Nº d'ordre :580

213-21

50376 1983

# THÈSE

50376 1983 213-2

#### présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

#### pour l'obtention du grade de

# **DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES**

par

**Guy TRONCHIN** 

# ULTRASTRUCTURE ET CYTOCHIMIE DE L'ENVELOPPE CELLULAIRE DES LEVURES (CANDIDA ALBICANS)

Localisation des composants pariétaux - Régénération -Interactions avec les cellules épithéliales



Présentée le 10 Juin 1983 devant la Commission d'Examen

- Jury : M. DURCHON
  - E. VIVIER Université de Lille I
  - B. FOURNET
  - A. VERNES Université de Lille II
  - F. MARIAT Institut Pasteur, Paris
  - J. SCHREVEL Université de Poitiers

DE CANDIDA ALBICANS

FIGURES 1 - 2 : Blastospores intactes

- Fig. 1 : Aspect classique de levure bourgeonnante après fixation glutaraldéhyde - tétroxyde d'osmium, et coloration acétate d'uranyle citrate de plomb. Les organites cellulaires, noyés dans une masse cytoplasmique uniformément dense, sont peu visibles. x 10 000.
- Fig. 2 : En l'absence de coloration, la paroi n'est pas contrastée, mais les organites cellulaires sont mieux indivídualisés que précédemment. x 34 000.
- FIGURES 3 5 : Blastospores soumises à différents traitements avant fixation.
  - Fig. 3 : Blastospore préalablement coupée à congélation, puis fixée par le glutaraldéhyde et le tétroxyde d'osmium. Le noyau, les mitochondries et la paroi sont assez bien délimités, tandis que l'identification du réticulum endoplasmique demeure difficile. Coloration acétate d'uranyle 2 mn. x 32 000.
  - Fig. 4 : Blastospore traitée par la pronase (250 μg/ml pendant 1 heure) préalablement à la fixation. Notez la bonne préservation de la plupart des organites cellulaires. Double coloration acétate d' uranyle - citrate de plomb. x 32 000.
  - Fig. 5 : Blastospore préalablement coupée à congélation. Technique de Thiery. Les organites cellulaires et les zones polysaccharidiques réactives de la paroi sont bien différenciées ; En outre, l'absence de coloration du cytoplasme laisse apparaître le réticulum endoplasmique périphérique, les amas de glycogène, le plasmalemme et ses invaginations (flèches). x 22 000.





## LOCALISATION DES MANNANES SUR COUPES ULTRAFINES DE GLYCOL METHACRYLATE (CONCANAVALINE A - PEROXYDASE)

Con A : 50 µg/ml ; H R P : 50 µg/ml.

<u>Fig. 6</u> : Section de blastospore. Aspect des organites cellulaires après coloration à l'acétate d'uranyle, les profils membranaires apparaissent en négatif en l'absence de postfixation osmiée. x 25 000.

<u>Fig. 7</u> : Réaction à l'acide périodique - thiocarbohydrazide - protéinate d'argent Les dépôts de grains d'argent sont localisés à la périphérie de la paroi (flèche) et le long du plasmalemme (double flèche). $\times 48000$ 

Fig. 8 : Section ultrafine de <u>C. albicans</u> traitée par la Concanavaline A. La réaction est particulièrement nette à la périphérie de la paroi (flèches), où 2 couches réactives sont bien individualisées. Le marquage est également abondant au niveau du cytoplasme. x 8 000.

Fig. 9 : Autre section ultrafine de blastospore montrant les 2 couches pariétales périphériques réactives à la Con A (flèches) et l'espace plus clair les séparant. x 10 000.

Fig. 10 : Section témoin. (Con A et **«**-méthyle-D-mannoside 0,2 M). Noter l'absence de tout dépôt dense aux électrons dans la paroi. x 17 000.

Les traits représentent l um.



## LOCALISATION DES MANNANES SUR COUPES ULTRAFINES DE GLYCOL METHACRYLATE (CONCANAVALINE A - MANNOSYL FERRITINE)

Con A : 100 µg/ml, Mannosyl ferritine : 100 µg/ml.

Fig. 11 : Section montrant un marquage abondant dans l'ensemble de la paroi, plus particuliérement au niveau de zones denses aux electrons (flèches opposées). Quelques particules de ferritine (flèches) sont rencontrées dans les organites cytoplasmiques. x 30 000.

Fig. 12 : Section contrôle. Con A et  $\propto$ -méthyle-D- mannoside 0,2 M. Notez l'absence de toute réaction cytoplasmique ou pariétale. x 14 000.

Fig. 13 : Même observation que sur la figure 11. Les particules de ferritine sont principalement localisées dans les couches pariétales externes, et au niveau de zones plus profondes disposées perpendiculairement à la paroi (pointillés). L'espace périplasmique (flèches) et la surface pariétale (têtes de flèches) sont également marqués . x 60 000.

Fig. 14 : Coloration acétate d'uranyle- citrate de plomb; Noter la présence de "ponts" intrapariétaux denses aux électrons, disposés radiairement (flèches), et reliant l'espace périplasmique aux couches superficielles. x 40 000.

<u>Fig. 15</u> : Au niveau du tube germinatif, le marquage demeure limité aux couches pariétales superficielles (flèches opposées) et à l'espace périplasmique (flèches), contrairement à la paroi de la blastospore parentale (astérisque). x 48 000.



#### LOCALISATION DES MANNANES

#### SUR CELLULES "INTACTES" EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE (CONCANAVALINE A - PEROXYDASE ET CONCANAVALINE A - ISOTHIOCYANATE DE FLUORESCEINE)

Con A - FTC : 250 µg/ml Con A : 100 µg/ml ; HRP : 100 µg/ml.

Fig. 16 : En fluorescence, la paroi des blastospores présente une réaction intense et homogène (flèches). x 2 000.

