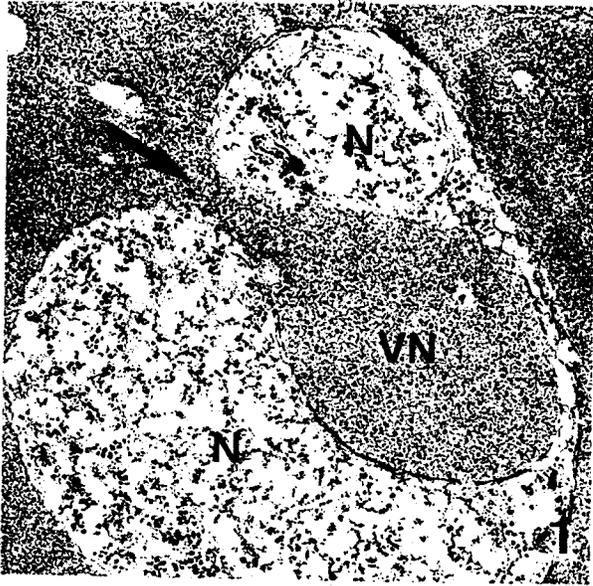
Figure 1 - Détail de la "vacuole nutritive" montrant la communication avec le stroma réticulocytaire (flèche).  
x 30 000.

Figure 2 - La "vacuole nutritive" peut montrer un accolement de ses deux membranes limitantes (flèche).  
x 45 000.

Figure 3 - Coupe semi-transversale du cytotome (flèche).  
x 30 000.

Figure 4 - Coupe transversale du cytotome en relation avec la vacuole cytotomale en début de formation. Noter la densification de la membrane plasmique du parasite doublée d'une structure plus claire (flèche).  
x 80 000.

Figure 5 - Mise en évidence de la phosphatase acide au niveau des plaquettes sanguines. Flèches : dépôts de précipité.  
x 50 000.



BUS  
LILLE

PLANCHE VI

Cryofracture

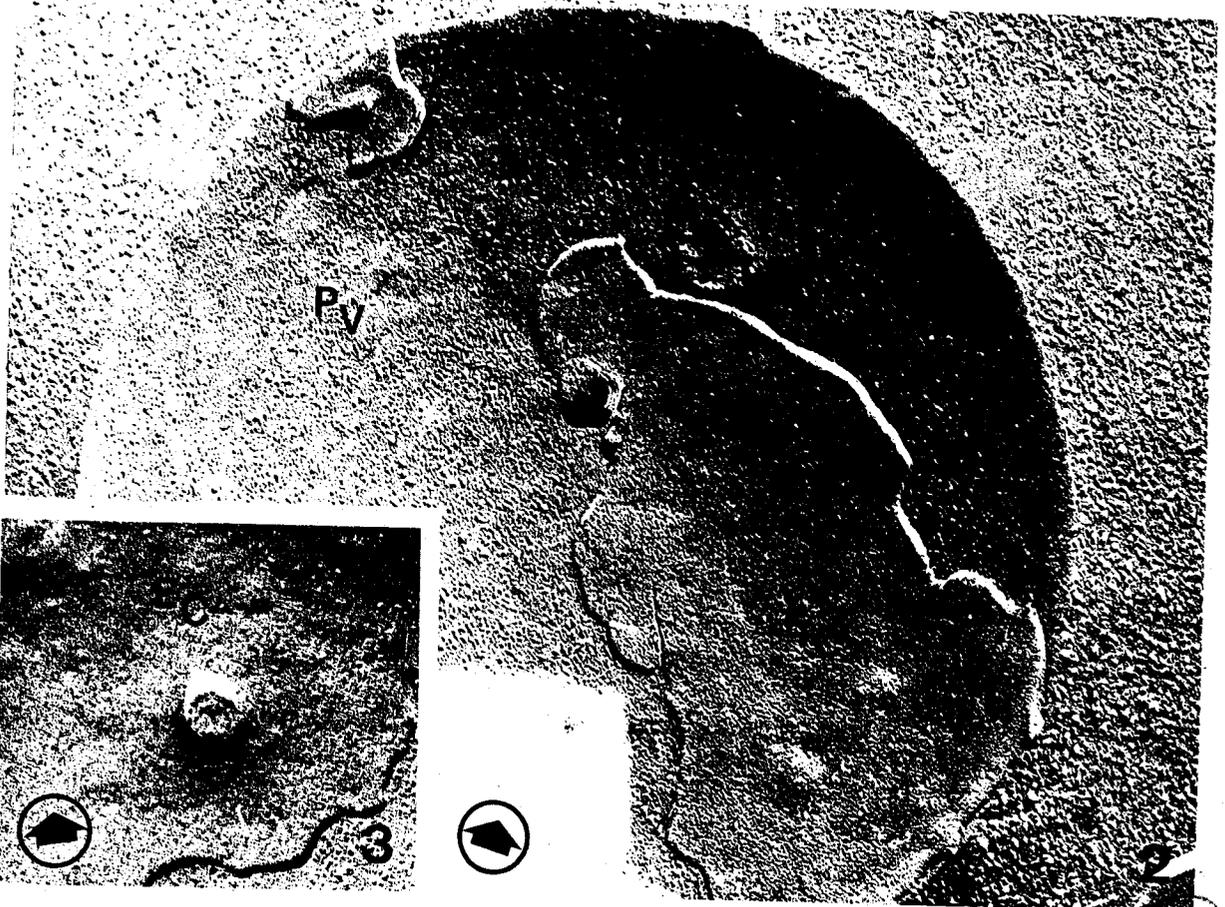
Surface externe du parasite

Figure 1 - Membrane plasmique de l'hématie.  
x 32 000.

Figure 2 - Membrane de la vacuole parasitophore et du parasite.  
x 75 000.

Figure 3 - Détail de la fracture du cytostome.  
x 94 000.

