

N° d'ordre : 1043

50376
1983
263

50376

1983

263

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE

THÈSE DE TROISIEME CYCLE

PROTISTOLOGIE - PARASITOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE

présentée par

Abderrahim SADAK



**CORRELATIONS ENTRE BESNOITIA JELLISONI
(COCCIDIE) ET SA CELLULE - HÔTE IN VITRO**

Présentée le 19 Juin 1983 devant la Commission d'Examen

Jury :	MM.	E. VIVIER	Président
		E. PORCHET - HENNERE	Rapporteur
		S. FRONTIER	
		M. COLLYN D'HOOGHE	Examineurs

S O M M A I R E

	pages
INTRODUCTION	1
MATERIEL, METHODES ET TECHNIQUES	5
I Matériel biologique	6
A - Obtention des parasites	6
B - Cultures cellulaires	8
C - Inoculation des cultures	10
II Microscopie photonique et électronique	12
A - Préparation d'échantillons pour la microscopie photonique	12
B - Préparation pour la microscopie électronique	13
III Equipement microphotographique et microcinématographique	13
IV Méthodes d'analyse	14
A - Comptages sur couches monocellulaires fixées	14
B - Analyse des films	16
RESULTATS ET DISCUSSION	19
* Motilité et Pénétration des zoïtes de <i>Besnoitia jellisoni</i>	20
I Motilité	20

	pages
1 - Observations	20
2 - Discussion	21
 II Pénétration	 22
1 - Observations	23
2 - Discussion	25
 * Facteurs "biologiques" et physicochimiques	 30
 I Effet de la trypsine et du sérum de veau sur l'inva- sion des cellules Hela par <i>Besnoitia</i>	 31
A - Effet de la trypsine	31
1 - Résultats	31
2 - Discussion	32
B - Effet du sérum	34
1 - Résultats	34
2 - Discussion	35
 II Pénétration en fonction du temps	 39
1 - Résultats	39
2 - Discussion	39
 * Influence du nombre des cellules en présence sur le taux de pénétration	 43
 I - Relation entre la "taille" de l'inoculum et le pourcentage de pénétration	 43
1 - Résultats	43

	pages
2 - Discussion	44
II - Infections multiples	46
III - Action du nombre de cellules en culture sur le taux de pénétration des parasites	50
1 - Résultats	50
2 - Discussion	51
* Etude cinématographique	53
Etude cinématographique du développement de <i>Besnoitia</i> <i>jellisoni</i> en culture de cellules	53
1 - Résultats	53
2 - Discussion	55
Etude microcinématographique de l'influence de l'ino- cultation de <i>Besnoitia jellisoni</i> sur la durée du cycle et de la mitose des cellules Hela	60
I Méthodes particulières à la microcinématographie	60
II Résultats	62
A - Effet de l'inoculation de <i>Besnoitia jellisoni</i> sur la durée du cycle et de la mitose des cel- lules Hela	62
B - Probabilité de division	65
C - Influence de l'âge de la cellule sur la péné- tration du parasite	65

	pages
III Discussion	66
RESUME ET CONCLUSION GENERALE	74
BIBLIOGRAPHIE	77

INTRODUCTION

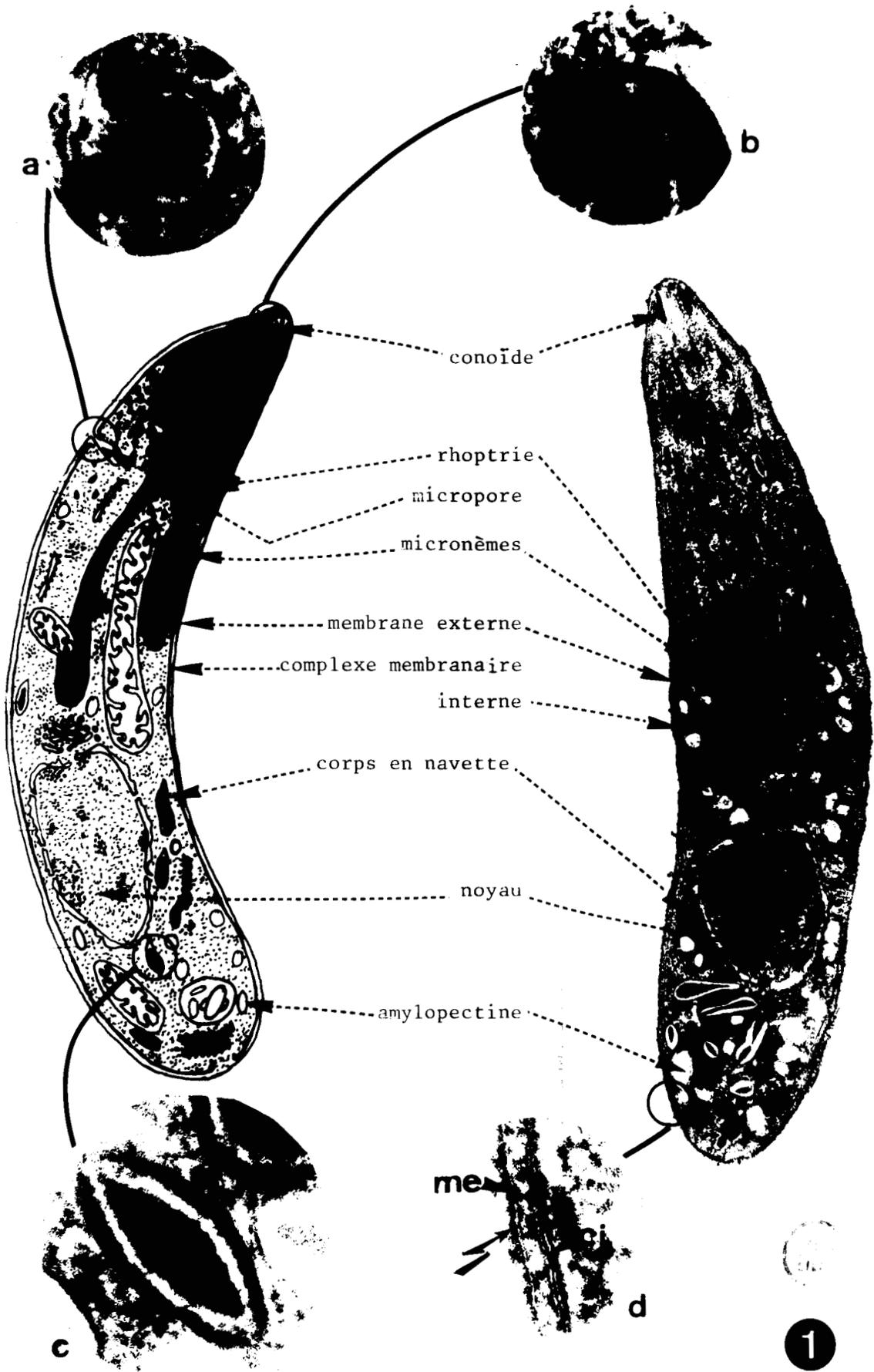
Parmi les Protozoaires parasites, connus depuis très longtemps, les Coccidies bénéficient d'un large regain d'intérêt auprès des Scientifiques depuis quelques années. Une partie de cet intérêt vient de l'importance de ces parasites en médecine humaine (*Plasmodium*, *Toxoplasma*) ou vétérinaire (*Eimeria*, *Sarcocystis*). Par ailleurs l'avènement de la Microscopie électronique, les progrès réalisés en biochimie, en immunologie, ont fait faire un bond considérable dans les connaissances sur les Protozoaires, et les Protozoaires parasites en particulier ; ceux ci constituent des modèles remarquables pour les études de biologie cellulaire et des relations intercellulaires.

Pourtant des lacunes d'importance persistent encore : le cycle des Coccidies décrites à ce jour n'est pas toujours connu ; ainsi nous ignorons encore chez quel hôte se déroule la phase sexuée de *Besnoitia jellisoni*, espèce qui fait l'objet de ce travail, et qui a pourtant été découverte en 1953 par FRENKEL chez un petit rongeur des Etats Unis (*Peromyscus maniculatus*), et retrouvé par la suite chez 3 espèces de *Dipodomys* ERNST et al (1968).

Le cycle d'autres espèces de *Besnoitia* est connu et se déroule de la façon suivante : l'hôte définitif (un prédateur de rongeurs) se contamine par carnivorisme. Dans son tube digestif se déroule la reproduction sexuée qui aboutit à la formation d'oocystes. Ceux-ci sont absorbés par les hôtes intermédiaires chez qui ils libèrent des sporozoïtes infectieux. Ces sporozoïtes sont à l'origine de cycles successifs de multiplication asexuée (tachyzoïtes). Celle-ci peut provoquer des infections aiguës, ou devenir chronique et les parasites sont alors en dormance dans des kystes tissulaires. La phase asexuée du cycle est très facilement reproductible au laboratoire en culture *in vitro* (Fig. 2). Le cycle de *Besnoitia jellisoni* serait superposable à celui proposé pour les *Besnoitia* sp. en 1975 (WALLACE et FRENKEL).

Toxoplasma lui-même, qui fait l'objet chaque année de centaines de publications scientifiques, était classé "parasite *incertae sedis*" dans le

Figure 1 : Structure fine du bradyzoïte de *Besnoitia jellisoni* :
à gauche schéma inspiré de SENAUD (1969 b), à droite
une coupe fine. a, b, c, d : agrandissement de quel-
ques organistes caractéristiques : a, le micropore où le
plasmalemme s'invagine pour former une petite vacuole ;
b, l'apex antérieur avec son conoïde (Co) surmonté d'an-
neaux apicaux (A) ; c, corps en navette ; d, vue détail-
lée de la paroi avec son plasmalemme (me) recouvert d'un
cell-coat (flèche en zig-zag) sous lequel deux membranes
apposées forment le complexe membranaire interne (ci)



traité de Zoologie de GRASSE (1953). Son hôte définitif : le chat, n'a été découvert qu'en 1965 par HUTCHISSON (VIVIER 1979). Toutes les Coccidies présentent au moins une fois, mais généralement plusieurs fois dans leur cycle un stade dit stade infectieux, ou par commodité "zoïte", qui propage la maladie en pénétrant dans une cellule. Selon leur mode de formation ou leurs particularités physiologiques, les "zoïtes" peuvent être désignés par les auteurs de différentes manières et nous reproduisons page 4 l'explication de cette terminologie complexe telle que nous l'avions présentée dans un précédent travail (SADAK 1981).

Un des plus importants apports de la Microscopie électronique a été d'établir que tous les "zoïtes" non seulement des Coccidies mais de tous les Sporozoaires possèdent une structure fine identique (Fig. 1) et que l'unité de tout^{le} sous embranchement repose sur lui (PORCHET-HENNERE et VIVIER 1981).

Or ce stade est capable de se mouvoir, de reconnaître une cellule appropriée, de s'y introduire sans la tuer, de s'y installer en "négociant" avec elle l'équilibre nécessaire à sa survie et à son développement, parfois en induisant chez elle des transformations spectaculaires (gigantisme, différenciations spécifiques). L'une des performances les plus surprenantes n'est-elle pas que les zoïtes (en l'occurrence de *Toxoplasma*) ont "appris à vivre dans les macrophages" et à déjouer les défenses immunitaires ? (BLOOM 1979, cité par PORCHET-HENNERE et al 1983). De plus ces relations peuvent être suivies sur le vivant puisque les zoïtes de Coccidies envahissent facilement des cellules en culture *in vitro*.

C'est ce système de culture que nous avons choisi pour étudier les corrélations¹ entre *Besnoitia* et la cellule de vertébré.

Le choix de *Besnoitia*, qui n'est pas-jusqu'à preuve du contraire- un parasite d'une importance majeure en médecine, s'explique par plusieurs raisons : il est très voisin de *Toxoplasma* par la structure, le mode de reproduction (par endogénèse) l'éclectisme manifesté dans le type de cellules qu'il peut infester ; mais il présente sur celui-ci l'avantage de n'être pas pathogène

¹ Corrélation : "Rapport entre deux phénomènes qui varient en fonction l'un de l'autre" (Le Petit ROBERT) - "Coexistence habituelle, dans un même être vivant, de plusieurs caractères qui n'ont aucun rapport d'origine, mais qui sont tous nécessaires à un même mode de vie ou un même acte physiologique" (LAROUSSE).

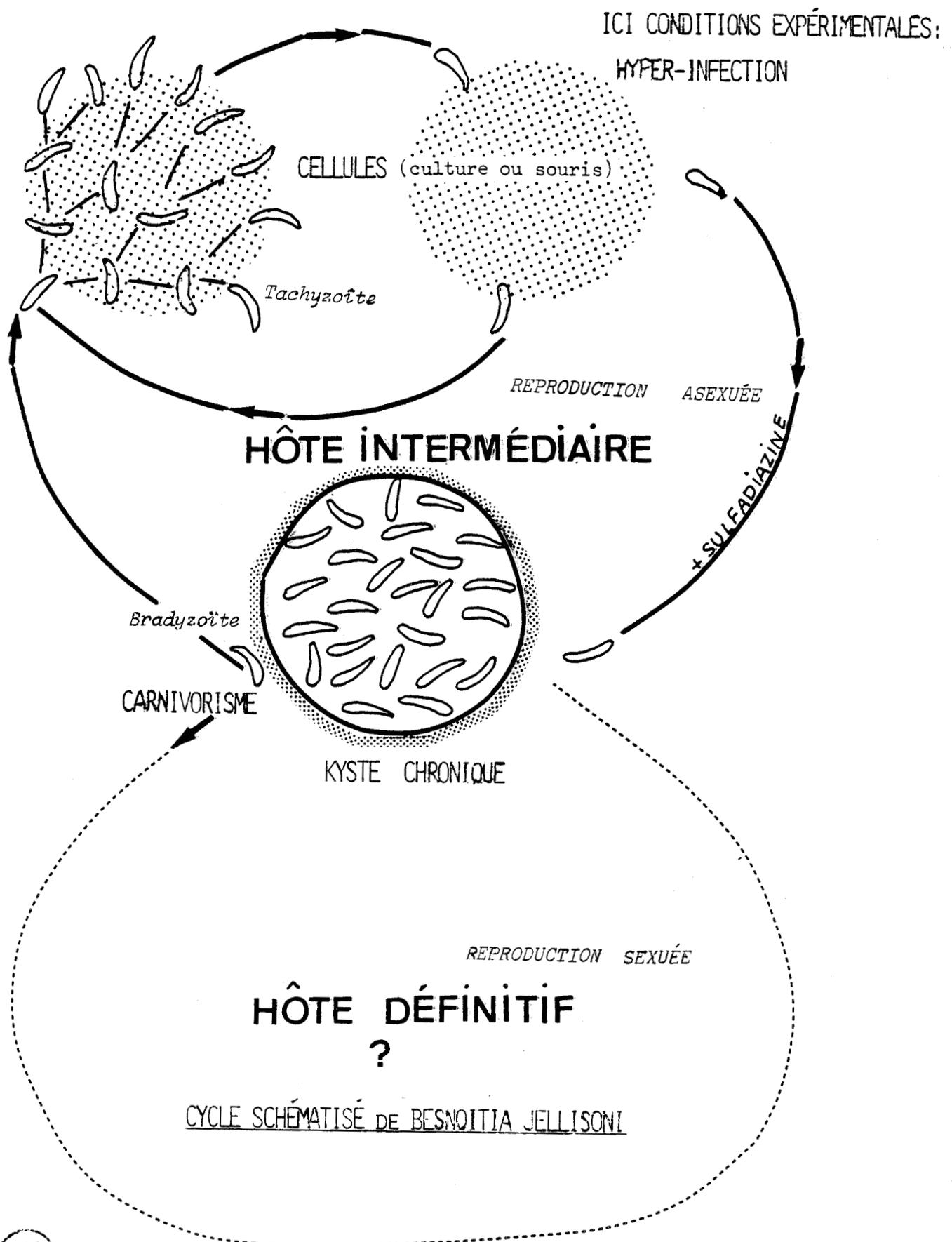


Figure 2 : Le cycle de *Besnoitia jellisoni* est encore incertain. En effet l'hôte définitif, où se déroule la multiplication sexuée (partie basse du schéma) n'a pas encore été déterminé. Il s'agit vraisemblablement d'un carnivore prédateur. La partie supérieure de la figure représente la reproduction asexuée, telle qu'elle peut se dérouler naturellement ou expérimentalement.

pour l'homme, d'avoir un rythme de multiplication plus lent et plus régulier, donc se prêtant mieux à l'analyse, et d'imposer beaucoup moins de contraintes pour son entretien sur animaux de laboratoire puisqu'il peut être maintenu sous forme de kystes chroniques.