Fig.17 : De la même manière, lorsque la lectine est révélée par la péroxydase, la réaction apparaît localisée à la surface cellulaire (flèches). x 2 000.

Fig. 18 : Même technique que précedemment. La réaction est particuliérement intense à l'apex du tube germinatif (flèche). x 1 000.

<u>Fig. 19</u> : Section contrôle. Con A et  $\ll$ -methyl-D- mannoside 0,2 M. La paroi des blastospores est dépourvue de tout marquage. x 2 000.

#### Figs. 20 et 21 :

Cellules observées en lumière UV (fig. 20) et visible (fig. 21). Blastospores traitées par la Con A - FTC et placées en culture l heure dans un milieu de Sabouraud liquide. Seule la paroi des blastospores parentales apparaît fluorescente, alors que les bourgeons néoformés (flèches) ne font l'objet d'aucune réaction. x l 000.

#### Figs. 22 et 23 :

Cellule observée en lumière UV (fig. 22) et visible (fig. 23). Formes de blastèse traitées par la Con A - FTC et remises en culture 1 heure dans le milieu 199. Seules les parois des blastospores parentales, et des tubes germinatifs formés antérieurement au traitement, demeurent marquées. Les structures néoformées (flèches) ne montrent aucune fluorescence. x 3 000.



## CELLULES PREALABLEMENT COUPEES A CONGELATION : MISE EN EVIDENCE D'UN REVETEMENT PARIETAL (CONCANAVALINE A - PEROXYDASE)

Con A : 100 µg/ml ; HRP : 100 µg/ml.

Fig. 24 : La surface pariétale est recouverte d'intenses précipités denses aux électrons, (flèches), tandis que la paroi n'est pas colorée. x 12 000.

Fig. 25 : Cette micrographie montre une réaction hétérogène du revêtement parietal (flèches opposées). La face externe de la paroi est légérement marquée (grande flèche) et quelques dépôts denses sont également présents le long du plasmalemme (petites flèches). x 35 000.

Fig. 26 : Fort grossissement de la paroi d'une blastospore montrant le marquage irrégulier au niveau de l'espace périplasmique (flèches). x 50 000.

Fig. 27 : La surface des tubes germinatifs (flèches) fait également l'objet d'une réaction très intense. x 12 000.

Fig. 28 : Blastospores incubées dans la pronase (250  $\mu$ g/ml) et le mercaptoethanol (0,2 M) pendant une heure à 37° C, puis traitées comme précedemment. Le revêtement pariétal (flèches) a été partiellement extrait. x 10 000.





## ASPECT ULTRASTRUCTURAL DE L'ENVELOPPE CELLULAIRE CHEZ DES BLASTOSPORES TRAITEES PAR LA TECHNIQUE DE THIERY

Fig. 29 : Les dépôts de protéinate d'argent localisés à la périphérie de la paroi délimitent deux couches concentriques (flèches). Le plasmalemme et l'espace périplasmique sont également intensément contrastés (têtes de flèches). Fixation glutaraldéhyde/O<sub>S</sub> O<sub>A</sub> . x20 000.

<u>Fig. 30</u> : Chez les cellules âgées, une grande partie de la paroi fait l'objet d'un marquage (flèches opposées), tandis que l'épaisseur de la zone interne non colorée demeure la même que chez les cellules jeunes. Comme précedemment, le revêtement pariétal n'est pas individualisé sur cette micrographie. Fixation glutaraldéhyde/0<sub>s</sub> 0<sub>4</sub>. x 20 000.

Fig. 31 : La technique de Thiery réalisée sur des blastospores fixées uniquement au glutaraldéhyde, et incluses dans le GMA, révèle la présence d'un matériel filamenteux à la périphérie de la paroi (flèches). x 40 000.

Fig. 32 : Sur certaines sections de blastospores, en plus des réactions observées précedemment (figs. 29 et 30), la paroi apparaît recouverte par un matériel très légérement contrasté (flèches). Fixation glutaraldéhyde/0<sub>s</sub> 0<sub>4</sub> - Inclusion milieu de Spurr. x 17 000.

Fig. 33 : Technique de Thiery appliquée à des blastospores préalablement traitées par la méthode Con A - HRP. Comme dans la figure 29, la paroi et l'espace périplasmique montrent une forte réaction (flèches blanches opposées). Le revêtement pariétal (flèches noires opposées), revélé par la technique Con A - HRP (voir figs. 24 - 25) est bien individualisé. x 17 000.



BLASTOSPORES PREALABLEMENT COUPEES A CONGELATION. EFFETS D'UN TRAITEMENT PAR LA PRONASE ET ET LE 2 - MERCAPTOETHANOL (CONCANAVALINE A - MANNOSYL FERRITINE)

Con A : 100 µg/ml ; Mannosyl ferritine : 100 µg/ml.

Figs. 34 à 36 : Blastospores sectionnées aucryostat.

- Fig. 34 : Les particules de ferritine (flèches) sont uniquement localisées à la surface du revêtement pariétal (flèchesopposées). x 30 000.
- Fig. 35 : La réaction de Thiery ne révèle aucune différence de coloration entre les zones réactives périphériques de la paroi des cellules filles et mères. Chez ces dernières cependant, le revêtement pariétal (flèches) semble plus développé. x 30 000.
- Fig. 36 : Les sites recepteurs de la Con A, revélés par les particules de ferritine, montrent une répartition identique (flèches) au niveau du revêtement pariétal des cellules mères et filles. x 30 000.

Figs. 37 - 38: Blastospores traitées par la pronase et le 2 - mercaptoéthanol, puis sectionnées au cryostat.

- Fig. 37 : Réaction de Thiery. Le traitement par la pronase élimine la plupart des composés polysaccharidiques externes de la paroi des jeunes cellules (flèche), alors que la paroi des cellules parentales semble peu affectée. x 30 000.
- Fig. 38 : Un tel traitement rend accessible les sites recepteurs intrapariétaux. Le marquage s'étend alors aux zones plus internes de la paroi des cellules filles (flèches) et parentales (têtes de flèches). x 50 000.