51  
ph



PHS  
LIFE

PLANCHE VII

Cryofracture

Surface externe du parasite

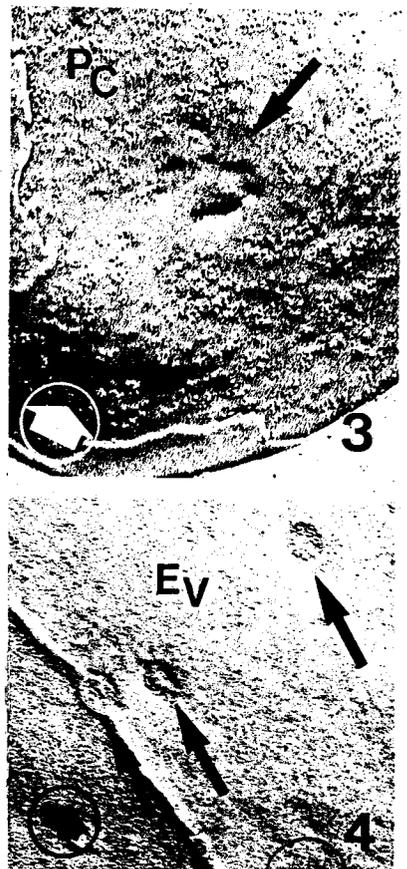
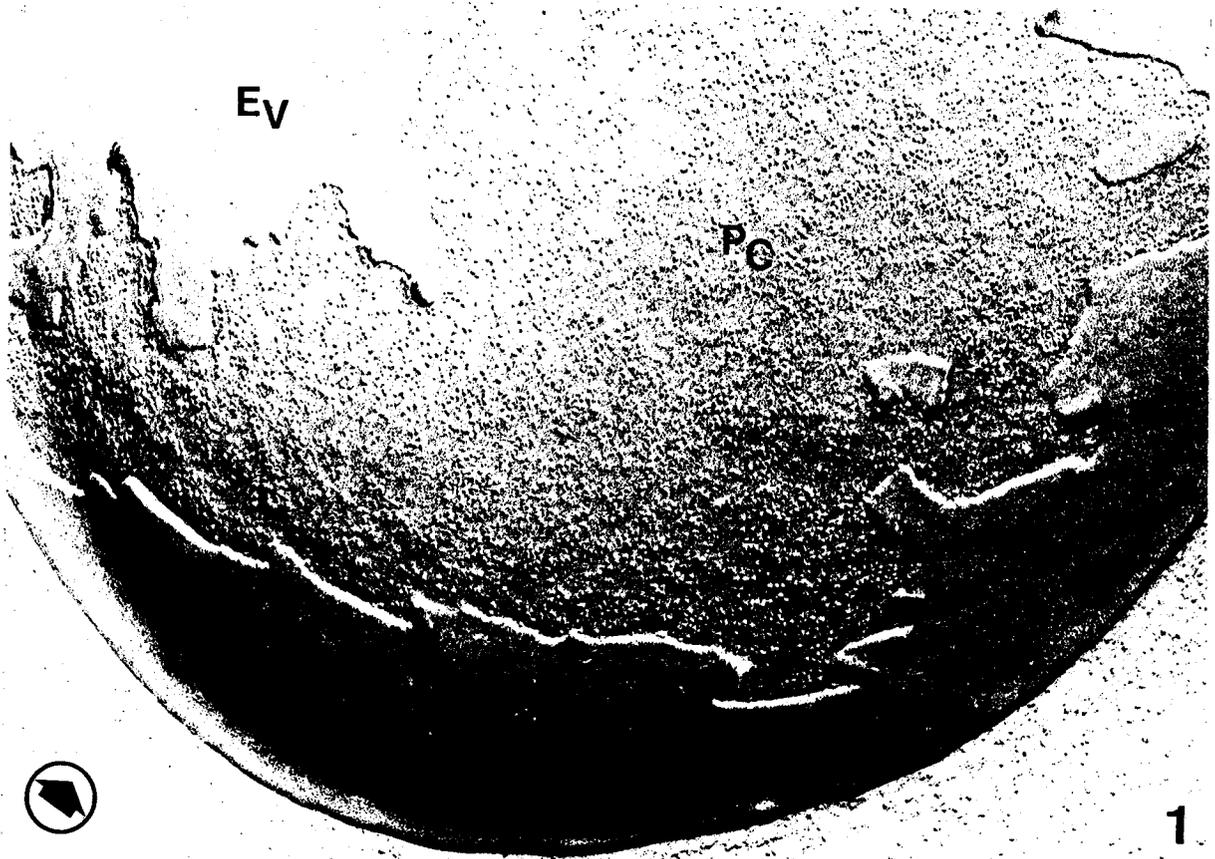
Figure 1 - Membranes de la vacuole parasitophore et du parasite.  
x 87 000.

Figure 2 - Détail de l'ouverture de la "vacuole nutritive".  
x 87 000.

Figure 3 - Existence de zones nues sur la membrane plasmique du parasite entourant des dépressions qui semblent correspondre à la formation de vésicules de micropinocytose.  
x 90 000.

Figure 4 - Détail. Le plan de fracture passe au niveau des zones d'invagination de la membrane.  
x 50 000.