Parallèlement aux recherches très actuelles menées sur les relations cellule-hôte-parasite aux niveaux cytologique, biochimique, moléculaire, immunologique, nous nous proposons d'aborder ce système cellulaire à deux composantes sous un angle dynamique, voire "écologique". Peut-on quantifier certaines des relations qui unissent les deux types de cellules ? peut-on, en standardisant les méthodes de culture obtenir une répétitivité des résultats indispensable pour toute expérimentation ?

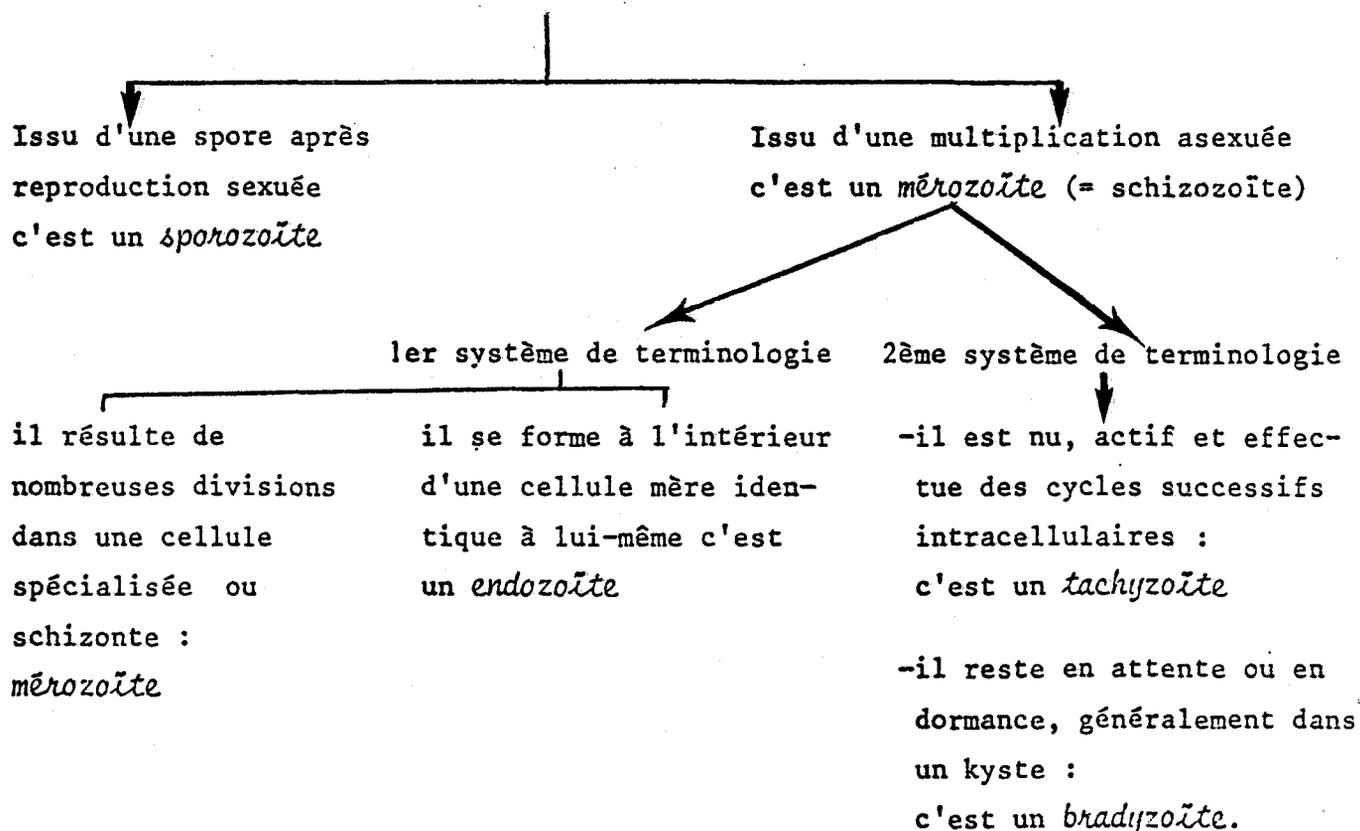
Puisque les organismes vivants sont soumis à des cycles et que leurs réactions, leur métabolisme, leur susceptibilité aux médicaments varient selon les phases de ces cycles, puisque les cellules elles-mêmes effectuent des cycles rythmés par les mitoses et qu'un travail récent (DVORAK CRANE 1981) laisse penser qu'elles ne sont pas également accueillantes aux parasites au long de leur cycle (ce qui introduit la notion de variabilité cyclique possible des récepteurs membranaires) il nous a semblé justifié de suivre les relations cellule-parasite sur le vivant, tout au long des cycles successifs ; la méthode la plus appropriée pour ce faire nous a semblé être la microcinématographie, qui permet en outre de "remonter le temps".

Cette approche était nouvelle à notre connaissance et notre travail, réalisé en un court laps de temps, n'a d'autre ambition que de démontrer l'intérêt de ces méthodes et de jeter les bases pour de futures expérimentations.

TERMINOLOGIE

Un certain nombre de termes spécifiques sont employés pour désigner les parasites aux différents stades de leur développement. Il arrive que le même stade puisse être nommé de plusieurs façons, selon que l'auteur considère comme critère principal l'origine du parasite (issu d'une spore : sporozoïte, d'une multiplication asexuée : mérozoïte), ou ses caractéristiques biologiques (en dormance ou en activité) par exemple. Cela aboutit à une terminologie complexe et il nous a semblé nécessaire de donner la définition au moins des termes employés dans ce mémoire.

- le germe infectieux, dit zoïte par les auteurs anglophones est un organisme vermiforme doué du pouvoir infectant. Sa structure fine est constante chez tous les Sporozoaires :



Comme nous traitons ici plus des caractères biologiques que de la cytologie nous emploierons essentiellement les termes de *tachyzoïte* ou *endozoïte* pour les formes se développant rapidement dans une cellule hôte jusqu'à sa destruction ; et le terme de *bradyzoïte* (ou *cystozoïte*) pour les *Besnoitia* se multipliant lentement à l'intérieur d'un kyste ; ces termes ont été utilisés pour décrire *Toxoplasma* par FRENKEL 1974.

MATERIEL METHODES ET TECHNIQUES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE

Une souche de *Besnoitia jellisoni* nous a été aimablement fournie par le Dr. FRENKEL J.K. de l'université de Kansas (U.S.A.). Nous entretenons cette souche depuis 1980 par passages intrapéritonéaux selon la technique décrite par FRENKEL et LUNDE (1965 - 1966) : celle-ci consiste en l'injection de 0,10 à 0,25 ml d'une suspension de parasites en milieu physiologique dans la cavité péritonéale des souris, qui sont préalablement traitées à la Sulfadiazine, ce qui évite une infection aigüe mortelle, et conduit à une infection chronique sous forme de kystes durables.

Trois semaines à 1 mois après l'injection, les kystes sont visibles à l'oeil nu, disséminés sur les viscères ; ils sont plus abondants dans le cas de l'inoculation de tachyzoïtes obtenus par passage sur cultures cellulaires que dans celui d'une infestation par des bradyzoïtes issus directement des kystes.

Nous avons pu maintenir la souche sur culture de cellules Hela pendant plus de 2 mois en divisant régulièrement les cultures de cellules infestées, ou en transférant des parasites provenant d'une culture parasitée à une culture saine (ceci avec une fréquence de 2 fois par semaine).

Toutes les manipulations de cultures sont effectuées stérilement sous une hotte à flux laminaire, à proximité de la flamme d'un bec Bunsen. Le matériel utilisé est stérilisé à la chaleur sèche (1H à 160°C) ou à l'autoclave (20mn à 120°C). Les milieux sont selon les cas autoclavés ou stérilisés par ultrafiltration.

A - OBTENTION DES PARASITES

1 - Bradyzoïtes

Les kystes mûrs, prélevés par énucléation sur les viscères des souris parasitées sont lavés 3 fois au PBS avec antibiotiques (500.000 UI de pénicilline et 500 mg de Streptomycine/litre), repris dans du MEM 2% sérum de veau et éclatés à l'aide de l'homogénéiseur de DOUNCE ou POTTER-ELVEHJEM. Les parasites ainsi libérés sont passés sur un tamis en Nylon à "pores" de 0,25mm puis sur Nucléopore de 9 µm, ce qui conduit à un inoculat homogène, pratiquement indemne de toute contamination tissulaire.

Certaines expériences exigeaient l'incubation de ces bradyzoïtes ainsi préparés dans des substances, comme la trypsine ou le sérum de veau.

L'incubation à 37° des parasites dans la trypsine 0,25% (DIFCO 1 : 250) dans le PBS pendant 10mn, est suivie par 2 lavages (10mn) dans du PBS avec centrifugation à 500 g_{max} .

Ces parasites sont repris dans du MEM avec ou sans sérum de veau et sont inoculés dans la culture cellulaire. L'incubation des parasites dans le sérum à concentrations croissantes est faite dans un bain marie à 37° pendant 10mn avant leur inoculation aux cultures.

Pour ces expériences nous avons incubé simultanément des *Besnoitia* dans du PBS seul pour servir de témoins.

Dans certains cas des nombres variables de parasites sont nécessaires. Après comptage sur cellule hématimétrique de Malassez, le nombre de parasites par ml de milieu est calculé, les dilutions sont alors effectuées dans du milieu de culture. Pour chaque culture, le nombre de parasites nécessaire est repris dans 1ml de milieu MEM 2% serum de veau et additionné aux tapis cellulaires.

2 - Tachyzoïtes

a - Isolement à partir de l'ascite.

Cette technique est la plus employée pour l'entretien des souches de *Toxoplasma*. Par contre pour *Besnoitia*, l'obtention de tachyzoïtes à partir de l'exudat péritonéal des souris est très aléatoire ; après passage du parasite sur souris non traitées à la sulfadiazine^{l'examen} de l'exudat péritonéal 4 à 6 jours après, nous montre que les parasites restent dans les cellules de l'ascite ; ceci rend leur prélèvement très difficile. En une occasion nous avons pu obtenir un bon rendement (100 millions de *Besnoitia* /ml).

b - Isolement à partir de cellules en culture

Une boîte de 75cm² de cellules Hela confluentes est inoculée par 6. 10⁷ bradyzoïtes ; 24 heures plus tard le fond de la boîte est raclé avec un grattoir de caoutchouc, la suspension obtenue est filtrée sur fibres de verre selon la technique de GRIMWOOD et al (1979). Une très grande partie des

parasites s'adsorbe sur la fibre de verre ce qui donne un mauvais rendement. C'est pourquoi la plupart du temps nous avons utilisé des tachyzoïtes libérés naturellement en fin de cycle dans le surnageant de cultures infestées depuis plusieurs jours.

B - CULTURES CELLULAIRES

1 - Cellules utilisées dans nos expérimentations

a - lignées standard

α/ - Transformées

- Cellule EMT6

Ces cellules issues d'un tout premier passage de la tumeur KHJJ de la souris BALB/CKa, se développent *in vivo* en une tumeur solide et *in vitro* sous la forme d'une culture en monocouche (ROCKWELL et KALLMAN 1972). Ces cellules sont cultivées dans le milieu WAYMOUTH, additionné de 10% de sérum de veau foetal, de pénicilline (200 U.I./ml) et de Streptomycine (0,25mg/ml)

- Cellule Hela

Ces cellules dérivent de la première lignée cellulaire épithéliale aneuploïde, de tissu humain, établie en 1951, isolée d'un Cancer utérin par GEY et al.

Les cellules Hela stockées dans l'azote liquide sont décongelées au fur et à mesure des besoins et mises en culture dans du milieu MEM 10% sérum de veau en boîtes plastiques de type Falcon. Le tapis qui se forme constitue notre réserve de cellules pendant la durée de l'expérimentation.

β/ - Non transformées

- Cellules de chat

Obtenues à partir de la trypsinisation d'un embryon total de chat

(ETC2)*.

- Cellules de Singe

Cellules Vero : cellules de rein de singe vert d'Afrique (GIBCO).

b - Cellules embryonnaires de rat et de souris

Nous avons réalisé des cultures primaires à partir d'embryons totaux de ces 2 animaux, dissociés et mis en culture, dans du MEM selon les techniques classiques. La plupart de nos expériences ont été réalisées sur cellules Hela dont la résistance, la longévité au stade confluent, la transparence permettant une bonne visualisation des parasites, sont autant de précieuses qualités dans le cas présent.

La variabilité de leur équipement chromosomique est certes un inconvénient lorsque l'on désire utiliser des cellules homogènes. C'est pourquoi nous avons eu recours à des cellules non transformées ; mais celles-ci se sont révélées moins résistantes ou moins favorables aux infections expérimentales ; d'autre part les cellules Hela sont les cellules les plus couramment utilisées dans les travaux que nous avons consultés, et il nous a paru finalement très justifié d'expérimenter sur cette lignée.

2 - Techniques spécifiques aux cultures cellulaires

a - Conservation des cellules par le froid

Dans certains cas, il est nécessaire, pour éviter un entretien permanent, de congeler les cellules : après décollement du tapis cellulaire et centrifugation à 1200t (5mn), les cellules sont reprises dans 10 volumes de milieu de culture (MEM + 10% de sérum de veau) additionnés de 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde).

Cette suspension est répartie en fractions de 1 ml, dans des godets de plastique. Les godets sont amenés progressivement à -196°C au moyen d'un dispositif de congélation Biogel (Air liquide) contenant de l'azote liquide

La décongélation est réalisée par immersion des godets dans un bain-marie à 37°C ouverture et dilution du contenu dans le milieu de culture.

*cette souche nous a été aimablement fournie par le Dr.

b - Repiquage

Lorsque la culture atteint une confluence de 90 à 100%, elle est décollée par une solution de trypsine (Difco 1 : 250, 0,5%) - EDTA (0,2%) en solution saline de Puck. Le liquide est ensuite décanté, les cellules sont détachées par chocs mécaniques et reprises immédiatement dans le milieu de culture (MEM + 10% SV) ce qui arrête l'action de la trypsine ; elles sont comptées à l'hématimètre et réparties dans des flacons de cultures bouchés (type Falcon, Nunclon) ou des boîtes de Petri en plastique ou en tube Leighton. Ces cultures sont incubées dans un incubateur à CO₂.

C - INOCULATION DES CULTURES

Selon le but de l'expérience, nous ensemençons les parasites (tachyzoïtes ou bradyzoïtes) sur des cultures cellulaires confluentes ou non

1 - Cultures confluentes

Dans une population confluyente, le nombre de cellules augmente d'une façon insignifiante et permet d'étudier l'évolution des parasites dans un système hôte à peu près constant pendant plusieurs jours.

La majorité des cellules dans une culture confluyente sont en phase G₁ (DVORAK et CRANE 1981), ce qui nous rapproche des conditions d'une culture synchrone, favorable à certaines expérimentations.

a - Etude de la pénétration en microscopie électronique

Lors de l'étude de la pénétration en microscopie électronique, une suspension de parasites est laissée sédimenter à froid (4°C) sur tapis confluent de cellules Hela. De cette façon un maximum de parasites se trouve au contact des cellules en même temps. L'ensemble est ensuite réchauffé à 37°C pendant quelques minutes pendant lesquels les parasites peuvent pénétrer dans les cellules, puis fixé. Cette méthode a été mise au point par JENSEN et HAMMOND en 1975, elle permet un enrichissement en stades de pénétration dans les préparations fixées.

b - Etude de la pénétration et des mouvements de *Besnoitia*
en cinématographie

Des lamelles en verre (9 x 35 mm) avec des cultures de cellules Hela confluentes sont retirées de tubes Leighton, montées entre lames et lamelles stériles, avec 0,8 ml de MEM 2% sérum de veau contenant 6 millions de bradyzoïtes (traitées en un premier temps par le froid selon la méthode de JENSEN et HAMMOND) avant d'être examinées ou filmées sur un microscope Nacet à contraste interférentiel inclus dans une enceinte thermostatée à 37°.

c - Action de la trypsine, du sérum de veau, du nombre de parasites et du temps d'incubation sur la pénétration

Pour ces expériences nous avons inoculé un tapis de cellules Hela confluent avec 1 ml de MEM avec ou sans sérum contenant les zoïtes. Après 6 heures d'incubation nous avons lavé les cultures. Après une réincubation de 19 heures à 37°, nous fixons les cellules. Pour évaluer la durée de la capacité infestante des parasites, les cellules parasitées subissent des lavages 0,5; 1; 4; 8; 16 et 24 heures après l'inoculation.