REGENERATION DU REVETEMENT PARIETAL (CONVANAVALINE A - PEROXYDASE)

Con A : 100 µg/ml; HRP : 100 µg/ml.

Figs. 39 - 40 : Expérience de contrôle.

- Fig. 39 : Con A et Q-methyle-D-mannoside 0,2 M. La paroi est dépourvue de tout marquage. x 20 000.
- Fig. 40 : Omission de la péroxydase. Noter la présence de légers précipités sur les crètes mitochondriales (flèches). x 28 000.

Fig. 41 : Aspect bilaminé typique de la paroi après coloration acétate d'uranyle -Citrate de plomb montrant une couche externe dense aux electrons (têtes de flèches) et une zone interne plus épaisse non contrastée (flèche). x 28 000.

#### Figs. 42 - 43 :

Blastospores traitées par la pronase et le 2 mercaptoéthanol, puis mises en culture. Evolution du marquage (flèches) au niveau du revêtement pariétal après 1/2 heure (fig. 42) et 2 heures (fig. 43) de régénération. Comparer avec des cellules intactes après 24 heures de culture (fig. 24) et avec la redistribution des sites recepteurs à la Con A visualisée par le mannosyl ferritine (fig. 44 à 47) Fig. 42, x 22 000 ; Fig. 43, x 16 000.





## REGENERATION DU REVETEMENT PARIETAL (CONCANAVALINE A - MANNOSYL FERRITINE).

Con A : 100 µg/ml ; Mannosyl ferritine : 100 µg/ml.

<u>Figs. 44 à 47</u> : Evolution du marquage au temps 0, (fig. 44), et après 1/2 heure (fig. 45) et 2 heures (fig 46) de régénération. Comparer avec des cellules non traitées après 24 heures de culture (figs.47 et 48). C'est à partir de telles figures que les comptages des particules de ferritine ont été effectués. Fig. 44, x 25 000 ; Figs. 45, 46, 47, x 40 000.

Fig. 48 : Paroi isolée. Le revêtement pariétal (flèches) et les zones internes de la paroi (têtes de flèches) font l'objet d'un marquage. Remarquer l'intensité de la réaction (cercle) au niveau de la cassure. x 30 000.

<u>Figs. 49 - 50</u> : L'utilisation de coupes à congélation favorise la pénétration des marqueurs. Dans ce cas, les vacuoles (fig. 49), et les zones internes de l'enveloppe cellulaire (fig. 50, têtes de flèches), font l'objet d'un marquage. Ces dernieres demeurent toutefois nettement moins accessibles que sur les parois isolées (comparer avec la fig. 48). Fig. 49, x 50 000 ; Fig. 50, x 65 000.



#### MISE EN EVIDENCE DU REVETEMENT PARIETAL PAR LES COLORANTS CATIONIQUES

Fig. 51 : Ferritine cationisée fluorescente. Formes de blastèse. La réaction est particuliérement intense au niveau des tubes germinatifs (flèches). Le trait représente 5 µm. x 2 000.

Fig. 52 : Ferritine cationisée. A l'exception des cicatrices de bourgeonnement (asterisques), le marquage s'étend à l'ensemble des zones pariétales superficielles (flèches). x 20 000.

<u>Fig. 53</u> : Ferritine cationisée. Fort grossissement montrant la disposition, en aggrégats orientés perpendiculairement à la paroi, des particules de ferritine (flèches). x 120 000.

Fig. 54 : Acide phosphotungstique à bas pH - Blastospore - Le revêtement pariétal (flèches), et l'espace périplasmique (têtes de flèches), sont intensément colorés. x 40 000.

Fig. 55 : Acide phophotungstique à bas pH - Tube germinatif. Comme précédemment, le revêtement pariétal est nettement mis en évidence par cette coloration. x 40 000.

Fig. 56 : Acide phosphotungstique à bas pH - Experience de contrôle. Après traitement des coupes par la trypsine à 1 %,l'affinité du revêtement pariétal (flèches), et de l'espace périplasmique (têtes de flèches), pour le PTA, est considérablement diminuée. x 32 000.

Fig. 57 : Rouge de ruthénium - Cellule en bourgeonnement. L'ensemble des zones pariétales superficielles est fortement contrasté (flèche), à l'exception des cicicatrices de bourgeonnement (astérisques). x 10 000.



#### EVOLUTION DU REVETEMENT PARIETAL AU COURS DE L'AGITATION DES CELLULES (CONCANAVALINE A - MANNOSYL FERRITINE )

<u>Fig. 58</u> : De nombreux fragments d'origine pariétale (astérisques), dont seule l'une des 2 faces est marquée par la ferritine, sont rencontrés entre les cellules. Noter l'irrégularité du marquage (têtes de flèches) au niveau des parois cellulaires. x 34 000.

Fig. 59 : Désorganisation du revêtement pariétal d'une blastospore (flèches) et libération de ses constituants dans le milieu ambiant (astérisque). x 14 000.

Fig. 60 : Autre aspect de matériel libéré au cours de l'agitation des levures. Noter la répartition linéaire des particules de ferritine. x 64 000.



#### LOCALISATION DE LA CHITINE AU NIVEAU DES CICATRICES DE BOURGEONNEMENT

Figs. 61 à 64 : Réaction de Thiery - Différents aspects des cicatrices de bourgeonnement.

- Figs. 61 62 : Au cours du bourgeonnement la séparation des 2 cellules laisse sur la blastospore mère une cicatrice de bourgeonnement. Celle-ci apparaît constitué d'un bourrelet moyennement dense aux electrons (astérisques) limité extérieurement par un anneau plus clair ou septum primaire (flèches).x24 000.
- <u>Figs. 63 64</u>: Vue du septum primaire (astérisques). Celui- ci apparaît constitué de microfibrilles (petites flèches) dont l'orientation est différente de celles du squelette interne (grandes flèches). Fig. 63,x 30 000 ; Fig. 64,x 60 000.