st  
phy



1963  
LILLE

PLANCHE VIII

Cryofracture

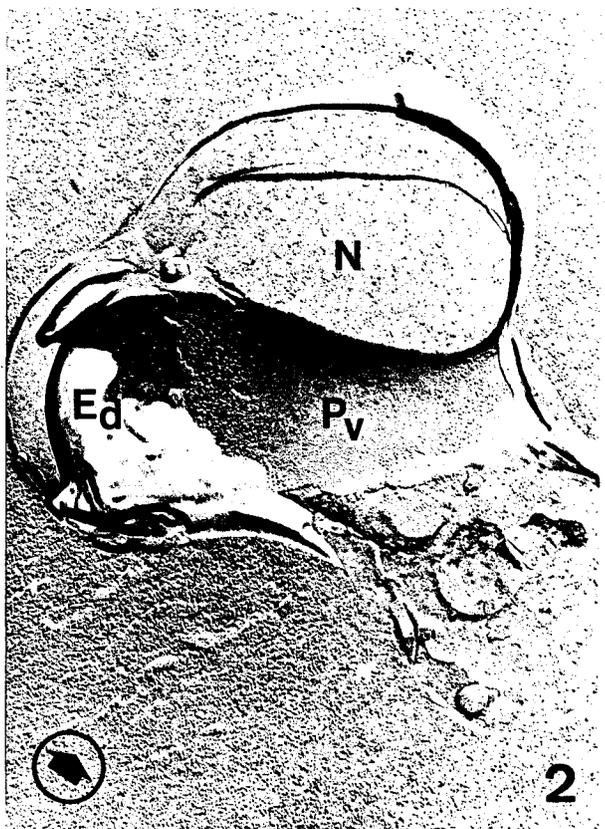
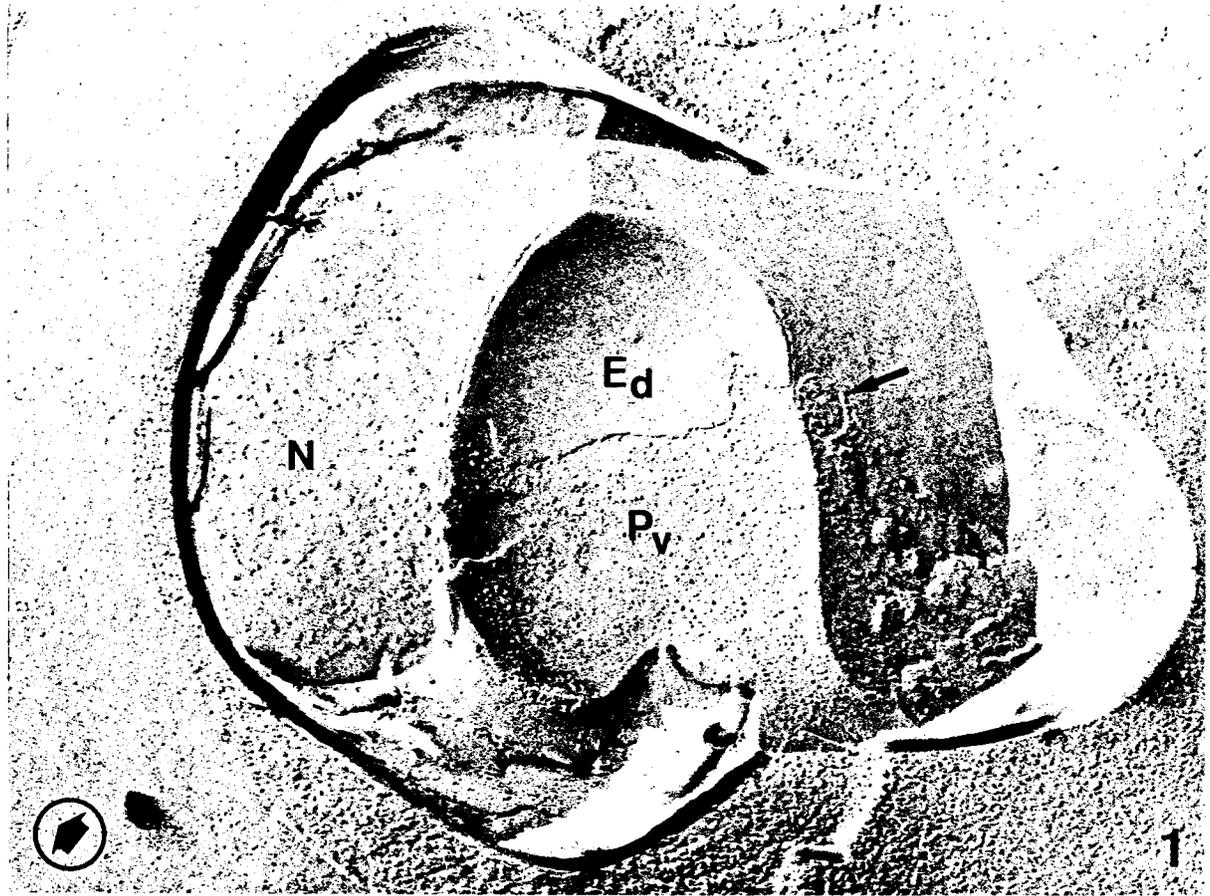
"Vacuole nutritive"

Figure 1 - Début de formation de la "vacuole". Noter la présence d'une vésicule de pinocytose tout contre le plasmalemme (flèche). La membrane interne de la vésicule a disparu.  
x 90 000.

Figure 2 - Il peut exister des zones nues lors de l'invagination de la "vacuole".  
x 60 000.

Figure 3 - Disparition des PIM.  
x 80 000.

50  
cph.



BUS  
LILLE

PLANCHE IX

Cryofracture

"Vacuole nutritive"

Figure 1 - "Vacuole nutritive" bien formée.  
x 90 000.

Figure 2 - La membrane plasmique du parasite conserve ses PIM.  
x 80 000.

Figure 3 - Vue générale d'un trophozoïte moyen. Noter la présence de vésicules de micropinocytose au voisinage de la "vacuole" (flèches).  
x 50 000.

PLANCHE X

Cryofracture

Micropinocytose - Tube cytotomal

Figure 1 - Formation d'une vésicule de micropinocytose au niveau de la "vacuole nutritive" (grande flèche). Existence de vésicules pigmentaires dont le cristal est bien visible (flèches courtes).  
x 75 000.

Figure 2 - Vacuole cytotomale dont le pore est dans le plan de fracture (flèche).  
x 80 000.

Figure 3 - Détail de vésicules de micropinocytose et pigmentaire (flèche).  
x 100 000.

Figure 4 - Tube cytotomal.  
x 100 000.