2 - Cultures non confluentes

Les cultures de cellules non confluentes sont utilisées dans les cas où le nombre de cellules de départ entre en jeu comme par exemple dans les expériences de cinétique cellulaire où il est nécessaire de débiter avec peu de cellules pour pouvoir suivre dans le champ d'un microscope leur descendance pendant plusieurs jours.

a - Effet du nombre de cellules Hela dans la culture sur l'intensité de la pénétration

Des concentrations croissantes de cellules Hela sontensemencées dans des boîtes Falcon 25 cm², dans du milieu MEM à 2% sérum de veau.

Après 4 heures à 37°C, nous ajoutons dans les boîtes 4 millions de bradyzoïtes contenus dans 1 ml de MEM 2% de sérum de veau. La fixation est effectuée 1 ou 6 heures après l'inoculation.

b - Etude de la cinétique cellulaire et du développement du parasite

En vue d'étudier la cinétique cellulaire et le développement du parasite en cinématographie, les cellules Hela sont prélevées à partir d'une cultureensemencée 2 jours auparavant, par la méthode de trypsinisation déjà décrite. Après comptage des cellules sur une cellule hématimétrique, 150000 sont alors déposées dans des boîtes plastiques Nunclun (25 cm²) contenant 5 ml de milieu MEM additionné de 2% de sérum de veau.

L'atmosphère finale dans les boîtes est constituée d'un gaz enrichi en CO₂, contenant 10% de CO₂ ; 17,5% O₂ et 72,5% d'azote introduit à faible pression dans les boîtes. Afin de leur permettre d'adhérer au support plastique, les cellules sont laissées au repos à 37° pendant 4 heures avant d'être placées sur la platine du microscope. 48 heures plus tard, un inoculat de 1 ml de MEM à 2% sérum de veau contenant 8 millions de bradyzoïtes est ajouté dans la boîte.

II - MICROSCOPIE PHOTONIQUE ET ELECTRONIQUE

A - PREPARATION D'ECHANTILLONS POUR LA MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Les opérations suivantes sont réalisées *in situ*, sur la monocouche cellulaire dans le flacon de culture lui-même.

1 - Fixation

Les cellules sont fixées dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% dans du tampon Cacodylate de Sodium 0,1 M à pH 7,4 pendant 2 heures à 4°C, puis lavées au Cacodylate de Sodium 0,1 M (2 H).

2-Coloration

Nous l'avons effectuée avec des solutions colorantes pour frottis

prêtes à l'emploi : Fuchsine LMR 22 et bleu LMR 18 (Labo-Moderne)

3 Inclusion de la monocouche cellulaire

Elle est effectuée dans un film de polyvinyle. Avant l'inclusion une deshydratation s'impose, sinon le tapis cellulaire s'altère. Après la deshydratation, 2,5 ml d'alcool polyvinylique 5% (5g d'alcool polyvinylique PROLABO, dans 100ml d'eau bidistillée (SOLURSH et al 1981) sont introduits sur le tapis cellulaire. Après un séchage de 12 heures à 37°C, il se forme un film transparent qui enrobe les cellules et que l'on peut décoller et découper.

Chaque fond de boîte en film de polyvinyle est ainsi prélevé et découpé en 3 parties égales ; chacune est montée sur une lame propre dégraissée, dans du XAM légèrement dilué par le toluène, recouvert par une lamelle. Les lames sont séchées 3 jours à 37°C.

B - PREPARATION POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

La fixation des cellules a lieu dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% (V/V) dans du tampon Cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,4 additionnée ou non de 1% d'acide tannique, pendant 2 heures à 4°C; après fixation, les cellules lavées dans le même tampon, postfixées par le tétroxyde d'osmium à 1% (P/V) pendant 2 heures, sont deshydratées puis incluses dans l'Epon selon la technique de LUFT (1961). Les coupes effectuées à l'ultramicrotome REICHERT OMU 2, sont examinées au microscope électronique JEOL JEM 120 CX.

III - EQUIPEMENT MICROPHOTOGRAPHIQUE ET MICROKINEMATOPHOTOGRAPHIQUE

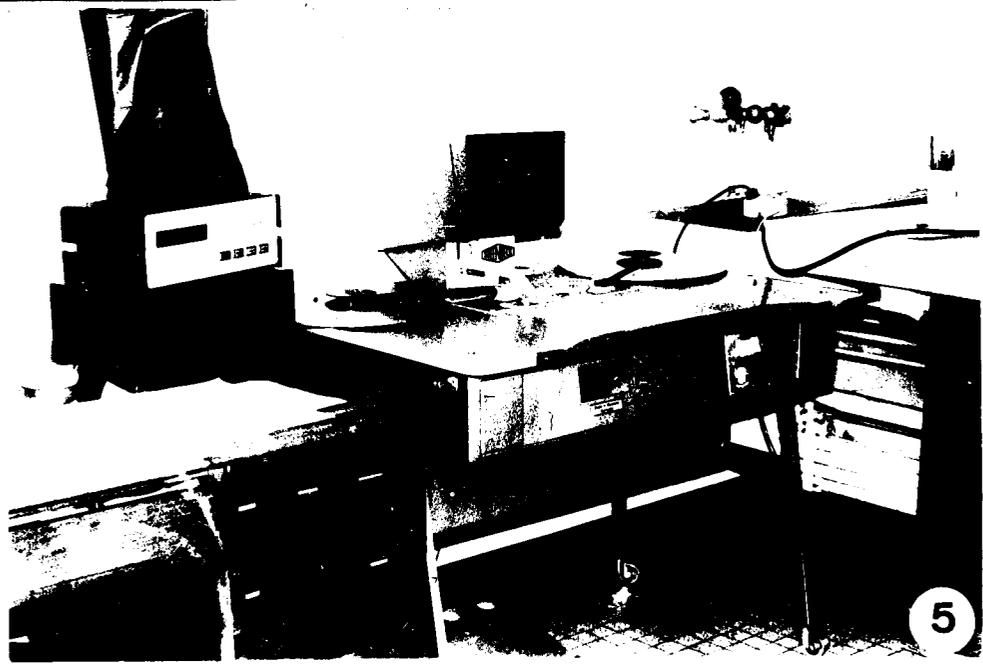
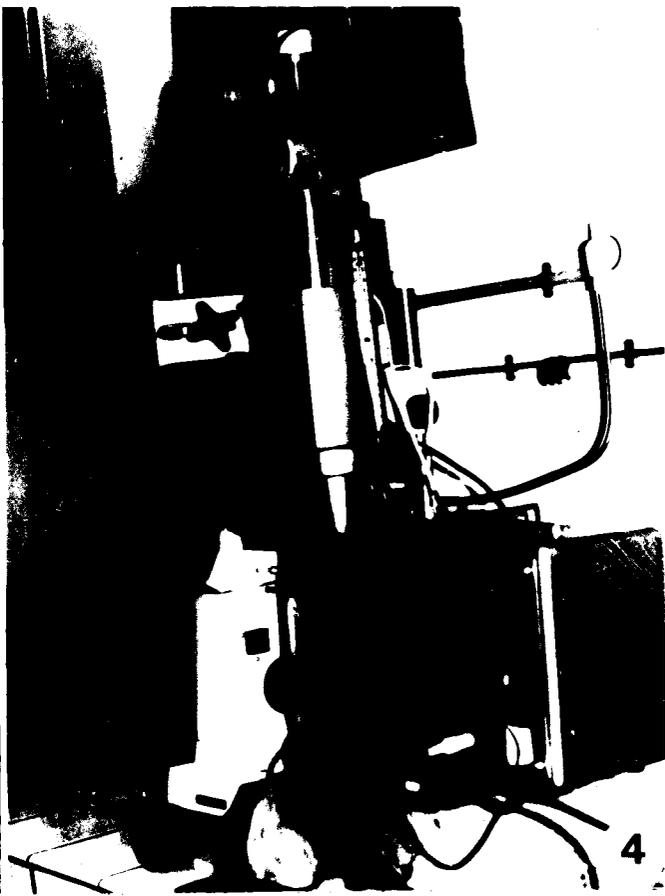
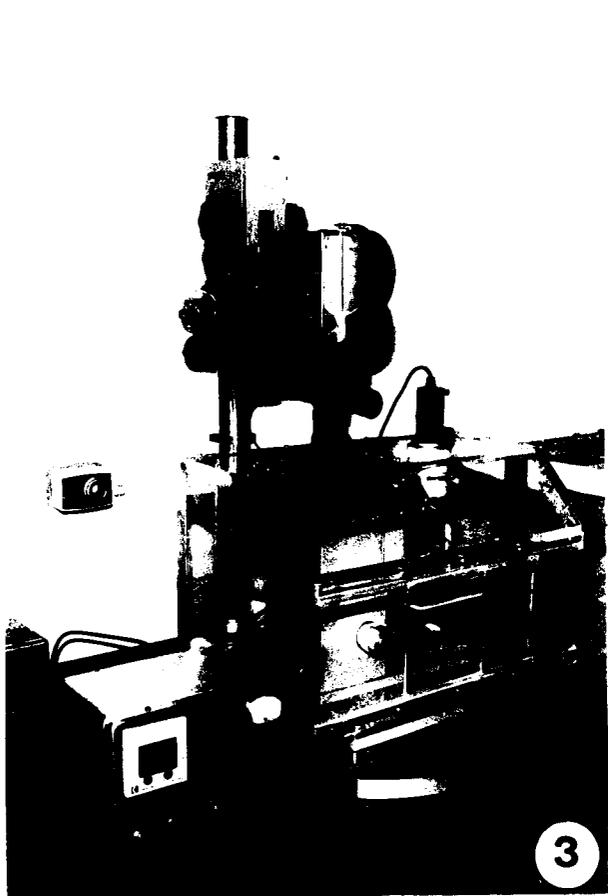
Pour l'étude de la Cinétique cellulaire, nous avons disposé de 2 équipements cinématographiques dans le service de cinétique Cellulaire, Institut de Recherches sur le Cancer, unité 124 I.N.S.E.R.M. (LILLE II) ; ces équipements sont situés dans un local occulté pour éliminer l'influence de la lumière sur le cycle cellulaire. Chacun d'eux est constitué d'un microscope à inversion entouré d'une enceinte thermostatée permettant de maintenir

Figures 3 à 5 : dispositifs de microcinématographie -

3 et 4, microscopes à inversion dont la platine supportant la boîte de culture est maintenue à 37° grâce à une enceinte thermostatée. Les prises de vue se font grâce à une caméra placée au dessus de l'appareil, caméra commandée par un intervallo-mètre (à gauche sur la figure 3, à droite sur la figure 4.) - 5, table d'analyse des films, de type STEENBECK (explications dans le texte.)

Les clichés 3 et 5 sont dus à l'amabilité du D^r M. Collyn d'Hooghe, à qui appartiennent ces appareils.





la température à $37^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ grâce à 2 résistances situées de part et d'autre du microscope et un thermorégulateur dont la sonde se situe au niveau de la platine du microscope. (Fig. 3).

Le faisceau de lumière arrivant sur la boîte de culture est intercepté par des filtres qui donnent une lumière monochromatique verte, ce qui évite aux cellules un choc au moment des prises de vues et assure un meilleur contraste. L'éclairage du champ filmé est de courte durée (0,5 seconde) et s'effectue uniquement au moment de la prise de vue. Le microscope est relié directement à une Caméra 16 mm, elle même contrôlée par un intervallo-mètre qui déclenche les prises de vue selon la fréquence choisie (dans notre cas 4 et 1 minute). Nous avons utilisé de faibles grossissements (x 4) et (x 10) qui permettent d'observer un grand champ sur la culture et de suivre la descendance de 6 à 8 cellules sur 4 à 5 générations.

Les pellicules employées sont de format 16 mm, KODAK-EASTMAN +X négatif 80 ASA ; elles sont développées dans du révélateur KODAK D19.

En outre nous avons réalisé un film en couleurs (format 16 mm, EASTMAN couleur négative II. 7237 sensibilité 100 ASA (tungsten)) sur la motilité, la pénétration et le développement des zoïtes de *Besnoitia*. Dans ce cas la Caméra utilisée est une "ARRIFLEX" 16 mm, montée sur un statif au dessus d'un microscope à inversion Olympus, muni d'une chambre thermostatée, d'un obturateur se déclenchant au moment des prises de vue, d'un système de filtre donnant une lumière monochromatique verte, d'un éclairage aux halogènes. La Caméra est reliée à un intervallo-mètre. Les cycles des cellules et des parasites sont suivis en utilisant l'objectif X 25 ou X 40 à la vitesse de 3 images/minute la nuit et 2 images par minute le jour. (Fig. 4.)

L'enregistrement de la pénétration et des mouvements des parasites a été fait sur un microscope NACHET à contraste interférentiel doté des mêmes dispositifs, à des vitesses comprises entre 25 images/seconde et 1 image/minute avec les objectifs X 25 et X 40.

IV - METHODES D'ANALYSE

A - COMPTAGES SUR COUCHES MONOCELLULAIRES FIXEES.

Les cultures préparées selon la technique décrite plus haut sont

lues sous microscope photonique. A chaque lecture les parasites et les cellules visibles dans le rectangle d'un oculaire, correspondant à une surface de $35 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2$ de préparation pris au hasard sont notés. 15 rectangles sont examinés par boîte, ils sont équivalents à une surface totale de $525 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2$ dite surface de référence. L'objectif X 40 a été utilisé pour ces comptes.

Le terme "parasites solitaires" est utilisé pour désigner les organismes de *Besnoitia* qui n'ont pas subi de division depuis leur pénétration. Le nombre de groupes d'individus issus de la division d'un même parasite (clone) est ajouté à celui des parasites solitaires : leur somme équivaut au nombre de parasites qui ont effectué la pénétration intracellulaire.

Le nombre relatif d'unités infectantes (NRUI de LYCKE LUND:1964 b) ressort du simple rapport :

$$\text{NRUI} = \frac{N_s + N_c}{N_C} \times 100 = \text{Pourcentage de pénétrations intracellulaires.}$$

Le pourcentage de cellules parasitées est exprimé par $\frac{N_{Cp}}{N_C}$

où	Ns = Nombre de parasites solitaires	}	dans la surface de référence
	Nc = Nombre de clones de parasites		
	NC = Nombre total de cellules		
	NCp : Nombre de cellules infestées		

Pour certaines expériences, nous avons tracé des courbes reliant la variance estimée S^2 à la moyenne \bar{X} en échelle log - log. Ce qui a permis de savoir si les éléments comptés sont dispersés au hasard ou non.