Fig. 65 : Coloration acétate d'uranyle citrate de plomb. L'aspect de la cicatrice de bourgeonnement (petite flèche), et l'organisation du squelette microfibrilaire interne (grande flèche), sont identiques aux figures précédentes. x 24 000.

Fig. 66 - 67 :

Localisation de la chitine au niveau des cicatrices de bourgeonnement, par la WGA et le chitobiosyl ferritine (fig. 66, flèches) ou le chitobiosyl péroxydase (fig. 67, flèches) - Cellules "intactes". Fig. 66, x 50 000 ; Fig. 67, x 40 000.

















#### LOCALISATION DE LA CHITINE

## DANS LA PAROI DE CELLULES PREALABLEMENT COUPEES AU CRYOSTAT (WGA - FTC et WGA - CHITOBIOSYL PEROXYDASE)

WGA - FTC : 250 µg/ml. WGA : 100 µg/ml ; chitobiosyl - péroxydase : 100 µg/ml.

<u>Fig. 68</u> : Réaction de Thiery. La paroi consiste en une couche dense aux électrons (petites flèches) entourant des zones claires peu réactives (astérisques). Le squelette microfibrillaire interne est bien mis en évidence par cette coloration (grandes flèches). x 27 000.

Fig. 69 : Cellules en bourgeonnement. L'organisation bilaminée du bourgeon est identique à celle de la cellule parentale. Les zones pariétales internes, claires aux électrons, affleurent au niveau des cicatrices de bourgeonnement (flèches). x 24 000.

Fig. 70 : WGA - FTC. Blastospores coupées à congélation. Remarquer une intense fluorescence (grandes flèches) de 2 blastospores, tandis que d'autres cellules (petites flèches) présentent une légère fluorescence irrégulière. La paroi des cellules intactes (têtes de flèches) n'est pas réactive . Le trait représente 5 µm. x 2 000.

Fig. 71 : Expérience de contrôle. WGA et N - acetyl - D - glucosamine 0,5 M. Aucune réaction n'est observée ni dans la paroi ni au niveau des cicatrices de bourgeonne-ment. x 26 000  $\cdot$ 

Fig. 72 : WGA et chitobiosyl péroxydase. La paroi est entourée d'un léger mais régulier dépôt dense aux électrons (double flèche). Au niveau des cicatrices de bourgeonnement, le marquage est discontinu (flèches claires). Le dépôt surmontant les cicatrices semble s'ancrer plus profondément (flèches - Comparer avec la figure 64) x 30 000.



#### LOCALISATION DE LA CHITINE SUR CELLULES PREALABLEMENT COUPEES AU CRYOSTAT (WGA et CHITOBIOSYL FERRITINE)

WGA : 100 µg/ml ; chitobiosyl ferritine : 100 µg/ml.

Fig. 73 : Remarquer les dépôts irréguliers de particules de ferritine à la surface de la cicatrice de bourgeonnement (doubles flèches). x 64 000.

Fig. 74 : Cellule cassée lors de son passage au cryostat. La surface interne de la paroi est réguliérement marquée (flèches). Quelques particules de ferritine sont observées au niveau de zones intrapariétales superficielles, et dans la vacuole (doubles flèches). x 47 000.

.....

Effets du traitement par la pronase et le 2 mercaptoéthanol - réaction de Thiery.

Fig. 75 : Fort grossissement de la paroi montrant le squelette microfibrillaire interne (flèches).  $\times$  50 000.

<u>Fig. 76</u> : Cellule en bourgeonnement - Les couches pariétales externes de la cellule fille ont été extraites (flèche) tandis que la paroi de la cellule mère est peu affectée (astérisque). Comparer avec la fig. 69. x 22 000.

Fig. 77 : Jonction cellule mère - cellule fille (flèches) altérée par la digestion enzymatique. Comparer avec la fig. 69. x 35 000.



## LOCALISATION DE LA CHITINE SUR CELLULES PREALABLEMENT TRAITZES PAR LA PRONASE ET LE 2 MERCAPTOETHANOL, PUIS COUPEES A CONGELATION (WGA - FTC ET WGA - CHITOBIOSYL PEROXYDASE)

WGA - FTC : 250 µg/ml. WGA : 100 µg/ml ; chitobiosyl péroxydase : 100 µg/ml.

<u>Figs.78</u> : <u>a et b</u> \_ WGA - FTC. Seule la paroi des bourgeons est fluorescente. Aucune réaction n'est observée au niveau des blastospores mères (flèches). Les traits représentent 5 μm. x 2 000.

Fig. 79 : Comme précedemment, seules les couches pariétales internes de la cellule fille présentent un dépôt opaque aux électrons (flèches). x 12 000.

<u>Fig. 80</u> : Même type de figure. Remarquer la présence d'un marquage intense et uniforme des couches pariétales internes, étroitement associé au plasmalemme (grande flèche). Quelques vésicules cytoplasmiques (petites flèches) font également l'objet d'un marquage. x 32 000.

Fig. 81 : Section contrôle. WGA et N-acetyl-D-glucosamine 0,5 M. Les cellules sont dépourvues de toute réaction. x 15 000.

Fig. 82 : Microscopie photonique. Une réaction est observée entre les cellules mère et fille (flèche). Le trait représente 5 µm. x 20 000.

<u>Fig. 83</u> : L'examen ultrastructural de cellule bourgeonnante revèle un dépôt dense aux électrons (grosse flèche) à la jonction cellule mère - cellule fille. Quelques légers dépôts sont également observés dans la paroi de la cellule fille (petites flèches). x 40 000.