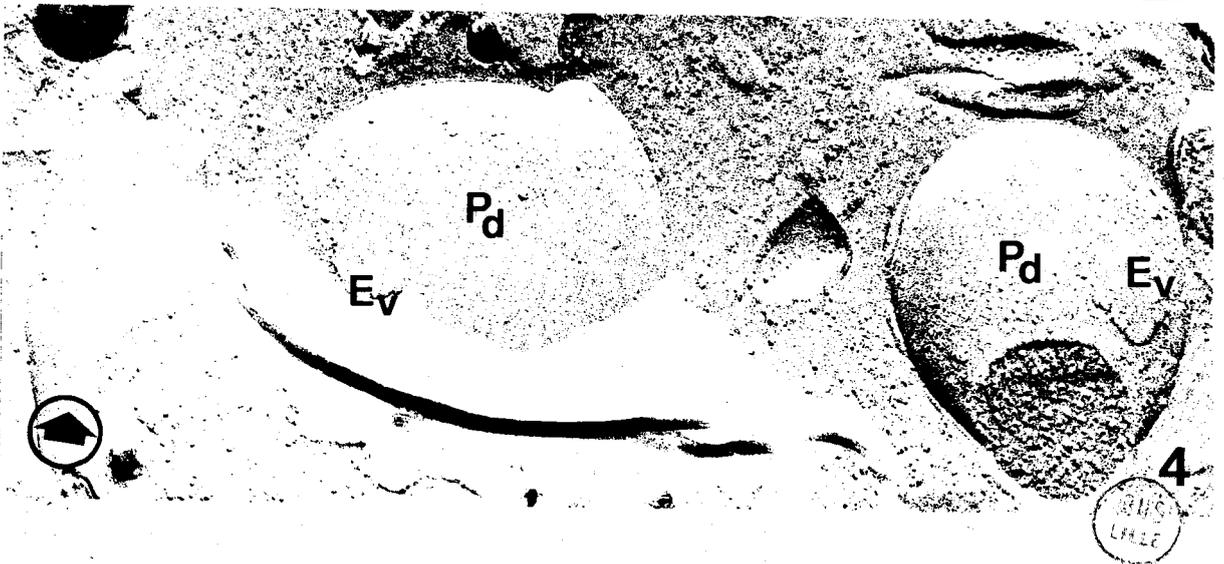
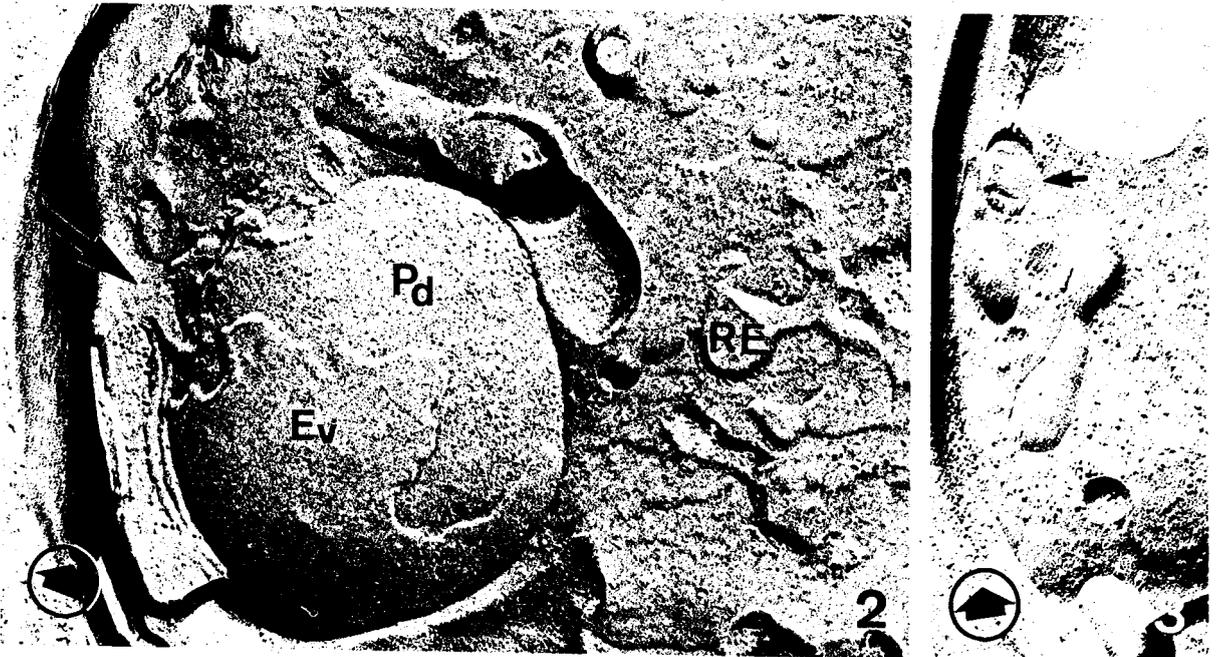