La zone de confiance pour ces courbes est calculée de la façon suivante :

\bar{X} et S^2 sont calculées à partir de N données (N = 15)

$$N - 1 \frac{S^2}{\bar{X}} = \chi^2_{N-1} \quad \text{si on a une distribution de Poisson}$$

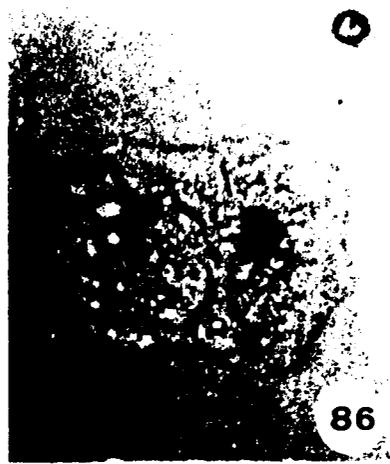
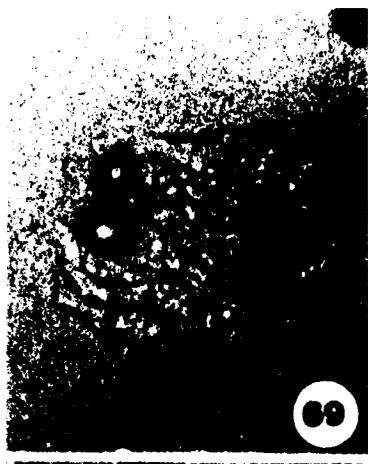
$$14 \cdot \frac{S^2}{\bar{X}} = \chi^2_{14} \in [5,57 ; 26,34]_{5\%}$$

$$\frac{S^2}{\bar{X}} \in \left[\frac{5,57}{14} ; \frac{26,34}{14} \right]$$

$$S^2 \in [0,398 \bar{X} ; 1,881 \bar{X}]$$

Figure 6 ; extraits d'un film montrant quelques étapes de la mitose de 2 cellules; A et B, situées dans un petit îlot de cellules Hela. Les numéros correspondent aux vues sélectionnées dans le film. En 1 et 2 les cellules, vraisemblablement soeurs, se détachent du support, en 26, 27 elles s'arrondissent (on peut observer une plaque métaphasique verticale dans la cellule B). En 66 la cellule A commence à se diviser. Les cellules filles A_1 et A_2 se recollent sur le support en 86. La flèche pointillée indique le début et la fin de la mitose tels que nous les avons repérés pour évaluer la durée de celle-ci.





$$\log S^2 \in [\log \bar{X} + \log 0,398 ; \log \bar{X} + \log 1,881]$$

$$\log S^2 \in [\log \bar{X} - 0,400 ; \log \bar{X} + 0,274]$$

Dans l'expérience d'inoculation de nombres croissants de parasites, nous avons obtenu des infections multiples ; pour savoir si elles sont dues au hasard ou non, nous avons comparé la répartition des cas à 0,1 ... 10, parasites par cellule effectivement comptés à la répartition théorique par la distribution de Poisson. Nous avons appliqué par la suite le test χ^2 pour savoir si la différence trouvée entre les courbes théoriques et courbes tracées à partir des dénombrements est significative.

B - ANALYSES DES FILMS

a - Appareillage

Les films ont été analysés sur une table de projection STEENBECK (Fig.5) qui envoie l'image sur un verre dépoli avec un agrandissement 20 X. Elle est dotée d'un système aller et retour à 3 vitesses : Vue par vue, 25 et 100 images/seconde ; cette table est reliée à un compteur électronique qui attribue un numéro à chaque vue.

b - Estimation de la durée du cycle et de la mitose (Fig.6) nous avons adopté la technique de mesure suivie par COLLYN - D'HOOGHE et al (1977).

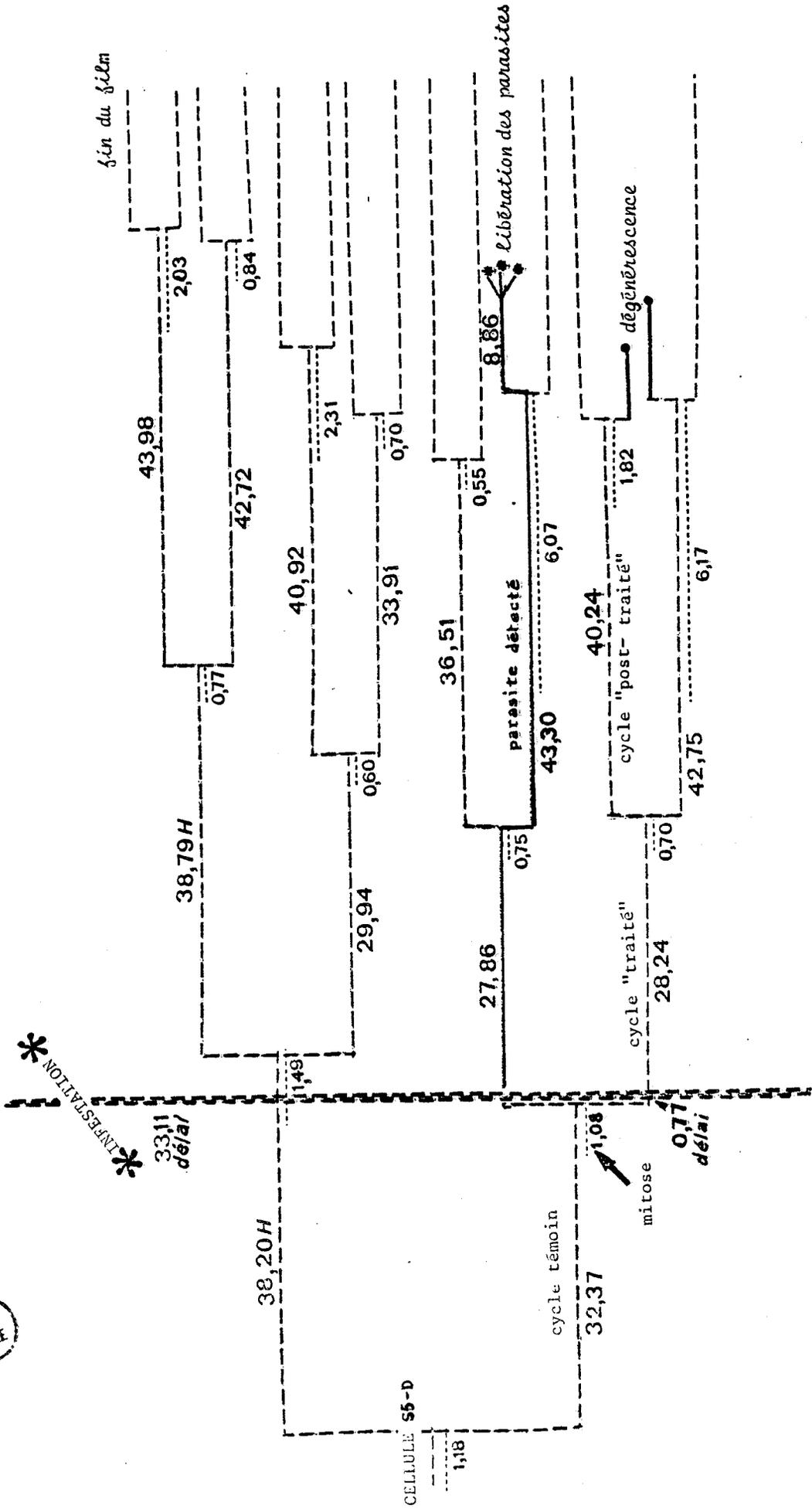
- Mitose

Le début de la mitose est la première vue où la cellule prend une forme circulaire constante.

La fin de la mitose est la première vue qui montre une configuration en doublet, où une membrane visible apparaît entre les 2 cellules filles.

- Cycle

La durée du cycle est définie comme l'intervalle de temps qui s'écoule



7 Exemple de pedigree d'une cellule Hela ayant subi une infestation par *Besnoitia* dans sa descendance.
 (la durée des cycles et des mitoses est exprimée en heures)

entre la fin de la mitose de la mère et la fin de la mitose de la fille, donc c'est l'intervalle de temps qui sépare 2 mitoses.

c - Remarques sur les données

Les cellules présentes dans le champ au début de l'expérience représentent la génération 0. La première division donne des cellules filles qui constituent la génération 1, celle-ci après division donnera la génération 2 ainsi de suite. Au cours de l'étude de ces générations certaines informations sont perdues : des cellules quittent le champ d'observation, d'autres sont au centre d'un clone cellulaire dense qui s'est formé et ne peuvent pas toujours être suivies avec certitude. Certaines éclatent et leur débris en cachent d'autres. Certaines valeurs de la mitose sont perdues à cause de la difficulté de cerner le moment précis où la cellule prend une forme sphérique constante.

Des coupures de courant peuvent aussi intervenir, ce qui nous oblige à éliminer les valeurs de certains cycles et mitoses. D'après HURWITZ et TOLMACH (1969), COLLYN D'HOOGHE (1980), l'absence de pedigree complet pour chaque cellule n'introduit aucun biais dans les résultats.

d - Interprétation statistique des résultats.

Pour chaque cellule, nous construisons un arbre généalogique appelé pedigree qui représente les différentes générations de cellules que nous avons pu suivre (Fig. 7).

Les données notées sur les différents pedigrees représentent des nombres de vues transformées en heures grâce à un ordinateur.

A l'aide d'une calculatrice programmable à imprimante nous avons pu calculer les données suivantes :

. durée moyenne et variance du cycle et de la mitose pour chaque génération

La variance a été estimée par la formule suivante :

$$s^2 = \frac{(X - \bar{X})^2}{N - 1}$$



avec X = valeurs observées
 N = Nombre de valeurs observées
 \bar{X} = moyenne de l'échantillon ($\bar{X} = \frac{\sum X}{N}$)

$N - 1$ = Nombre de degré de liberté

L'intervalle d'estimation de la moyenne de population est calculé par :

$$\bar{X} \pm 2 \frac{S}{\sqrt{N}}$$

Pour comparer les différentes moyennes nous avons utilisé le test de Student (test t) :

$$N_1 + N_2 - 2 = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}}}$$

S_1^2, S_2^2 = variances estimées de \bar{X}_1 et \bar{X}_2

\bar{X}_1 et \bar{X}_2 = moyennes calculées de 2 échantillons
1 et 2

N_1 et N_2 = Nombres d'observations sur les échantillons 1 et 2

$N_1 + N_2 - 2$ = Nombre de degré de liberté.

RESULTATS ET DISCUSSION

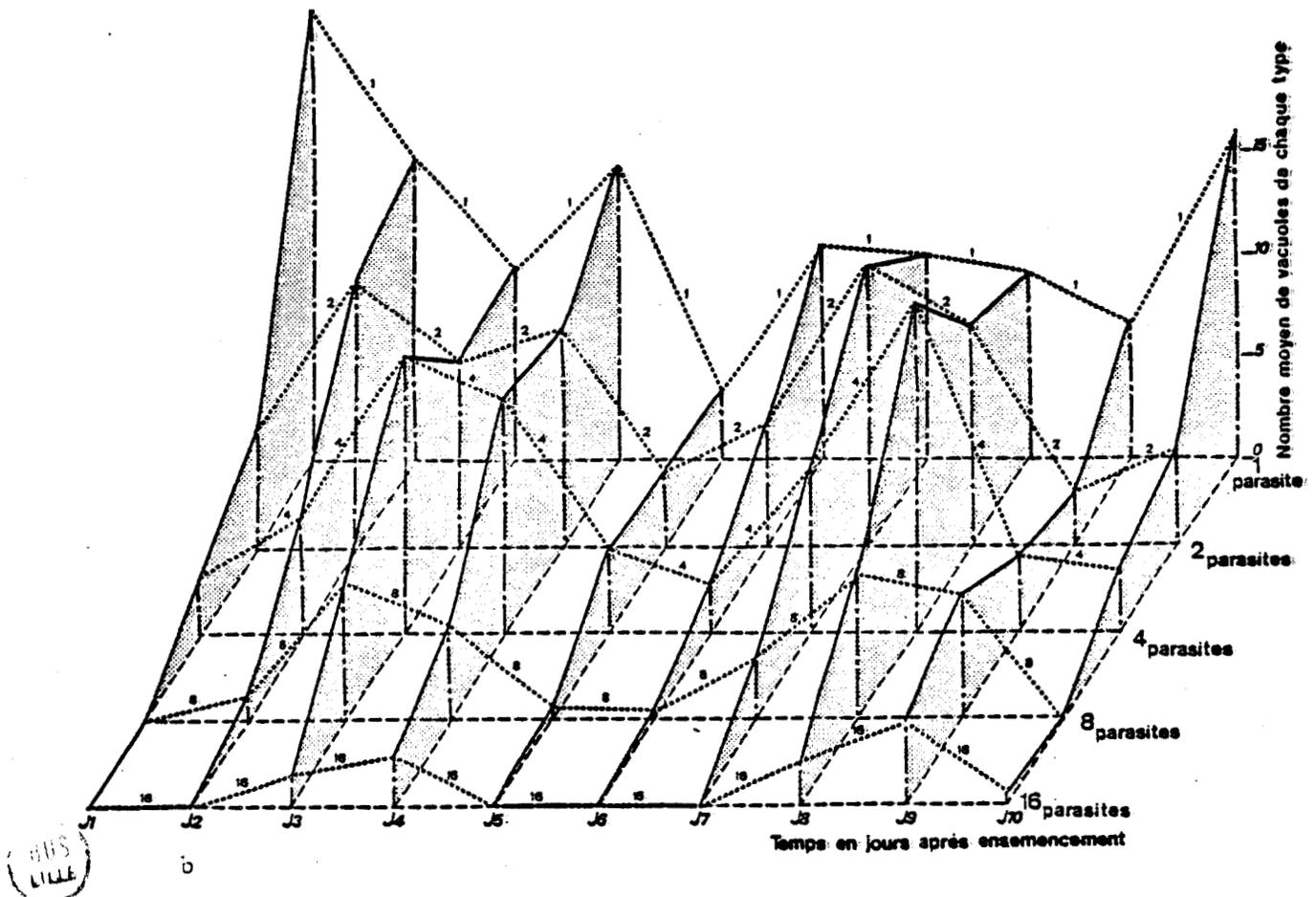
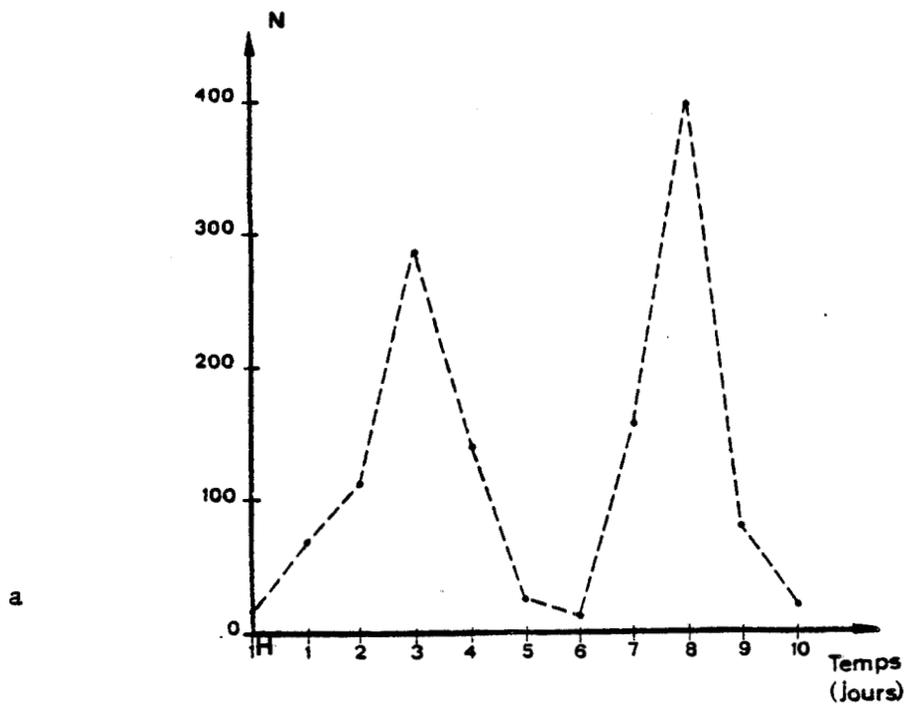


Fig. 1: Courbe représentant le nombre total de parasites (N) intracellulaires dans une surface de référence ($525 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2$), en fonction du temps

Fig. b: Culture non standardisée de *Besnoitia* en cellules Hela, pendant 10 jours sans changement de milieu: diagramme à 3 dimensions, représenté en perspective cavalière, montrant la variation dans le temps (jour J1 à J10), de la distribution des nombres moyens de vacuoles à 1, 2, 4, 8 parasites, c'est à dire ayant abrité 0; 1, 2, 3 divisions. Chaque profil grisé matérialise la distribution des parasites à un jour donné. Les courbes en petits pointillés épais suivent les fluctuations au cours du temps des fréquences moyennes de chaque type de vacuole.

Les relations entre *Besnoitia* et sa cellule-hôte ont été étudiées *in vitro*, en culture cellulaire, système souple qui permet le suivi sur le vivant de tous les phénomènes.

Comme la principale caractéristique physiologique du stade infectieux de *Besnoitia* est la mobilité nous décrirons tout d'abord brièvement les types de mouvements que nous avons observés et les modalités de la pénétration intracellulaire à la lumière des théories actuelles.