LOCALISATION DE LA CHITINE SUR CELLULES TRAITEES PAR LA PRONASE ET LA CHITINASE, ET SUR COUPES ULTRAFINES DE GMA (WGA ET CHITOBIOSYL FERRITINE - WGA ET CHITOBIOSYL PEROXYDASE - WGA - FTC).

WGA : 100 μg/ml ; chitobiosyl ferritine : 100 μg/ml. WGA : 100 μg/ml ; chitobiosyl péroxydase : 100 μg/ml. WGA - FTC : 250 μg/ml.

<u>Fig. 84</u> : Technique de Thiery. La paroi **de** <u>la</u>cellule fille et la jonction cellule mère - cellule fille (astérisques) ont été presque complétement extraites. Seules quelques composants des zones internes demeurent (petites flèches). Les couches périphériques de la cellule mère sont également altérées (grandes flèches), mais les zones internes sont intactes. x 14 000.

Figs 85 : <u>a et b</u> — WGA - FTC. La paroi des cellules mères apparaît très fluorescente, tandis qu'aucune réaction n'est observée sur les cellules filles (flèches). Les traits représentent 5  $\mu$ m. x 2 000.

<u>Fig. 86</u> : WGA et chitobiosyl ferritine. Après traitement par la pronase et la chitinase, aucun site recepteur à la WGA n'est detecté au niveau des cicatrices de bourgeonnement (flèches). x 28 000.

Fig. 87 : WGA et chitobiosyl péroxydase. Contrairement aux réactions obtenues en fluorescence (fig. 85), aucune réaction n'est observée au niveau de la cellule mère par cette méthode. x 23 000.

#### Figs. 88 et 89 :

WGA et chitobiosyl ferritine - Coupes ultrafines de GMA montrant la présence de particules de ferritine à la périphérie (doubles flèches) et dans les zones internes (flèches) de la paroi des blastospores (fig. 88) et des tubes germinatifs (fig. 89). fig. 288, x 34 000 ; fig. 89, x 100 000.





## LOCALISATION DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE ACIDE AU NIVEAU DES STRUCTURES CYTOPLASMIQUES

Fig. 90 : Expérience de contrôle - Milieu de Gomori et fluorure de sodium 1 %. Aucun précipité n'est observé. x 9 000.

<u>Fig. 91</u> : Blastospore traitée par la méthode de Gomori, après 24 heures de culture sur milieu de Saboura**ud**. Les vacuoles, l'espace périplasmique et le plasmalemme (flèches) sont intensément marqués, de même que la cicatrice de bourgeonnement (double flèche). x 15 000.

Fig. 92 : Notez la présence de zones cytoplasmiques périphériques marquées (flèches), en relation avec l'espace périplasmique. x 24 000.

Fig. 93 : La réaction est présente au niveau du réticulum endoplasmique (flèches). x 30 000.

#### Figs. 94 et 95 :

Les précipités de phosphate de plomb révélent une formation évoquant l'appareil de Golgi, tant au niveau des blastospores (fig. 94), que des formations mycéliennes (fig. 95). Celui-ci pourrait être à l'origine des petites inclusions (flèches) qui font également l'objet d'un marquage. fig. 94, x 60 000 ; fig. 95, x 34 000.

Fig. 96 : Ces mêmes inclusions (flèches) sont rencontrées près de la paroi à l'apex des cellules en bourgeonnement. x 20 000.





## LOCALISATION DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE ACIDE AU NIVEAU DE L'ENVELOPPE CELLULAIRE DES BLASTOSPORES

Fig. 97 : Après incubation des levures 3 heures sur sérum, la réaction se localise au niveau de l'espace périplasmique et du plasmalemme (flèches). Aucun marquage cytoplasmique ni pariétal n'est observé. x 18 000.

Fig. 98 : Détail du marquage au niveau du plasmalemme et des invaginations. x 30 000.

#### Figs. 99 à 102 :

Différents types de réactions (flèches) observés à la surface des blastospores, et démontrant une évolution concentrique du marquage pariétal, de la zone périplasmique vers la périphérie cellulaire. Noter l'importance des globules lipidiques et leurs relations avec les vacuoles. Figs. 99 a et 101 x, 18 000 fig. 99 b, x 46 000 ; figs 100 et 102, x 20 000.





## LOCALISATION DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE ACIDE AU NIVEAU DE L'ENVELOPPE CELLULAIRE DES ELEMENTS MYCELIENS

Figs. 103 à 106 :

Noter le contraste des réactions obtenues au niveau de l'espace périplasmique (grandes flèches) et du revêtement pariétal (têtes de flèches) entre les éléments mycéliens (tubes germinatifs, figs. 103 et 104 ; mycélium fig. 105 ; ou pseudomycélium fig. 106) et les blastospores qui les ont initiés. Ces dernieres ne présentent pratiquement plus de réaction à la surface de leur paroi (petites flèches). Fig. 103,x 26 000 ; Fig. 104,x 12 000 ; Fig. 105,x 10 000 ; Fig. 106,x 18 000.

Fig. 107 : Remarquer l'important marquage de la zone de jonction blastospore pseudomycélium (flèches) au moment de la désarticulation des deux éléments. x 20 000.

Fig. 108 : Ce marquage persite au niveau des cicatrices de bourgeonnement (flèche). x 16 000.





## LOCALISATION DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE ACIDE AU COURS DU DEVELOPPEMENT CELLULAIRE

Fig. 109 : Noter l'absence de réaction pariétale ou cytoplasmique du bourgeon dès sa formation, comparativement à la cellule mère (flèches). x 10 000.

Fig. 110 : Ultérieurement, la réaction (flèches) est nette dans les vacuoles, le réticulum endoplasmique, les zones pariétales basales de la cellule fille. x 15 000.

Fig. 111 : Le marquage (flèches) s'intensifie après la formation du septum. x 14 000.

Fig. 112 : Comme précédemment, la paroi, le plasmalemme et les vacuoles (flèches) sont bien colorées au moment de la séparation des deux blastospores. x 15 000.