PLANCHE XI

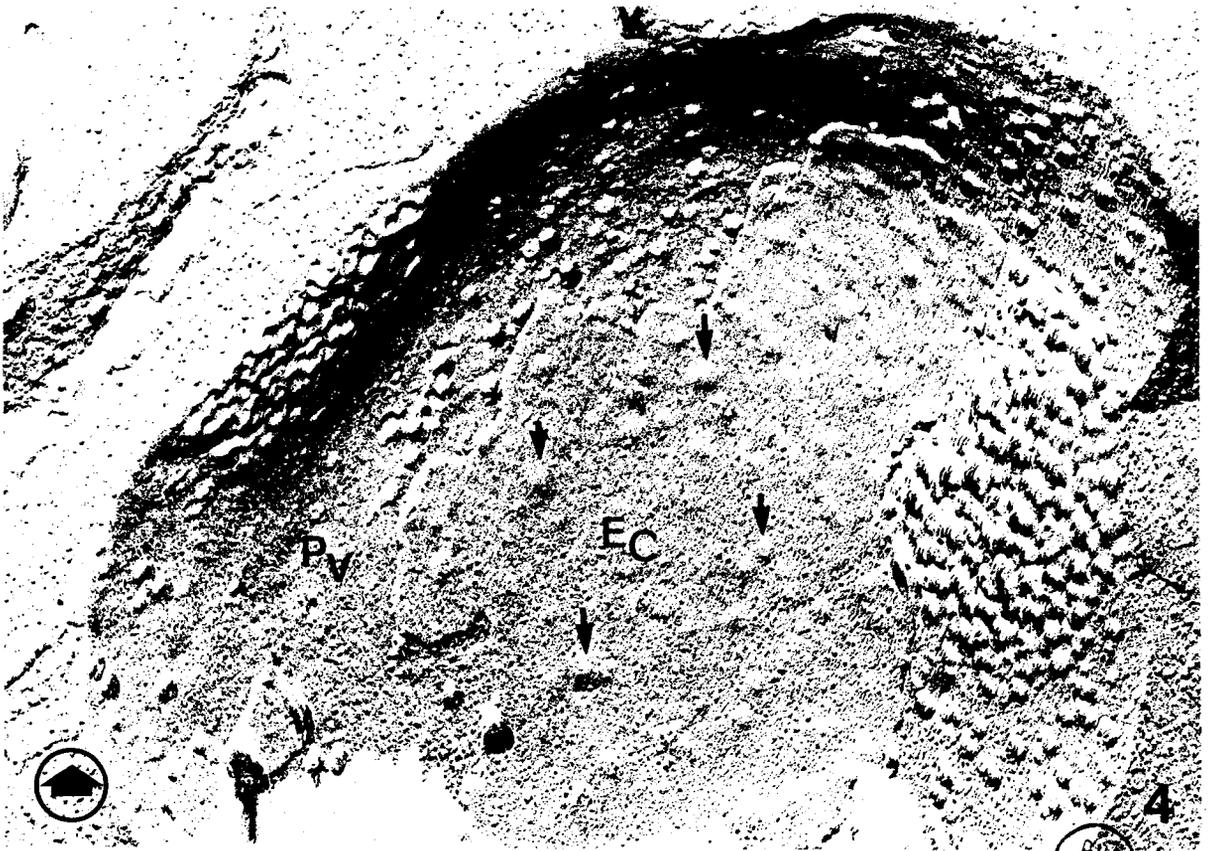
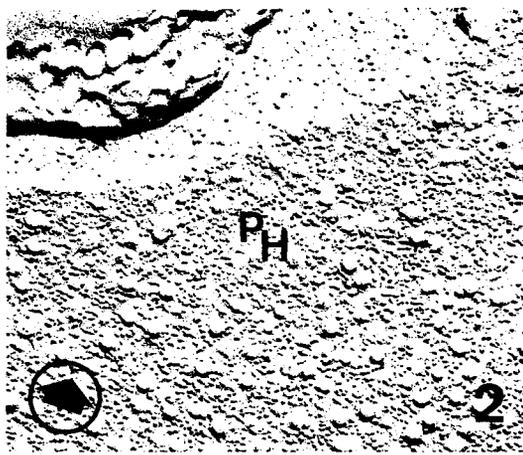
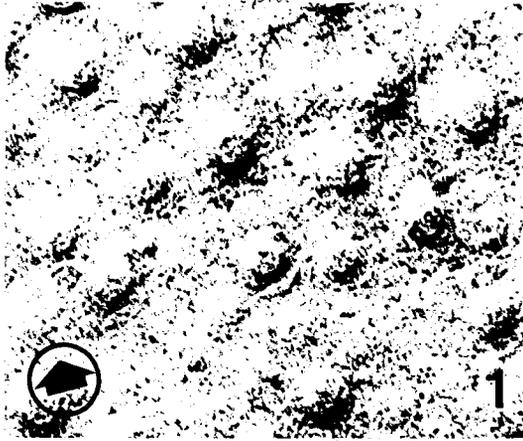
Mise en évidence des stérois membranaires

Figure 1 - Détail des lésions "en cratère".  
x 180 000.

Figure 2 - Membrane plasmique de l'hématie.  
x 90 000.

Figure 3 - Surfaces externes du parasite.  
x 75 000.

Figure 4 - Surfaces externes du parasite. Noter les boursouflures de la membrane parasitaire dues aux lésions de la membrane parasitophore (flèches).  
x 90 000.



BUS  
LILLE

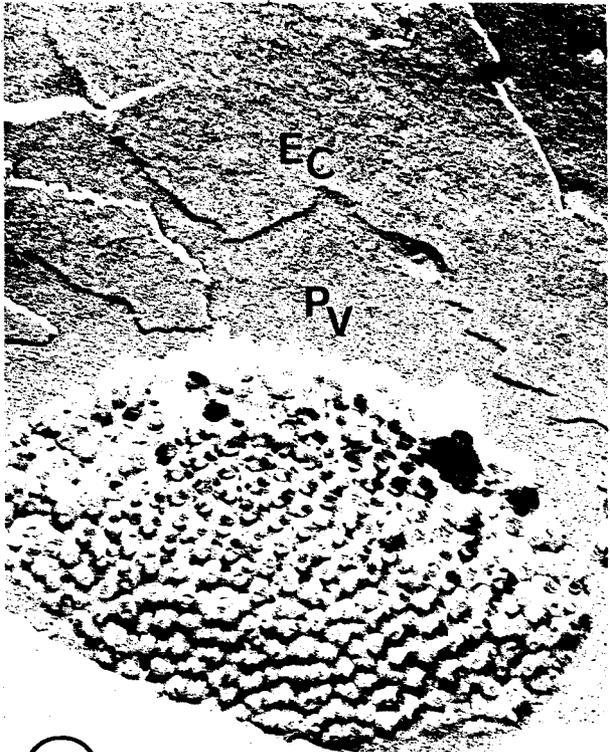
PLANCHE XII

Mise en évidence des stérois membranaires

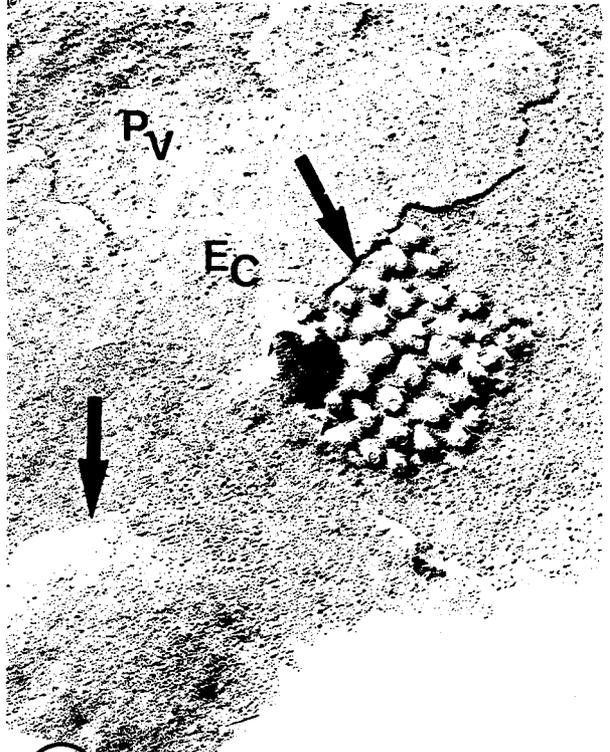
Figure 1 - Aggrégats de lésions dans la membrane parasitophore.  
x 90 000.