Dans une étude précédente (SADAK 1981 mémoire de D.E.A.) nous avons montré que le nombre total de parasites intracellulaires dans une culture passe par 2 maximums, ou "pics" d'intensité parasitaire (figure a) ; au niveau du 3^e et du 8^e-9^e jour. D'autre part nous avons relevé jour par jour le détail des observations de vacuoles à 1, 2, 4, 8 et 16 parasites dans toutes les expériences, et représenté leur distribution moyenne dans un diagramme à trois dimensions (fig. b) ; comme le montre celui-ci, nous avons une perte de synchronisme dans la division du parasite qui peut être imputée au fait que les conditions employées n'étaient pas optimales. Notons aussi la présence de vacuoles à 4 parasites dès le premier jour après l'inoculation, ce qui est sûrement dû à une infection multiple et n'est pas le résultat de divisions.

Il s'est donc avéré nécessaire de "synchroniser" au maximum le développement du parasite. Cette recherche passe par la standardisation des méthodes de culture.

Nous avons donc recherché l'influence de différents facteurs sur le taux de pénétration ou la qualité de survie et d'équilibre du système *in vitro*.

Successivement nous évoquerons l'influence de la nature de la cellule-hôte et l'incidence de facteurs physiques. Nous nous attacherons plus spécialement à essayer de déterminer le rôle de deux substances auxquelles le parasite peut être confronté dans la nature : la trypsine et le sérum. Puis nous tenterons de rechercher si le taux de pénétration effectif est lié au nombre de parasites et au nombre de cellules mis en présence.

Enfin nous relaterons dans le dernier chapitre l'approche dynamique que nous avons faite pour étudier sur le vivant le déroulement des relations entre *Besnoitia jellisoni* et les cellules en culture par la méthode cinématographique. Celle-ci nous a permis d'appréhender non seulement le développement du parasite mais aussi les répercussions du parasite sur le cycle de sa cellule-hôte.

MOTILITE ET PENETRATION

MOTILITE ET PENETRATION DES ZOITES DE *BESNOITIA JELLISONI*

Les Coccidies sont des parasites qui exigent pour accomplir au moins une partie de leur cycle de vie un environnement intracellulaire. Ceci nécessite que le parasite trouve et pénètre une cellule hôte convenable.

Puisque l'entrée du parasite dans la cellule hôte est une étape cruciale dans le développement de l'infection et que la motilité

et surtout la locomotion sont d'une importance capitale dans l'invasion cellulaire (RUSSEL et SINDEN 1981), nous avons jugé nécessaire de décrire les quelques observations que nous avons pu faire à ce sujet chez *Besnoitia* et de rappeler brièvement les théories actuelles sur la motilité et le mode d'invasion des cellules par les Coccidies.

I - MOTILITE

Pour éviter la confusion dans l'utilisation des termes, nous avons adopté la terminologie utilisée par VANDERBERG(1974):

- Le mouvement est le changement de position d'une partie du corps par rapport à une autre.

- La locomotion est un passage actif de l'organisme entier d'un emplacement à un autre.

- La motilité signifie aussi bien mouvement que locomotion, ou bien les deux à la fois.

. 1 - Observations

Les bradyzoïtes de *Besnoitia* observés en microscopie optique en présence ou en absence d'un tapis cellulaire, effectuent différents types de mouvements :

- flexion : le parasite qui est au repos légèrement arqué (fig. 1) - s'incurve lentement en rapprochant la partie antérieure de la partie postérieure dans le sens de la courbure intérieure du corps, jusqu'à ce qu'il forme un "U", se redresse brusquement et revient à sa position initiale. Ce mouvement de flexion rapide est souvent observé chez les parasites en cours de

sédimentation, ou ceux entraînés par un courant artificiel créé dans le milieu de culture.

- Pivotement : le parasite fixé au substrat par sa partie postérieure décrit une rotation du pôle opposé souvent contraire au sens des aiguilles d'une montre (c'est à dire inversé dans le sens des aiguilles d'une montre par le microscope optique).

Nous avons observé 2 types de locomotion par glissement :

- Glissement circulaire ou linéaire : le contact du corps du zoïte avec le substrat semble intéresser toute la longueur de celui-ci selon une génératrice linéaire. Etant donné que le corps du parasite est sous forme d'une "banane" et qu'il ne montre aucune flexion ou ondulation évidente, la génératrice du corps est aussi courbe, le zoïte décrit alors des cercles.

- Glissement hélicoïdal : Ce type de glissement est le même que celui décrit par RUSSEL et SINDEN (1981) chez *Eimeria tenella* et *Eimeria acervulina* : le zoïte a une forme rigide en partie en hélice, et sa partie antérieure du corps ne semble pas communiquer avec le substrat ; la rotation hélicoïdale est décrite le long des 2/3 postérieurs de la surface du corps pendant que le zoïte est en contact avec le substrat.

2. Discussion

Les premiers chercheurs qui ont montré l'existence de stades extracellulaires mobiles en culture de cellules chez *Toxoplasma*, sont GUIMARAES et MEYER (1942, rapporté par DORAN 1973), cette motilité a été décrite sous forme d'oscillations, ondulations et torsions. D'autres types de motilité ont été décrits par la suite chez *Toxoplasma* (DORAN 1973 et 1982), de même chez *Eimeria* (DORAN 1973).

La flexion, le pivotement et le glissement ont été précédemment décrits chez *Besnoitia jellisoni* (FAYER et al 1969, HENDRICKS et FAYER 1973), mais ces auteurs n'ont pas distingué les 2 types de glissement que nous avons cités.

Ces 3 types de motilité ont été aussi décrits chez *Sarcocystis* (FAYER 1970).

Cependant, quand les termes utilisés pour décrire la motilité chez *Toxoplasma* sont analysés et comparés à ceux utilisés pour décrire celle de *Besnoitia*, *Eimeria*, *Hepatozoon* et *Sarcocystis*, il apparait que toutes ces espèces ont une mobilité similaire en culture de cellules (DORAN 1982). VANDERBERG (1974) décrit un mouvement de glissement linéaire dans le prolongement du corps chez les sporozoïtes de *Plasmodium*. Récemment des analyses fines utilisant des enregistrements "vidéo" reliés à un circuit de télévision, ont démontré l'existence de glissement hélicoïdal de la flexion et de la rotation chez *Eimeria acervulina* et *Eimeria tenella* (RUSSEL et SINDEN 1981) ; en plus de ces 3 types de motilité, CHBOUKI (1982) a montré un glissement linéaire chez les zoïtes de *Sarcocystis muris*, *Sarcocystis tenella* et *Eimeria niechulzi*.

Remarquons que la différence essentielle entre ces 2 types de glissement (hélicoïdal et linéaire) réside dans la forme du zoïte, donc une différence dans la zone en contact avec le substrat. Il suffirait que le zoïte soit capable de passer d'une configuration torsadée à une configuration linéaire pour qu'il puisse présenter les 2 types de glissement, remarque qui a été faite par CHBOUKI (1982).

La motilité des bradyzoïtes de *Besnoitia* est inhibée par le froid, avec le retour à 37° les parasites retrouvent leur activité.

Les études récentes sur la motilité des zoïtes de Coccidies laissent pressentir l'importance du rôle joué par les membranes externes dans ce phénomène (DUBREMETZ 1981, RUSSEL 1982).

II PENETRATION

La manière par laquelle les zoïtes des Coccidies envahissent leur cellules hôtes a attiré l'attention de beaucoup de biologistes. CHOBOTAR et SCHOLTYSECK (1982), DORAN (1982) ont rapporté la liste impressionnante des travaux faits sur ce sujet.

A notre connaissance, la manière dont le zoïte de *Besnoitia jellisoni* entre dans sa cellule-hôte n'a été évoquée que par FAYER et al (1969), SENAUD et MEHLHORN (1974), SENAUD et al (1974).

1 - Observations

L'observation sur le vivant de l'interaction entre les zoïtes de *Besnoitia* et le tapis de cellules Hela montre que le parasite se déplace par glissement pour arriver au contact du plasmalemma de la cellule hôte, l'extrémité la plus effilée vers l'avant.

Besnoitia jellisoni entre dans sa cellule hôte selon deux modes de pénétration :

a - rapide : le parasite se dirige vers la cellule hôte en glissant hélicoïdalement partie antérieure vers l'avant, et rentre rapidement dans la cellule en continuant sa rotation; cependant au moment du contact avec l'hôte, le parasite semble marquer un léger ralentissement.

b - lent : le parasite semble prendre contact avec le plasmalemma de la cellule hôte par sa partie antérieure.

/ ou bien celle-ci s'allonge sous forme d'un stylet qui semble pénétrer dans le cytoplasme de l'hôte alors que la partie postérieure s'élargit et effectue des mouvements pulsatiles. En microscopie électronique le zoïte ainsi engagé apparaît avec sa partie antérieure effilée en rotation, elle est en contact étroit avec la membrane plasmique de l'hôte, la partie postérieure paraît plus large. La cellule "entoure" le parasite par des "pseudopodes" (fig. 8).

/ ou bien le parasite prend contact avec la membrane de sa cible, mais ne change pas de forme et semble rentrer en rotation.

Dans les 2 cas, (pénétration lente ou rapide), nous avons noté 2 facteurs communs :

- une motilité du zoïte et prise de contact avec la membrane

Figures 8 à 11 : Pénétration du bradyzoïte de *Besnoitia jellisoni*, observée en microscopie électronique.

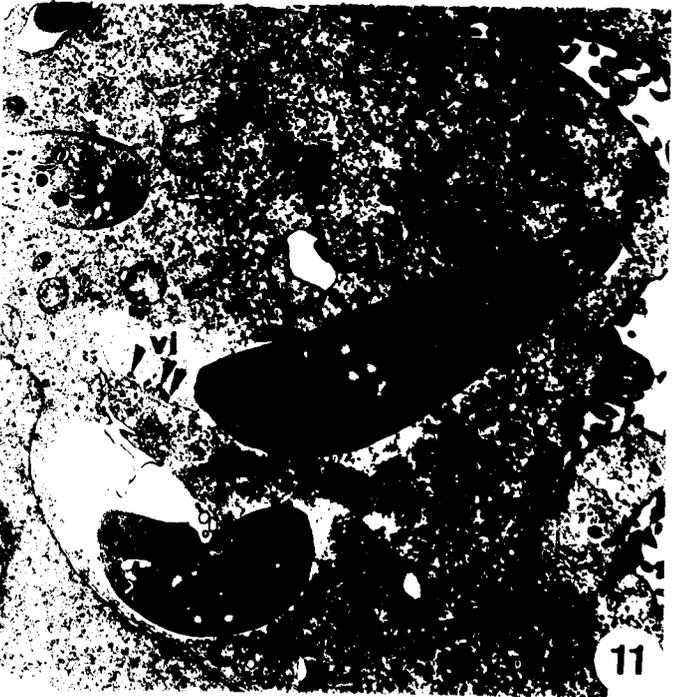
8, pénétration en "rotation" (flèche) de la partie antérieure effilée du parasite ; des pseudopodes de la cellule-hôte entourent l'envahisseur (tête de flèche) - (x 10000)

9, Etranglement du corps du parasite lors de sa pénétration. (x 13400).

10, Partie antérieure d'un zoïte intracellulaire contenant une vacuole (v) "vide" , exceptés des globules et profils denses. Une importante formation "myélinique" (my) est visible près du parasite (x 54000)

11, Zoïte intracellulaire montrant une vacuole antérieure (v), un micropore (mp) dans une vacuole parasitophore discontinue sur ce cliché.- Noter la présence de microvillosités (vi) sur celle-ci, derrière le parasite. (x 8000).





de la cellule.

- Un léger étranglement au niveau de la zone de pénétration qui apparaît en coupe fine sous forme annulaire (Fig. 9). Le plasmalemme hôte parait s'invaginer autour du zoïte et l'anneau qui ceinture le parasite semble coulisser sur le corps du parasite au fur et à mesure de sa progression dans l'hôte, et se refermer après l'entrée du zoïte. Ce phénomène d'étranglement est aussi observé chez le zoïte qui quitte sa cellule-hôte.

Parfois le parasite prend contact avec la cellule, effectue des mouvements alternés de contractions et d'allongements, puis s'en détache pour aller chercher un autre endroit sur cette cellule ou bien une autre cellule à envahir.

Notons que certains parasites peuvent cheminer à l'intérieur des cellules, de l'une à l'autre sans que celles-ci semblent être lésées.

La membrane de la vacuole parasitophore reste intacte jusqu'à un stade avancé de la pénétration. Après l'invasion, on note la présence de figures myéliniques dans la vacuole parasitophore, qui vont de la simple vésicule aplatie à l'empilement d'unités membranaires enroulées en vésicules multilamellaires. (Fig. 10).

Sur coupes fines, sous le conoïde des zoïtes qui sont déjà intracellulaires, on note souvent la présence d'une vacuole en forme de gourde, de faible densité, contenant quelques profils et globules denses aux électrons (fig. 10, 11); cette vacuole parait être entourée par une membrane intacte, elle pourrait être connectée à une vésicule apicale claire (fig. 11). Sur cette figure on remarque aussi la présence d'un micropore en relation avec une vésicule (de pinocytose ?) au contenu granuleux.

Nous n'avons observé que des vacuoles parasitophores avec une membrane discontinue, fragmentée et appliquée étroitement au plasmalemme du parasite comme celle de la fig. 11, sur laquelle on note la présence de microvillosités derrière le parasite.

2 - Discussion

La lecture de travaux "classiques" sur l'invasion des cellules non phagocytaires par les Sporozoaires (AIKAWA et al 1979, BANNISTER 1977 ...) met en évidence une séquence d'événements qui conditionnent la réussite de celle-ci, résumés par certains chercheurs (SINDEN 1981, RUSSEL et SINDEN 1981, RUSSEL 1982, PORCHET et TORPIER 1983) en 3 étapes :

- Reconnaissance et attachement du parasite à la cellule-hôte
- Formation de la vacuole parasitophore.
- Installation du parasite dans la vacuole parasitophore.

a - Reconnaissance et attachement

La spécificité de l'attachement et l'invasion varient d'une espèce à l'autre. Le développement des méthodes de cultures cellulaires *in vitro* a montré la non spécificité de l'invasion de plusieurs Coccidiomorphes. Ainsi *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Sarcocystis*, *Besnoitia* infestent une grande variété de types cellulaires (DORAN 1973, 1982).

Dans le cas de *Plasmodium* l'interaction cellule-cellule est extrêmement spécifique, gouvernée par des récepteurs sur les plasmalemmes du parasite et de l'érythrocyte (MILLER et al 1979).

Les études les plus récentes sur la spécificité ont déterminé des "Lectin-Like" impliquées dans la reconnaissance du globule rouge par *Plasmodium falciparum* (JUNGERY et al 1983), cette possibilité avait été évoquée à propos de *Toxoplasma* par HANDMAN et al (1980).

Presque tous les derniers travaux réalisés sur la pénétration des zoïtes-au moins dans les cellules non phagocytaires-montrent que celle-ci ne s'effectue que si l'apex antérieur du parasite entre en contact avec la surface cellulaire de l'hôte ; la même remarque peut être faite pour *Besnoitia jellisoni*. Dans cet apex, il a été mis en évidence par cryofracture la présence de 8 granulations arrangées en cercle autour d'une 9^e appelée

"rosette apicale" par PORCHET et TORPIER (1977), celle-ci est trouvée chez *Sarcocystis* et *Toxoplasma* (PORCHET et TORPIER 1977), *Eimeria niechulzi*, (DUBREMETZ et TORPIER 1978) et chez *Besnoitia jellisoni* (SADAK 1981) ; Ces auteurs supposent que la rosette pourrait être un site de fusion intermembranaire dans le parasite, contemporain de la reconnaissance d'une cellule-hôte

b - Formation de la vacuole parasitophore

Par observation en microscopie photonique, FAYER et al (1969) rapportent que *Besnoitia jellisoni* entre dans la cellule-hôte rapidement après avoir percé la membrane de celle-ci avec sa protubérance antérieure qui s'allonge sous forme d'un stylet.

SENAUD et MELHLHORN (1974) parlent de pénétration active ou passive de *Besnoitia jellisoni* dans le macrophage.