Fig. 113 : La plupart des blastospores de la souche L ne montrent pas de réactions pariétales (têtes de flèches). Les dépôts de phosphate de plomb (flèches) sont localisés uniquement dans le cytoplasme. x 7 500.

Fig. 114 : Blastospores du clône [32] . Contrairement à la micrographie précédente, la paroi des blastospores (flèches) fait l'objet d'un marquage intense. C'est à partir de telles figures que la distribution de l'activité enzymatique des deux souches a été établie. x 7 500.





## DIVERS ASPECTS DES SPHERO - PROTOPLASTES OBTENUS APRES INCUBATION DES BLASTOSPORES DANS LA PRONASE, PUIS LA CHITINASE.

Figs. 115 à 119 : Réaction de Thiery

- Fig. 115 : Cellule bourgeonnante. La paroi de la blastospore fille est totalement lysée, alors que celle de la blastospore mère est peu altérée. x 16 000.
- Fig. 116 : Même observation que précedemment au niveau d'un tube germinatif. Ce dernier ainsi débarassé de sa paroi conserve, contrairement aux blastospores, sa morphologie initiale. Sur certaines cellules, l'attaque de la paroi s'effectue de manière plus inégale (flèches et têtes de flèches). x 12 000.
- Fig. 117 : Vue d'ensemble montrant une extraction plus homogène des composants pariétaux sur l'ensemble de la périphérie cellulaire, sauf au niveau des zones de naissance (flèches) et de bourgeonnement (têtes de flèches). x 8 000.
- Fig. 118 : Même type de figure que précedemment. Jonction cellule mère - cellule fille. Les zones latérales limitant la cicatrice de naissance (flèches) et de bourgeonnement (têtes de flèches) apparaissent plus résistantes à l'attaque enzymatique. x 32 000.
- Fig. 119 : Sur ce sphéro-protoplaste, de rares composants polysaccharides pariétaux (flèches) demeurent après le traitement enzymatique. x 20 000.

<u>Fig. 120</u> : La double coloration révèle l'inégalité de l'attaque enzymatique et met en évidence la persistance de composants protéiques à la périphérie des cellules (flèches).**x20 000**.





#### ASPECT DES SPHERO-PROTOPLASTES APRES 1/2 HEURE DE REGENERATION

Fig. 121 : Technique de Thiery (24 heures de TCH). Les particules de glycogène fortement contrastées sont réparties en périphérie de la cellule, le long du plasmalemme. Quelques dépôts polysaccharidiques (flèches) recouvrent par place la surface cellulaire. x 12 000.

Fig. 122 : Technique de Thiery (1 heure de TCH). La paroi est colorée comme précedemment, mais les particules de glycogène sont peu marquées. x 16 000.

Fig. 123 : Double coloration. L'aspect des particules de glycogène est identique aux figures précédentes, mais leur coloration est plus hétérogène. La paroi est uniformément contrastée. x 12 000.

Figs. 124 - 126 : Réactions de contrôle de la coloration de Thiery

- Fig. 124 : En l'absence de TCH, les particules de glycogène et la paroi ne sont pas marquées. x 16 000.
- Fig. 125 : Une légère coloration des particules de glycogène et des cytomembranes est observée en l'absence d'oxydation périodique. x 12 000.
- Fig. 126 : Le remplacement de l'acide périodique par le peroxyde d'hydrogène n'entraîne aucun dépôt d'argent. x 16 000.





## DIFFERENTS STADES EVOLUTIFS DES SPHERO-PROTOPLASTES AU COURS DE LA REGENERATION

Figs. 127 - 130 : Double coloration.

- Fig. 127 : Sphéro-protoplaste après 1/2 heure de régénération. Après une phase d'élongation dans le cytoplasme, les invaginations du plasmalemme s'infléchissent (flèches), entourant parfois des particules de glycogène. x 40000.
- Fig. 128 : La fusion des invaginations avec le plasmalemme entraîne, après une heure de régénération, le découpage du cytoplasme périphérique en petits territoires (astérisques). x 40 000.
- Fig. 129 : Phase de rejet dans la paroi d'une portion de cytoplasme (flèche) au bout d'une heure de régénération. x 40 000.
- Fig. 130 : Même stade que précedemment mais le territoire cytoplasmique est ici observé au sein de la paroi qui présente un aspect plus classique. Noter la présence de ribosomes au sein de cette structure, et les altérations par place (flèches) de la membrane unitaire qui l'entoure. x 40 000.

Figs. 131 - 133 : Technique de Thiery.

- Fig. 131 : Coupe tangentielle d'une blastospore après 1/2 heure de régénération montrant l'expansion considérable des invaginations membranaires (flèches). x 44 000.
- Fig. 132 : Même stade que précedemment. Figure d'inflexion d'une invagination du plasmalemme (flèche) autour d'un amas de particules de glycogène. x 68 000.
- Fig. 133 : Même figure que 128, mais les particules de glycogène sont cette fois bien visibles au sein du territoire cytoplasmique ainsi isolé (astérisque). x 34 000.



## DIFFERENTS STADES DE REGENERATION DES PROTOPLASTES TECHNIQUE DE THIERY

<u>Fig. 134</u> : Vue d'ensemble d'une blastospore après une heure de régénération montrant les nombreux ilôts cytoplasmiques (flèches) rejetés dans la paroi. A ce stade, le glycogène est plus uniformément réparti dans la cellule. x 16 000.

Fig. 135 : Même stade que la figure 134. Remarquer la présence de particules polysaccharidiques (têtes de flèches) dans un territoire cytoplasmique. Les dépôts d'argent sont abondants au niveau des cavités du réticulum endoplasmique périphérique (flèches). x 24 000.

Fig. 136 : Même stade que les figures précédentes. Remarquer dans la paroi, la présence de granulations polysaccharidiques (flèches) dont l'aspect morphologique s'apparente à celui du glycogène cytoplasmique. x 30 000.