Figure 2 - Ces aggrégats boursouflent la membrane parasitaire.  
x 95 000.

Figure 3 - Détail. La membrane parasitaire possède toujours des PIM.  
Noter la présence d'empreintes de lésions de Py sur Ey.  
x 110 000.



1



2

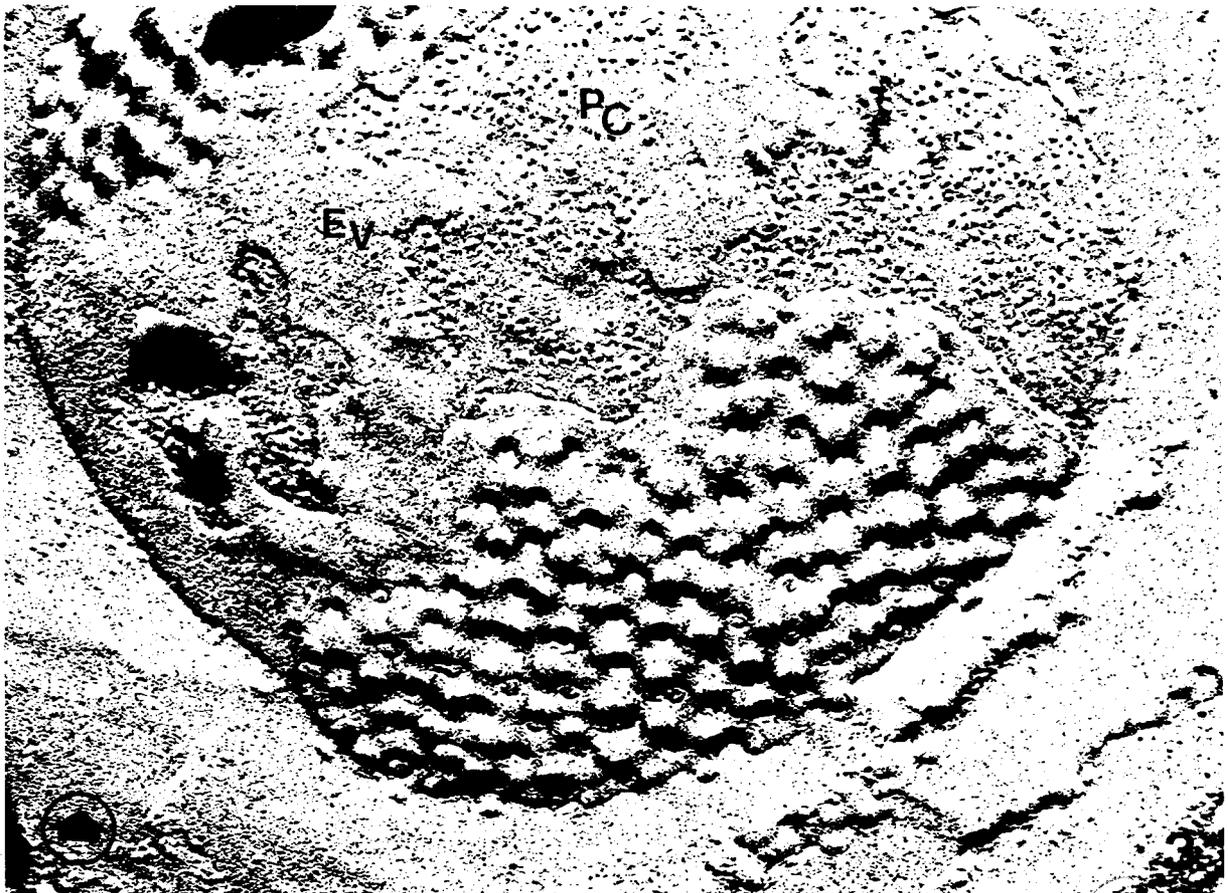


PLANCHE XIII

Mise en évidence des stérois membranaires

Figure 1 - "Vacuole nutritive" dont le pore est dans le plan de fracture (flèche).  
x 75 000.

Figure 2 - Vue générale d'un trophozoïte. Le noyau est reconnaissable par ses pores nucléaires (petites flèches). La majeure partie des vésicules de pinocytose ne possèdent pas de lésions. L'une d'entre-elles montre des boursouflures (grande flèche) sans doute dues à sa membrane interne qui existe encore.  
x 70 000.



DU'S  
LILLE

PLANCHE XIV

Mise en évidence de l'activité protéolytique (AP)

Figure 1 - Jeune trophozoïte (anneau). L'activité AP est détectée au niveau cytoplasmique et en lisière des vésicules de pinocytose en début de formation (flèche).  
x 40 000.

Figure 2 - Début de marquage de l'AP sur des vésicules en formation (flèches).  
x 70 000.

Figure 3 - Evolution du marquage de l'AP (flèches). L'activité cytoplasmique décroît chez ce trophozoïte moyen.  
x 80 000.