Nous avons traité des *Besnoitia* par le froid et par le glutaraldéhyde : aucun parasite n'a pénétré dans les cellules Hela.

En tenant compte de cette constatation et de l'observation universelle d'une inhibition de l'invasion des parasites par la cytochalasine B (par exemple chez *Eimeria* par JENSEN et EDGAR 1976 a), de la pénétration de phagocytes bloqués par des drogues, par les sporozoïtes de *Plasmodium* (DANFORTH et al 1980), de la remarque faite par RUSSEL (1982) que seul le parasite a besoin d'être actif, nous pouvons conclure que la motilité du zoïte de *Besnoitia* est très importante dans le phénomène d'invasion et que le parasite rentre activement dans ce type de cellule-hôte.

L'observation des coupes fines, nous a tous jours montré des membranes de cellules-hôtes qui s'invaginent devant le parasite sans rupture, nous n'avons pas vu d'image d'effraction, à ce stade précoce de la pénétration. La présence de pseudopodes entourant le parasite serait-elle témoin d'une certaine activité de la cellule en plus de celle du parasite ?

Avant LADDA et al (1969) qui ont les premiers montré une invagination de la membrane de la cellule-hôte devant les mérozoïtes de *Plasmodium berghei* et *Plasmodium gallinaceum*, membrane demeurant intègre, la pénétration des zoïtes de Coccidies dans la cellule -hôte était considérée comme une effraction ; cette idée est encore soutenue par certains chercheurs comme LONG et SPEER (1977), NICHOLS et O'CONNOR (1981), NICHOLS et al 1983).

Nous n'avons vu que des vacuoles parasitophores avec une membrane discontinue, mais on ne peut juger s'il s'agit d'une déstabilisation de la membrane après la pénétration, ou sa perturbation lors de celle-ci, ou bien une discontinuité artéfactuelle due à la fixation ou à l'action des variations brusques de températures infligées aux cellules dans notre protocole expérimental. Dans la vacuole, nous avons remarqué la présence de figures myéliniques (fig. 10) comme celles observées près de *Myriosporides amphiglenae* (HENNERE 1967) et de *Sarcocystis* (DUBREMETZ 1981), ce matériel serait-il d'origine parasitaire et destiné à combler les altérations du plasmalemma de la cellule-hôte ?

La vacuole parasitophore subit une désintégration rapide après la pénétration chez *Babesia microti* (classe des Piroplasmes) (RUDZINSKA ^{et al} 1976). Une désagrégation partielle et transitoire chez *Eimeria magna* (JENSEN et HAMMOND 1975). DUBREMETZ ¹⁹⁸¹ obtient fréquemment des images de discontinuité pour des stades terminaux d'invasion de *Toxoplasma*. NICHOLS et O'CONNOR (1981) rapportent que la vacuole ne se forme autour de *Toxoplasma* qu'après sa pénétration. D'après PORCHET et TORPIER (1983), la membrane de la vacuole parasitophore serait une pseudo-membrane de nature exclusivement lipidique ; elle n'acquiert qu'ultérieurement une structure classique avec protéines intramembranaires, ces protéines "secondaires" proviennent probablement du parasite.

Pour la plupart des auteurs la pénétration nécessiterait l'entrée en contact de la cellule et de la partie antérieure du zoïte ; celle-ci contient les rhoptries. L'hypothèse originale (GARNHAM 1961) que ces organelles secrètent une substance aidant l'invasion est soutenue par LADDA et al (1969), SCHOLTYSECK et MEHLHORN (1970), VIVIER et PETITPREZ (1972), JENSEN et EDGAR (1976 b), PORCHET et TORPIER (1977), VIVIER (1979) etc ...

Le rôle probable attribué aux organites apicaux et surtout les rhoptries dans la production d'un facteur aidant le parasite à pénétrer dans les cellules est renforcé par l'observation à un stade ultérieur de vacuoles partiellement vides et de forme rappelant les rhoptries dans la région antérieure des zoïtes.

Ceci a été vu par exemple chez *Toxoplasma gondii* en cours de pénétration (NICHOLS et O'CONNOR 1981, NICHOLS et al 1983, PORCHET et TORPIER 1983), ou juste après son installation dans celle-ci (DUBREMETZ 1981). Le phénomène d'extrusion du contenu des rhoptries a été récemment visualisé (PORCHET-HENNERE et NICOLAS 1983).

Nous avons toujours observé une vacuole vidée partiellement de son contenu qui pourrait être une rhoptrie chez les parasites déjà intracellulaire, celle-ci semble reliée à l'extérieur par une vésicule apicale ; une telle vacuole a été observée par SH EFFIELD (1966) chez *Besnoitia*, mais elle n'était pas reconnue comme une rhoptrie.

Un autre argument morphologique pouvant soutenir le rôle sécréteur des rhoptries provient de la pénétration du rouge du ruthénium (traceur) occasionnellement dans les pédoncules des rhoptries des sporozoïtes d'*Isospora* lors des fixations (JENSEN et EDGAR 1978). NICHOLS et al (1983) ont observé une fusion de la membrane de la rhoptrie avec la membrane limitante antérieure du Toxoplasme, produisant une ouverture vers l'extérieur, lors de l'invasion de la cellule-hôte; cette fusion se ferait par le moyen de la vésicule apicale et des particules en rosette (DUBREMETZ et TORPIER 1978, PORCHET et NICOLAS 1983).

Selon les auteurs le contenu des rhoptries pourrait être des substances protéolytiques (GARNHAM et al 1960) ou bien des substances induisant la modification de la membrane de la cellule-hôte, amphiphiles (JENSEN et EDGAR 1976 b), des protéines riches en histidine (KILEJIAN 1976), des phospholipides (BANNISTER et al 1975), des substances riches en lipides, pauvres en protéines, (Mc LAREN et al 1979).

LYCKE et NORRBY (1966), LYCKE et al (1975) rapportent la production par *Toxoplasma* d'un facteur accroissant la pénétration : le "Penetration Enhancing Factor". Des cellules Hela qui viennent d'être infestées par ce parasite, DUBREMETZ (1981), DUBREMETZ et al (1982) identifient une protéine spécifique (25 KD) qui pourrait être produite par le parasite lors de l'invasion.

La zone de constriction que nous avons remarquée lors de l'invasion des cellules Hela par *Besnoitia jellisoni* et notée par FAYER et al 1969, ne serait-elle pas la jonction mobile décrite à propos de la pénétration de *Plasmodium* dans l'érythrocyte par AIKAWA et al (1978), de celle de *Toxoplasma* dans la même cellule (MICHEL et al 1980, PORCHET et TORPIER 1983) et soupçonnée par DUBREMETZ (1981) à propos de *Toxoplasma* et *Sarcocystis* en pénétration dans des cellules Hela ?

La présence de l'anneau d'étranglement lors de la pénétration rapide et lente avec torsion du parasite chez *Besnoitia* suggère que l'entrée peut s'effectuer à des vitesses différentes que nous supposons régulées par le parasite, c'est à dire que, dès que le parasite entré en contact avec le plasmalemmme de l'hôte, il y a une zone de contact assez étroite, annulaire entre le zoïte et son hôte, celui-ci progresse en rotation dans la cellule et l'étranglement coulisse vers sa partie postérieure, la vitesse de coulissage de l'anneau dépend de la rapidité avec laquelle le parasite entraîne devant lui la membrane de l'hôte.

FACTEURS "BIOLOGIQUES" ET PHYSICOCHIMIQUES

Toutes les cellules vivantes sont soumises à l'influence de leur environnement immédiat.

Le système de culture *in vitro* permet d'étudier les paramètres biologiques et physiques qui peuvent influencer la pénétration et le développement des parasites :

- Type et origine des cellules

Besnoitia jellisoni a été cultivé sur différents types de cellules (voir DORAN 1982).

FAYER et al 1969 suggèrent que les cellules de la rate et de la trachée de Bovin sont plus favorables au développement de *Besnoitia jellisoni* que les cellules MDCK (MADIN DARBY BOVIN KIDNEY).

AKINCHINA et DOBY 1969 b ont remarqué que les cellules de type fibroblastes sont plus sensibles que celles d'origine épithéliale. De même, les fibroblastes qui existent dans les cultures de cellules rénales de porcs et de lapins ont été plus sensibles que ceux d'embryons de poulets.

Nous avons cultivé *Besnoitia jellisoni* sur de nouveaux types de cellules, qui toutes se sont révélées accueillantes pour le parasite.

. Cellules de chat (SADAK 1981) : Ce sont les cellules qui se sont avérées les plus fragiles.

. Cellules d'embryons de souris et de rat, le parasite se développe assez bien sur ces 2 types de cellules, mais l'hétérogénéité du tapis cellulaire n'est pas compatible avec une lecture précise des résultats (fig. 15, 20).

. Cellules EMT 6 (fig. 13) : en raison de la densité de leur cytoplasme les parasites ne sont pas bien visibles sur le vivant.

. Cellules Hela (fig. 14, 16, 17, 18, 21), ce sont les cellules les plus résistantes et qui permettent les meilleures conditions d'observation et de comptage.

Figures 13 à 18 : Comparaison de divers types cellulaires employés dans les infections par *Besnoitia* (flèches)
Les préparations sont fixées et colorées, sauf 14 qui est une vue en contraste de phase.

13 : cellules EMT6 : ces cellules ne permettent pas une bonne visualisation du parasite en raison de leur opacité cytoplasmique

15 : cellules embryonnaires de Souris : la culture trop jeune probablement montre des chevauchements cellulaires incompatibles avec la détection des parasites

17 : les cellules Hela sont les plus favorables à l'observation des bradyzoïtes

14 : clone de cellules Hela en fin d'observation en cinéma ; la flèche droite montre l'éclatement d'une cellule libérant les parasites, la flèche courbe un stade un peu antérieur.

16 : cellules Hela : deux parasites dans une même vacuole signifient qu'il y a eu 1 division consécutive à la pénétration d'1 parasite, et non pas pénétration de 2 parasites qui seraient alors situés dans des vacuoles différentes

18 : vue à l'immersion montrant que chaque parasite possède sa propre vacuole.





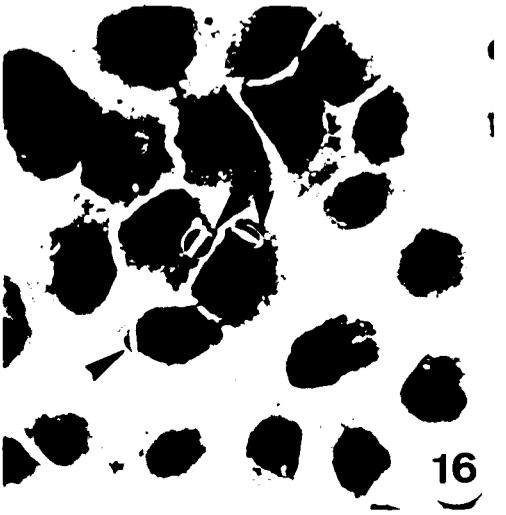
13



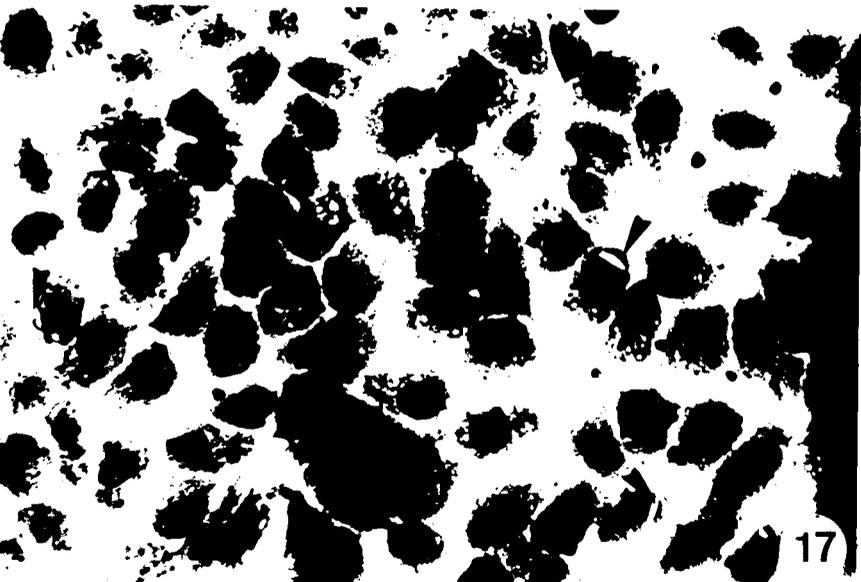
14



15



16



17



18

Cellules de rein de Singe (cellule Vero) : ces cellules semblent très favorables pour la pénétration et l'observation des parasites.

- Température

Nous n'avons pas étudié l'action de la température sur la culture de *Besnoitia*. Toutefois nous avons pu noter que les zoïtes de *Besnoitia jellisoni* ont un développement optimum à 37°C ; une température de 40°C permet aussi une multiplication des zoïtes presque normale ; celle-ci est ralentie à 20°C ; elle est inhibée à 4 °C ainsi que la pénétration des zoïtes.

- PH

Un pH compris entre 7 et 7,8 est favorable à la pénétration et au développement de *Besnoitia* dans les cultures de cellules.

Le pH optimum pour le développement des cellules et du parasite est de 7,2 à 7,4.

- Lumière

L'exposition des zoïtes de *Besnoitia jellisoni* intracellulaire à une lumière continue provenant d'une ampoule halogène (12V, 100W), interceptée par un filtre vert avant d'arriver sur les cellules, provoque un ralentissement du temps de génération des zoïtes ; dans ces conditions leur première division ne s'est produite que 72 heures après l'inoculation. Sur le vivant et en microscopie électronique (fig. 19) les parasites ainsi "illuminés" apparaissent avec une grosse vacuole dans le cytoplasme, celle-ci déloge le noyau de sa position normale (du centre du corps du parasite légèrement vers la partie postérieure). On note aussi une accumulation de mitochondries et de réticulum endoplasmique autour de la "vacuole parasitophore" (figure 19).

Les cellules hôtes Hela contenant ces parasites ont continué à se diviser et n'ont pas montré sur le vivant de signe évident de sensibilité à cette lumière comme *Besnoitia*. Un travail récent présente des observations similaires :

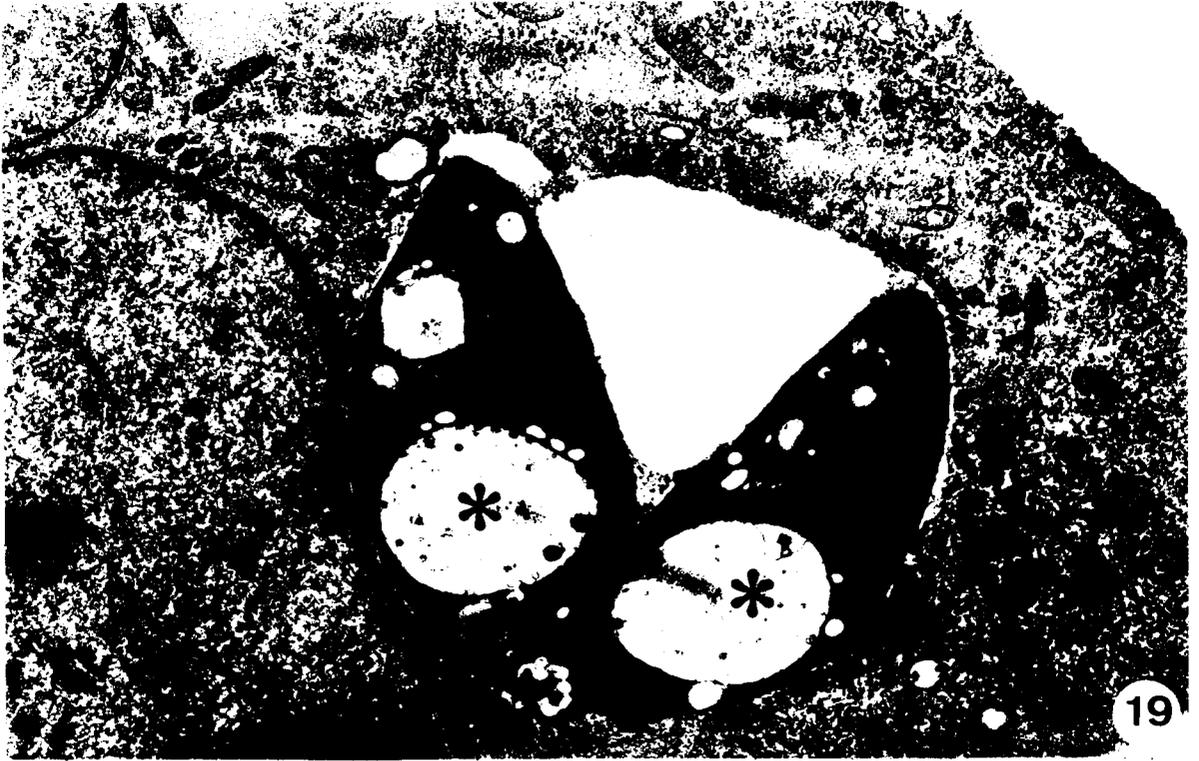
ENDO et al (1981) ont observé une inhibition de la multiplication dans des macrophages et une vacuolisation des trophozoïtes de *Toxoplasma* soumis à des rayons ultra violets (UV : 2,539A°).