Fig. 137 : Après deux heures de régénération, la coalescence de ces granulations aboutit à la formation de couches constitutives de la paroi (flèches). Noter la présence au sein de cette nouvelle couche pariétale d'un territoire cytoplasmique intact (doucle flèche). x 18 000.

Fig. 138 : Après 1/2 heure de régénération, il est fréquent de rencontrer dans le cytoplasme des structures finement marquées délimitant des territoires grossièrement hexagonaux (astérisques). Il pourrait s'agir de l'appareil de Golgi. Remarquer l'identité de marquage entre certaines portions périphériques de cette formation (flèches) et des particules de glycogène avoisinantes (doubles flèches) x 60 000





## DIFFERENTS ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX DE SPHERO-PROTOPLASTES EN REGENERATION\_REACTION DE THIERY

Fig. 139 : Micrographie montrant la fusion et l'étalement des paticules polysaccharidiques (flèches) après leur rejet dans la paroi. x 60 000.

Fig. 140 : Autre aspect des expansions du réticulum endoplasmique périphérique (flèches). x 50 000.

Fig. 141 : Occasionnellement des amas de petites vésicules cytoplasmiques (flèches) s'observent à proximité du plasmalemme des cellules en régénération. x 30 000.

#### Figs. 142 - 143 :

Autres aspects morphologiques de l'appareil de Golgiqui peut se présenter sous forme d'un empilement grossier de fines lamelles (fig. 142) ou sous forme de structures contournées et digitées (fig. 143). x 62 000





## EVOLUTION DES VACUOLES AU COURS DE LA REGENERATION DES SPHERO-PROTOPLASTES DANS UN MILIEU CONTENANT 20 G DE GLUCOSE/LITRE.

Fig. 144 : Coloration acétate d'uranyle\_citrate de plomb. Figure de phagocytose de mitochondrie et de globule lipidique par la vacuole d'un sphéro-protoplaste. x 22000.

Fig. 145 : Technique de Thiery. Processus de fragmentation d'une vacuole (flèches) a**pr**ès 1/2 heure de régénération. Notez l'abondance du glycogène cytoplasmique, et les invaginations du plasmalemme. x 14 000.

Fig. 146 : Coloration acétate d'uranyle-citrate de plomb. Après une heure de régénération, le contenu vacuolaire apparait constitué d'aggrégats de matériel dense aux électrons (flèches) au sein desquels figurent des territoires cytoplasmiques limités par une membrane (doubles flèches). x 26 000.

#### Figs. 147 - 148 :

Après 2 heures de régénération, les vacuoles secondaires issues de la fragmentation de la vacuole centrale apparaissent sphériques, et colorées d'une manière homogène aussi bien en double coloration (fig. 147) que par la technique de Thiery (fig. 148). Cette dernière met nettement en évidence les particules de glycogène phagocytées (flèche). Fig. 147, x 60 000 ; fig. 148, x 40 000.

#### Figs. 149 - 150 - 151 :

Concanavaline A - mannosyl ferritine. Evolution du marquage (flèches) au niveau du tonoplaste après 1/2 heure (fig. 149) et 1 heure (figs. 150 et 151) de régénération. Coloration acétate d'uranyle, 2 minutes. Fig. 149, x 36 000 ; fig. 150, x 30 000 ; fig. 151, x 90 000.



EVOLUTION DE L'ENVELOPPE CELLULAIRE AU COURS DE LA REGENERATION DES SPHERO-PROTOPLASTES DANS UN MILIEU CONTENANT 1% DE GLUCOSE. (CONCANAVALINE A- MANNOSYL FERRITINE).

Con A : 100 µg/ml ; Mannosyl ferritine : 100 µg/ml.

Fig. 152 : Aucun marquage du plasmalemme et de la vacuole n'est visualisé chez les sphéro-protoplastes. x 18 000.

Fig. 153 : Après 1/2 heure de régénération les particules de ferritine (flèches) apparaissent régulièrement réparties sur la face externe du plasmalemme. Coloration acétate d'uranyle, 2 minutes. x 20 000.

Fig. 154 : Fort grossissement de l'encadré de la fig. 153 montrant simultanément la présence de sites récepteurs à la Con A (flèches) sur la face interne du plasmalemme. x 40 000.

Fig. 155 : Même stade que la figure 153, mais la réaction est ici moins intense le long du plasmalemme du fait de la mise en place des composants pariétaux. Ceux-ci font également l'objet d'un marquage (flèches). x 30 000.

Fig. 156 : Au bout d'une heure de régénération le marquage apparait localisé à l'ensemble de la paroi néoformée. x 34 000.

Fig. 157 : Fort grossissement de l'encadré de la figure 156. Le plasmalemme n'est plus accessible aux particules de ferritine que de place en place (flèches). x 50 000.

Fig. 158 : Expérience de contrôle. Concanavaline A et  $\alpha$  - méthyl - D - mannoside. Aucun marquage vacuolaire ou pariétal n'est observé. x 14 000.

Fig. 159 : Même stade que la figure 156. Noter l'intensité du marquage après l heure de régénération. x 28 000.



## EVOLUTION DES VACUOLES AU COURS DE LA REGENERATION DES SPHERO-PROTOPLASTES DANS UN MILIEU CONTENANT 1% DE GLUCOSE

#### Figs. 160 - 161 - 162 :

Technique de Thiery. Après 1/2 heure de régénération, le tonoplaste apparaît tapissé d'un revêtement intensément contrasté (flèches - comparer avec la figure 145). Celui-ci constitue par place des amas plus grossiers adhérents au tonoplaste ou libres dans la vacuole (doubles flèches). La vacuole centrale semble à l'origine des vésicules périphériques (v) également fortement réactives. Noter les dépôts de matériel cytoplasmique finement coloré dans les cavités ménagées par la vacuole (astérisques). Les particules de glycogène et les invaginations du plasmalemme sont ici absentes. Fig. 160,x 48 000 ; figs. 161 et 162, x 44 000

#### Figs. 163 à 166 :

Concanavaline A (100  $\mu$ g/ml) et mannosyl ferritine (100  $\mu$ g/ml). Figs. 163 à 165 : 1/2 heure de régénération ; fig. 166 : lheure de régénération.