PLANCHE XV

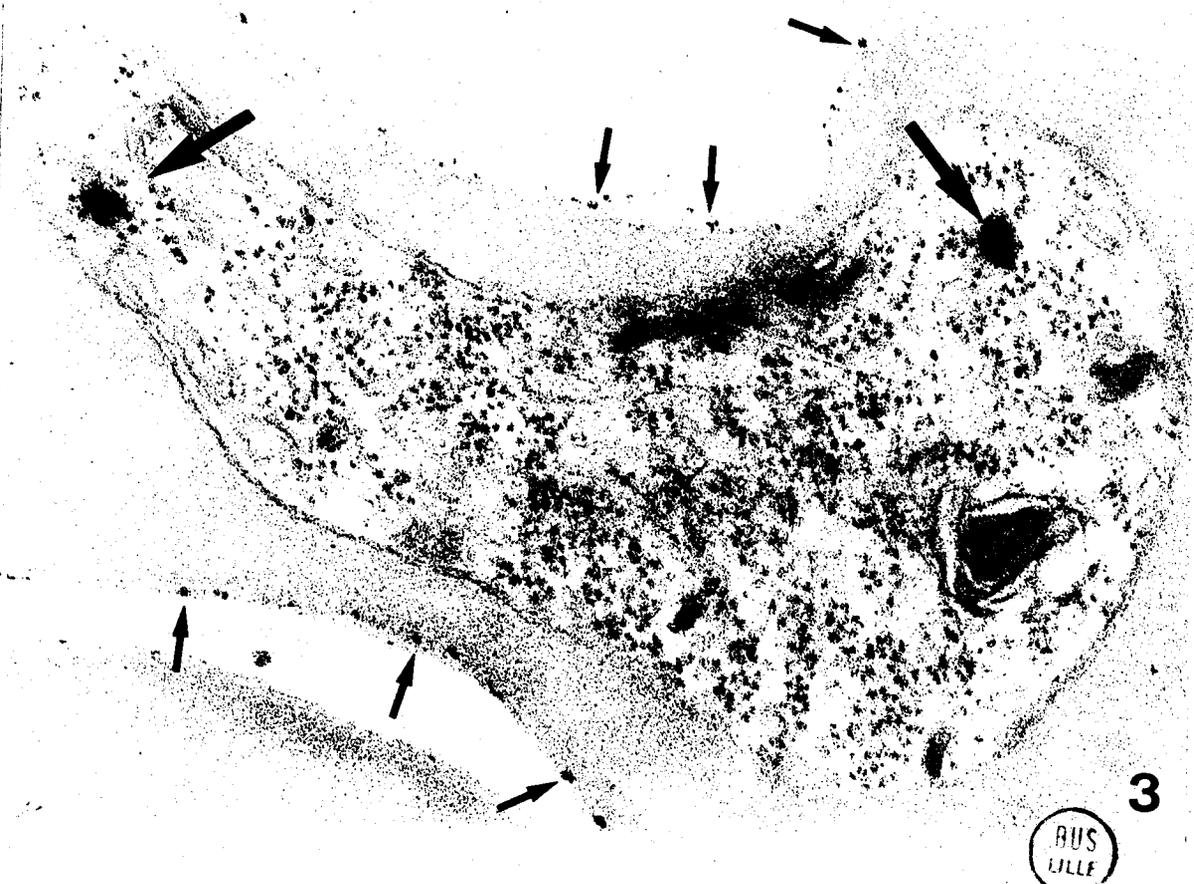
Mise en évidence de l'activité protéolytique (AP)

Figure 1 - Intensification du marquage des vésicules de pinocytose (grandes flèches). Le cytoplasme est également bien marqué. Noter la présence d'une activité protéolytique sur la membrane érythrocytaire (petites flèches).  
x 120 000.

Figure 2 - Absence de marquage des vésicules où le pigment est formé (flèches).  
x 53 000.

Figure 3 - Marquage très intense des vésicules de pinocytose d'un jeune trophozoïte (grandes flèches). Noter le précipité dû à l'AP sur la membrane de l'hématie (petites flèches).  
x 80 000.

su  
spha



BUS  
LILLE

PLANCHE XVI

Mise en évidence de l'activité protéolytique (EAA)

- Figure 1 - Très léger marquage du cytoplasme parasitaire. Présence d'une activité EAA dans les vésicules de pinocytose (grandes flèches). Noter le marquage du stroma érythrocytaire (petites flèches).  
x 65 000.
- Figure 2 - Marquage intense des vésicules de pinocytose (flèches). Absence d'activité des vésicules pigmentaires dont le cristal est bien formé.  
x 75 000.
- Figure 3 - Témoin. Absence totale de marquage. Noter la légère osmiophilie des cristaux pigmentaires.  
x 40 000.
- Figure 4 - Trophozoïte moyen. Baisse générale de l'activité EAA. Le marquage du stroma érythrocytaire est toujours présent (flèches).  
x 52 000.