Figure 19 : Ces deux parasites dans une cellule-hôte ont été exposés en continu à la lumière d'une lampe aux halogènes. Des anomalies sont intervenues, au niveau de la structure (apparition d'énormes vacuoles réfringentes sur le vivant - signalées par un symbole étoilé *) et de la division : la première division s'est faite avec un retard de deux jours encore est-elle probablement anormale (x 13400).

Figure 20 : Accumulation de tachyzoïtes de *Besnoitia* par fusion de plusieurs vacuoles-hôtes dans une cellule d'embryon de souris après 3 jours de culture.

Figure 21 : hyperinfection d'une culture de cellules Héla par un nombre trop élevé de bradyzoïtes (25 millions/boîte). Noter (flèche courbe) que le cytoplasme de certaines cellules est complètement occupé par des vacuoles contenant des parasites





		Nombre total de cellules	Nombre total de parasites	Nombre de cellules parasitées	N.R.U.I.	Pourcentage de cellules parasitées
Sérum de veau 0%	Try 0%	Σ 436 X̄ 29,07 S 5,39	28 1,87 1,19	27 1,80 1,08	6,42	6,19
	Try 0,25%	Σ 371 X̄ 24,73 S 8,56	51 3,40 2	46 3,07 1,79	13,75	12,40
	Try 0%	Σ 385 X̄ 25,67 S 3,46	42 2,80 1,42	36 2,40 0,99	10,91	9,35
	Try 0,25%	Σ 331 X̄ 22,07 S 4,30	57 3,80 2,01	52 3,47 1,64	17,22	15,71
	Try 0%	Σ 392 X̄ 26,13 S 3,81	50 3,33 1,72	44 2,93 1,39	12,76	11,22
	Try 0,25%	Σ 408 X̄ 27,2 S 4,39	70 4,67 1,99	63 4,20 1,82	17,16	15,44

Tableau I : Influence de la préincubation des bradyzoïtes dans la trypsine et le sérum sur la pénétration dans les cellules.

Les colonnes verticales portent les nombres de cellules et de parasites dénombrés dans la surface de référence (de $525 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2$) correspondant à la lecture de 15 rectangles pris au hasard dans une boîte de culture), ainsi que le NRUI et le pourcentage de cellules parasitées.

Horizontalement apparaissent les combinaisons expérimentales réalisées.

Les moyennes des nombres rectangle par rectangle ont aussi été calculées : \bar{X} , et l'écart type estimé : S.



I - EFFET DE LA TRYPSINE ET DU SERUM DE VEAU SUR L'INVASION DES CELLULES HELA PAR BESNOITIA

La trypsine et le sérum sont d'utilisation courante en culture de cellules. La possibilité d'un contact entre ce parasite et ces deux facteurs existe aussi sur le vivant, lors d'un passage dans le tube digestif d'un hôte. C'est pourquoi nous avons trouvé bon de tester l'action de ces substances sur notre parasite.

A - EFFET DE LA TRYPSINE SUR L'INVASION DES CELLULES HELA PAR LES BRADYZOÏTES DE *BESNOITIA JELLISONI* EN PRESENCE OU EN ABSENCE DE SERUM DE VEAU A DIFFERENTES CONCENTRATIONS.

Quatre heures avant l'inoculation, 2 boîtes de cellules Hela ont été lavées 3 fois avec du MEM sans sérum de veau et laissées avec 4 ml de ce milieu, 4 autres boîtes ont reçu du MEM contenant 2% ou 10% de sérum de veau.

1 - RESULTATS

Ces boîtes ont été inoculées par des bradyzoïtes incubés ou non dans la trypsine à 0,25%, pendant 10 minutes à 37°C : les résultats de ces expériences sont rapportés dans le tableau I (ci-contre).

La présence de la trypsine entraîne une augmentation du NRUI et du pourcentage de cellules parasitées, qui ont presque doublé par rapport aux témoins.

L'invasion des cellules Hela par les bradyzoïtes de *Besnoitia* traités par la trypsine en présence de sérum de veau est sensiblement améliorée : Le NRUI passe de 13,75 à 17,22 ou 17,16 alors que le pourcentage de cellules parasitées passe de 12,40 à 15,71 ou 15,44. On remarque que l'invasion n'augmente plus quand la concentration du sérum dans le milieu passe de 2% à 10%. Par contre, en absence de trypsine, le taux de pénétration continue à augmenter. (Figure 22).

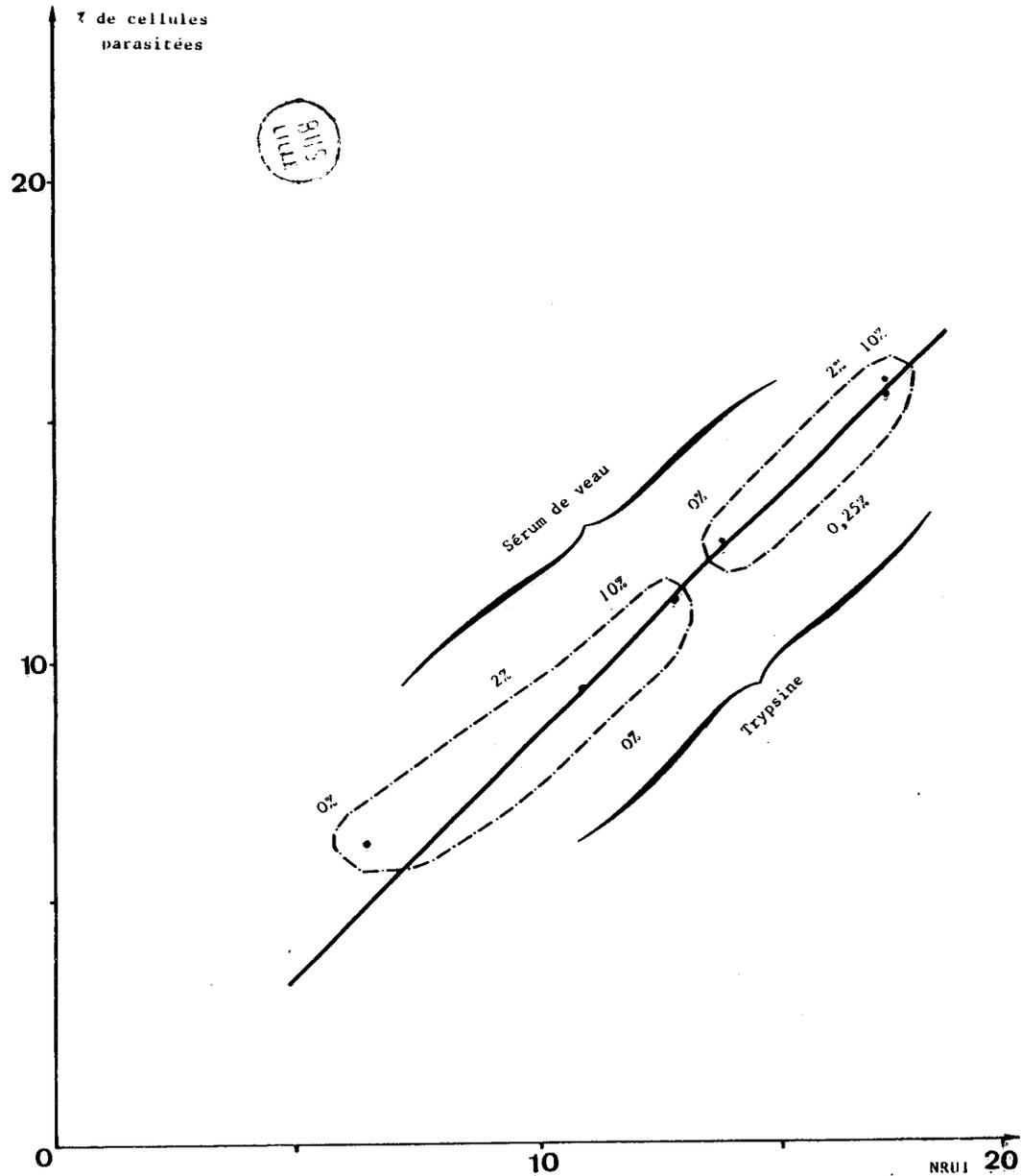


Figure 22: Représentation graphique du pourcentage de cellules parasitées en "fonction" du NRUI. Action du Sérum de veau (0,2 et 10%) et de la trypsine (0 et 0,25%).

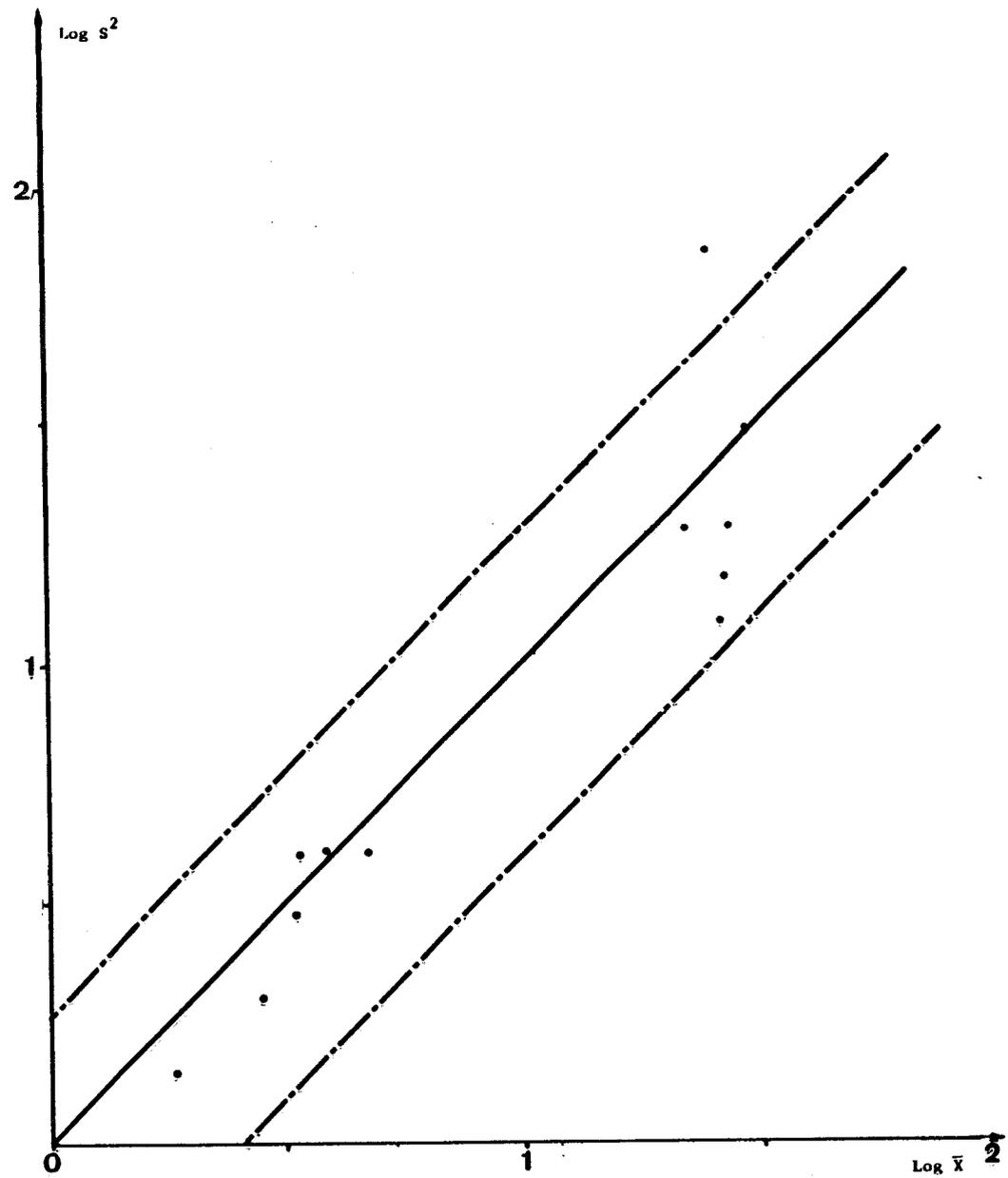


Figure 23: Liaison statistique moyenne-variance, en log-log, obtenue pour les nombres de cellules par rectangle (étoiles) et pour les nombres de parasites par rectangle (points). Chaque point ou étoile correspond à la surface de référence de 525.10^{-4} mm^2 , et chaque moyenne ou variance est obtenue sur 15 rectangles pris au hasard sur une même boîte. Les traits discontinus délimitent la zone de confiance à 95% de la loi de POISSON théorique, représentée par la première diagonale (moyenne-variance: trait plein).

Les données du tableau I, nous ont permis de réaliser un graphique en métrique (log-log) reliant les log des variances à ceux des moyennes des cellules de nos boîtes : Figure 23 . on constate que la répartition des cellules Héla (sauf pour 1 cas) dans nos boîtes ainsi que celle des parasites restent dans la zone de confiance de la loi de Poisson à 95%, donc ils sont dispersés au hasard sur toute la boîte.

2 - Discussion

En parasitologie la technique de digestion trypsique a été adoptée par plusieurs chercheurs pour isoler des parasites de tissus d'animaux infestés chroniquement (SHARMA 1981, ^{et DUBÉY}), ou bien pour l'exystation d'oocystes comme ceux d'*Eimeria* (DORAN et FARR 1962, JACKSON 1962) pour libérer les parasites infectieux pour les cultures *in vitro*.

Par ailleurs les zoïtes de *Sarcocystis tenella* qui ne sont pas spontanément mobiles à 37°C en solution saline physiologique, le deviennent par addition de trypsine (DUBREMETZ et al 1975). Il était donc intéressant de rechercher si cette enzyme peut agir aussi sur des espèces naturellement mobiles, comme *Besnoitia*.

Nous avons choisi de quantifier l'action de la trypsine sur le taux de pénétration de *Besnoitia jellisoni*. Au cours de cette étude nous avons obtenu une activation des bradyzoïtes qui est mise en évidence par l'augmentation du nombre de parasites intracellulaires. Au contraire une incubation de 10 mn à 37°C dans la trypsine 0,25% dans du PBS s'est montrée nocive pour les tachyzoïtes, qui sont tous tués.

Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer l'action de la trypsine sur la motilité et le pouvoir de pénétration du germe infectieux des coccidies, lequel dépendrait de la motilité (VANDERBERG 1974, JENSEN et EDGAR 1976a, WERK et BOMMER 1980, RUSSEL et SINDEN 1981, SINDEN 1981, RUSSEL 1982).

a) Elle pourrait agir en coupant une protéine membranaire ainsi que cela a été proposé chez *Sarcocystis* (DUBREMETZ, 1981)

b) La présence d'une charge de surface négative, chez la plupart des cellules a été rapportée par WEISS (1969) ; il en est de même pour *Plasmodium* (BANNISTER (1977) et d'autres coccidies (DUBREMETZ (1981).