- Fig. 163 : En plus du tonoplaste, le matériel intravacuolaire est également fortement marqué (flèches). Comparer avec les figures 160 et 161. x 40 000.
- Fig. 164 : Le marquage du tonoplaste s'interrompt (pointillés) au niveau des zones de pénétration des globules lipidiques dans la vacuole. x 40 000.
- Fig. 165 : La coloration acétate d'uranyle-citrate de plomb montre que le tonoplaste ne fusionne pas avec le globule lipidique, mais s'invagine autour de celui-ci. x 28 000.
- Fig. 166 : La vacuole centrale est à l'origine (flèches) des vésicules qui font l'objet d'un marquage par la ferritine (v1). D'autres vésicules non marquées (v2) semblent à l'inverse phagocytées (doubles flèches). Coloration Acétate d'uranyle, 2 minutes. x 44 000.



## ADHERENCE DES BLASTOSPORES ET DES FORMES DE BLASTESE AUX CELLULES DES MUQUEUSES BUCCALES ET INTESTINALES. INCUBATION 1/2 H A 37° C

Fig. 167 : Microscopie de fluorescence - Coloration Con A - FITC. Blastospores (flèches) adhérentes à l cellule buccale. x 400.

Fig. 168 : Même observation en microscopie électronique à balayage. Certaines blastospores demeurent en surface (flèche) alors que d'autres sont localisées plus en profondeur (tête de flèche)). x l 000.

Fig. 169 : Microscopie électroniques à balayage. De nombreuses blastospores (flèches) ahèrent aux villosités intestinales. x 200.

Fig. 170 : Même observation. Phénomène de coadhérence (flèches). Certaines cellules sont en position intraépithéliale (tête de flèche). x 600.

<u>Fig. 171</u> : Microscopie photonique, P.A.S. – bleu de toluidine. Les formes de blastèse adhérent par l'intermédiaire de leur tube germinatif (flèches) aux villosités intestinales. Noter la présence d'aggrégats cellulaires entre les villosités (têtes de flèches). x 400.





## MODIFICATIONS PARIETALES ASSOCIEES & L'INCUBATION DES BLASTOSPORES AVEC DES CELLULES DES MUQUEUSES BUCCALES OU INTESTINALES

Fig.172 : Incubation 1/2 heure à 37° C avec des entérocytes.Coloration acetate d'uranyle - citrate de plomb. Noter la présence de fins filaments enchevetrés à la surface de la paroi (flèches) d'une blastospore non adhérente. x 36 000.

<u>Fig. 173</u>: Incubation 1/2 heure à 37° C avec des cellules de l'épithélium buccal.
Même coloration que figure 172. Blastospore adhérente. Comme précédemment la couche filamenteuse externe est très développée. C'est par son intermédiaire que s'effectuent les interactions blastospore - cellule épithéliale (flèches).
x 40 000

Fig.174 : Détail de la surface pariétale. La réaction de Thiery revèle la présence de nombreux granules denses répartis sur les ramifications des filaments (flèches). 60 000.

Fig.175 : Con A et Mannosyl ferritine. Blastospores incubées dans les mêmes conditions que précédemment en l'absence de cellules épithéliales. Noter la perte de fragments pariétaux superficiels (flèche) démasquant des zones non réactives (têtes de flèches). x 42 000.

Fig. 176 : Con A et Mannosyl ferritine. Blastospores incubées en présence de cellules buccales. En l'absence de toute interaction avec les cellules épithéliales, remarquer comme précedemment l'intensité du marquage (flèches opposèes), par rapport à des cellules au repos (comparer avec les figures 34 et 47). x 50 000.





## INTERACTIONS CELLULE - HOTE - BLASTOSPORE PAR L'INTERMEDIAIRE DE "FACTEURS D'AGGREGATIONS".

Fig. 177 : Con A - Mannosyl ferritine. Noter, la présence de sites récepteurs à la lectine (flèches) régulièrement répartis sur la membrane plasmique d'une cellule de l'épithélium buccal "au repos". x 26 000.

Fig. 178 : Réaction de Thiery. Cellule buccale "au repos". La membrane plasmique est irrégulièrement soulignée d'un fin liseré (flèches). x 8 000.

#### Figs. 179 - 180 :

Interactions cellule épithéliale - blastospore par l'intermédiaire d'aggrégats de matériel amporphe (pointillés), peu contrastés par la réaction de Thiery (fig. 179) ou par la coloration acétate d'uranyle - citrate de plomb (fig. 180). x 10 000.

Fig. 181 : Avec la Con A et le Mannosyl ferritine, ce matériel est intensément marqué (flèches). x 12 000.





#### INTERACTIONS DIRECTES BLASTOSPORE -

#### CELLULE HOTE

Fig. 182 : Con A (100 µg/m1) - Mannosyl ferritine (100 µg/m1) Les particules de ferritine sont abondantes à la surface de la paroi (flèches) sauf au niveau de la jonction cellule épithéliale - blastospore (cercle). Noter la présence d'une zone périphérique plus nettement marquée (têtes de flèches) à la base du revêtement pariétal. x 60 000.

Figs. 183 - 184 - 185 :

"L'accrochage" des blastospores s'effectue préférentiellement par l'intermédiaire des granules denses superficiels (cercles) qui s'insérent dans la membrane plasmique des cellules de l'épithélium buccal (fig. 184, flèche) et des entérocytes (fig. 185, flèches). Fig. 183,x 20 000 ; Fig. 184,x 40 000 ; Fig., 185 x 70 000.