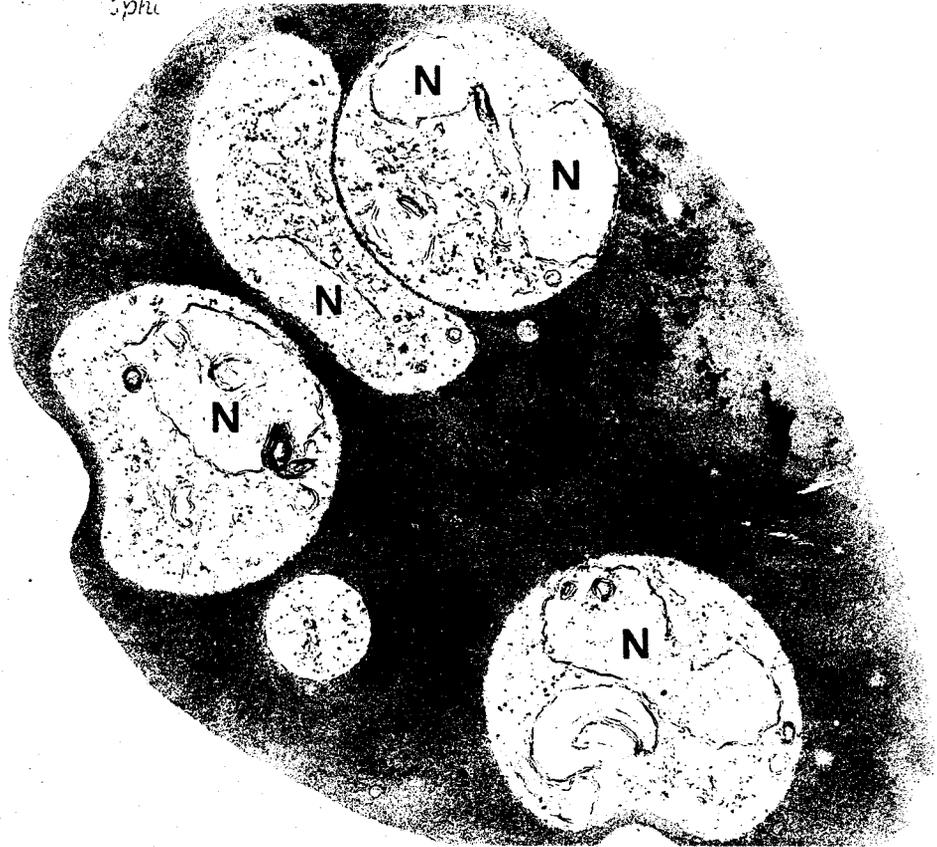
PLANCHE XVII

Description sommaire de *Babesia hylomyisci*

Figure 1 - Vue générale. Ce parasite n'est pas entouré par une vacuole parasitophore.  
x 50 000.

Figure 2 - Cryofracture.  
x 45 000.

52  
cph



1



2

BUS  
LILLE

PLANCHE XVIII

Témoins employés pour la mise en évidence de l'activité protéolytique

(Fig. 1 et 2 : AP ; Fig. 3 : EAA)

Figure 1 - Marquage cytoplasmique de *Babesia*.  
x 60 000.

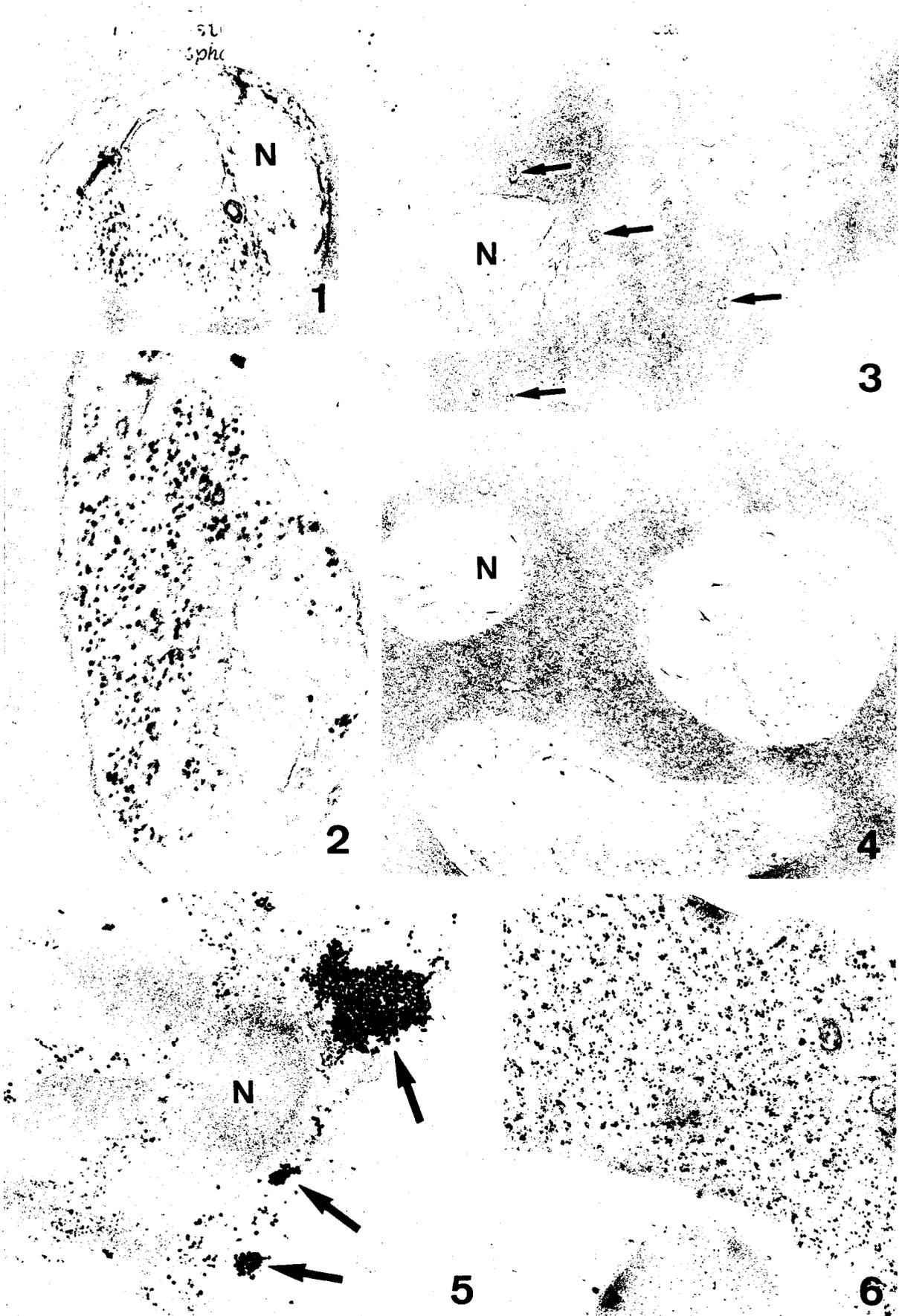
Figure 2 - Marquage cytoplasmique de *Babesia*.  
x 100 000.

Figure 3 - Absence de marquage de *Babesia*. Le stroma érythrocytaire montre une activité EAA (flèche).  
x 48 000.

Figure 4 - Témoin : absence totale de marquage.  
x 32 000.

Figure 5 - Macrophage. Marquage intense du cytoplasme (flèches).  
x 31 000.

Figure 6 - Existence d'une activité AP dans le cytoplasme du réticulocyte.  
x 40 000.



BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE  
Section de  
SCIENCES  
LILLE