La trypsine pourrait libérer les groupements acides auxquels sont attribués essentiellement les charges négatives, tels que les groupements carboxyl (PHILIPPE et al 1979) ; son action sur le parasite aurait ainsi pour conséquence de diminuer les forces de répulsion entre celui-ci et sa cellule hôte, donc favoriserait l'attraction et l'attachement entre

les deux, attachement qui semble être un évènement essentiel pour l'accomplissement de l'invasion (BANNISTER 1977, DVORAK et CRANE 1981, SINDEN 1981, RUSSEL 1982, MEIRELLES et al 1982, CRANE et DVORAK 1982).

c) Enfin on ne peut exclure une action possible au niveau du cell-coat. Celui-ci bien que très discret, est présent à la surface du *Plasmodium* (MILLER et al 1975, AIKAWA et al 1978), du *Toxoplasme* (TAKEUCHI 1977, PORCHET et TORPIER 1983). Nous avons observé la même structure chez *Besnoitia jellisoni* en microscopie électronique (fig. 1). Ce cell "coat" permet au *Plasmodium* de s'attacher aux globules rouges. Il consiste en des glycoprotéines, et disparaît après traitement par la trypsine (MILLER et al 1975). Celle-ci intervient dans beaucoup d'interactions ligand-cellule (ASHWELL et MORELL 1977, SHARON et LIS 1972, KEUSCH 1979) et cellule - cellule (PHILLIPS et GARTNER 1980).

BAUMANN et DOYLE (1979) rapportent que les cellules HTC (Heptoma tissue cells) exposées à une faible concentration de trypsine pour une durée de temps courte, développent une affinité les unes pour les autres, elles forment des agrégats immédiatement quand elles sont légèrement secouées.

Nous pensons que l'action de la trypsine pourrait consister en un clivage ou élimination des constituants du cell-coat du parasite, qui entraînerait un démasquage de sites de reconnaissance, d'où une plus grande affinité pour la cellule-hôte, influençant le taux de pénétration.

		Nombre de cellules parasitées		Nombre total de cellules		Nombre total de parasites		N.R.U.I.		Pourcentage de cellules parasitées	
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
Sérum de veau 0%	Σ	47	37	619	608	49	40				
	X	3,13	2,47	41,27	40,53	3,27	2,67	7,92	6,58	7,59	6,09
	S	0,99	1,55	5,30	6,39	1,03	1,59				
Sérum de veau 2%	Σ	105	52	587	673	126	53				
	X	7,00	3,47	39,13	44,87	8,40	3,53	21,47	7,88	17,89	7,73
	S	2,42	1,85	6,98	4,82	3,60	1,81				
Sérum de veau 5%	Σ	110	82	650	658	121	92				
	X	7,33	5,47	43,33	43,87	8,07	6,13	18,62	13,98	16,92	12,46
	S	2,87	2,29	5,55	4,60	3,35	2,77				
Sérum de veau 10%	Σ	110	93	633	600	118	100				
	X	7,33	6,20	42,20	40,00	7,87	6,67	18,64	16,67	17,38	15,50
	S	2,74	2,14	4,92	4,11	3,27	2,29				

Tableau II : Influence de la préincubation des parasites dans des milieux contenant des concentrations différentes en Sérum de veau sur leur capacité infestante.

(Ce tableau est construit selon les mêmes principes que le tableau I).



B - EFFET DU SERUM SUR L'INVASION DES CELLULES HELA PAR BESNOITIA

Après une phase de croissance exponentielle de 2 jours, chaque boîte de culture est lavée 3 fois et laissée dans du MEM sans sérum pendant quelques heures, le dernier lavage est suivi par l'addition de milieu MEM comportant du sérum de veau à des concentrations différentes : 0%, 2%, 5% et 10%. Une boîte est inoculée pour chaque traitement avec 4 millions de bradyzoïtes et les cultures sont incubées à 37°C. L'expérience a été réalisée à 2 reprises.

1 - Résultats

Le NRUI et le pourcentage de cellules parasitées augmentent avec la concentration en sérum dans le milieu. Cependant les chiffres obtenus varient d'une expérience à l'autre, le nombre de cellules parasitées obtenu dans la deuxième expérience a été plus faible que celui obtenu lors de la première (Tableau II, ci contre).

La représentation graphique du : Log du NRUI
et du pourcentage de cellules parasitées en fonction de la concentration du sérum de veau dans le milieu (Fig.24) montre qu'à une concentration de 10% le sérum de veau n'améliore que légèrement le résultat de la pénétration obtenue avec des concentrations plus faibles.

Le nombre de parasites qui ont pénétré dans les cellules ainsi que le nombre de cellules parasitées, sont deux fois plus importants en présence de sérum (Tableau II).

La représentation graphique du $\text{Log } \bar{X}$ des nombres moyens de cellules et de parasites totaux en fonction du $\text{Log } S^2$ de leur variance moyenne respective (Fig.25) montre une répartition au hasard sur la boîte des parasites et des cellules puisque les valeurs sont de part et d'autre de la droite représentant la loi de Poisson et sont contenues dans la zone de confiance de cette loi à 95%.

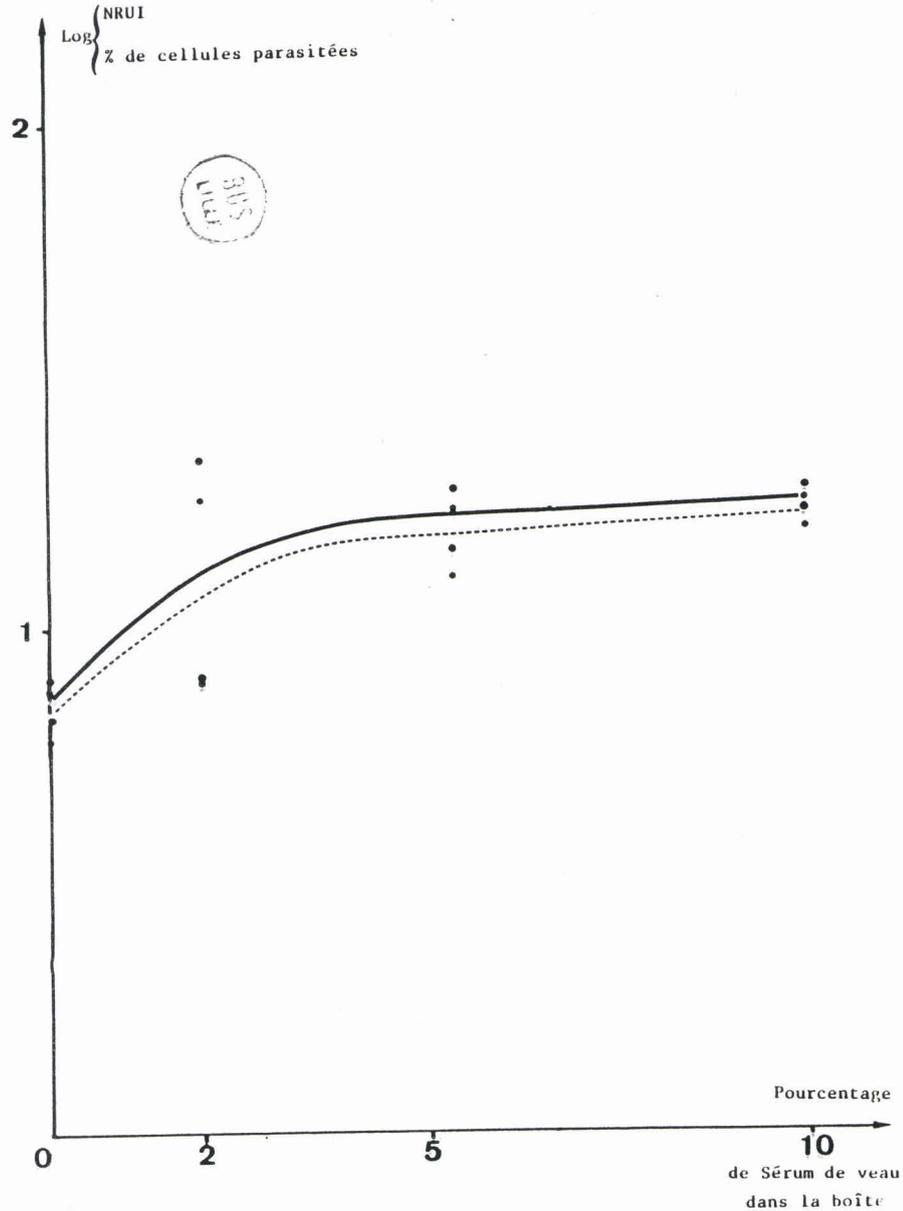


Figure 24: Représentation du log du NRUI et du pourcentage de cellules parasitées en fonction de la concentration du sérum de veau dans le milieu.

—: NRUI, - - -: % de cellules parasitées.

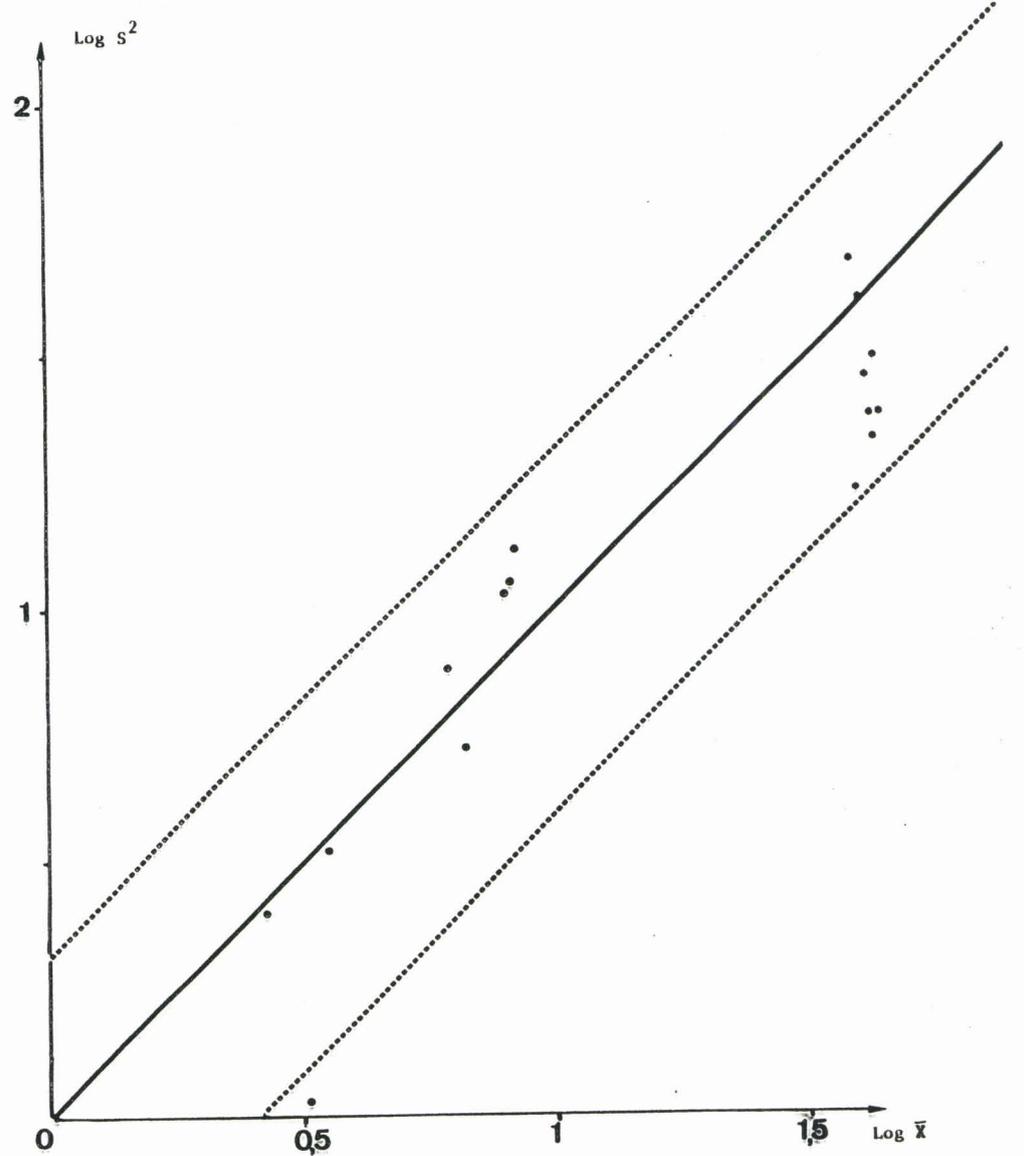


Figure 25: Relation entre le $\log S^2$ et le $\log \bar{X}$ (figure construite sur le même modèle que la courbe 23.)

2 - Discussion

Nous avons observé une amélioration de la pénétration de *Besnoitia jellisoni* dans les cellules Hela en présence de sérum de veau. Cette augmentation ne change presque pas entre 5 ou 10% de sérum.

Le sérum est un composé hautement complexe, dont la composition peut varier selon l'espèce animale dont il provient et dont les propriétés biologiques peuvent être tout à fait inattendues dans la mesure où le "passé immunologique" de cet animal n'est pas connu.

Il faut dire que la littérature concernant l'effet du sérum sur le parasite lui-même et sa motilité ou ses capacités infectives n'apporte pas de conclusions claires et que les observations sont même parfois apparemment contradictoires :

- le sérum aurait un effet "protecteur" sur le zoïte :

. Selon LYCKE et LUND (1964 b), l'addition de sérum-dénaturé ou non par la chaleur a un effet protecteur sur le Toxoplasme au cours des centrifugations et au delà d'une concentration de 20% le sérum n'augmente plus cet effet stabilisant.

- le sérum active la mobilité de *Sarcocystis tenella*. Cette observation conduit DUBREMETZ (1981) à envisager une action de type enzymatique (par analogie avec l'activation produite par la trypsine).

- le sérum ne serait pas indispensable pour la pénétration intracellulaire de *Toxoplasma* :

. LUND et al (1963 a), SHIMIZU (1963) trouvent qu'un plus grand nombre de zoïtes de *Toxoplasma* entrent dans les cellules quand le milieu ne contient pas de sérum. Le même résultat a été trouvé par TURNER et BOX (1970) pour *Isospora lacazei* et/ou *I. cloridis*.

- le sérum augmenterait la mobilité et l'infectivité de *Plasmodium* et d'*Eimeria*

Une augmentation de la mobilité et de l'infectivité de *Plasmodium* par le sérum normal (non immun) est montré par (SPITALNY 1973, SPITALNY et

et al

NUSSENZWEIG 1972, STROME et al 1979) cités par DANFORTH (1980). Cet auteur a remarqué une augmentation de la pénétration du même parasite en présence de sérums d'animaux susceptibles à l'infection par celui-ci.

Cette activation ne serait cependant pas identique selon le type et la provenance du sérum. URQUHART (1982) montre que l'invasion des cellules de rein de poulet par les sporozoïtes d'*Eimeria tenella* est diminuée avec le sérum de veau nouveau-né (NBCS) et le sérum de cheval donneur (DHS) alors que le sérum de poulet n'est pas inhibiteur.

DORAN (1971) a trouvé que les sporozoïtes d'*Eimeria tenella* pénètrent plus en présence de 5% de Sérum de veau Foetal qu'en présence de 5% de sérum de poulet.

- Par sa composition en anticorps, lorsque celle-ci est connue, le sérum peut avoir une action spécifique :

Les sérums provenant de malades atteints par la malaria réduit l'invasion de globules rouges par *Plasmodium falciparum* (MYLER et al 1982).

In vitro les IgG et IgM des immun-sérums bloquent l'invasion des globules rouges par *Plasmodium knowlesi* (COHEN et al 1969, MILLER et al 1975) et des cellules humaines par *Plasmodium falciparum* (PHILIPS et al 1972).

Sur le mode possible d'action du sérum, les hypothèses foisonnent :

- d'après une étude détaillée sur *Plasmodium*, VANDERBERG (1974) considère que l'activation de la mobilité du *Plasmodium* est invariablement associée à l'infectivité et que les concentrations de sérum entre 10 à 25% sont optimales, ce qui serait probablement lié aux taux les plus favorables d'albumine et de globulines, celles-ci étant inhibitrices et celle-là stimulatrice de la motilité.

D'autres substances, présentes dans le sérum peuvent aussi être tenues pour responsables de son activité ; il pourrait agir par :

/ Un apport de monosaccharides : qui sont d'après CRANE et al (1982) probablement utilisés par le parasite comme une source d'énergie pour la respiration. Ces chercheurs montrent la stimulation de l'infection des cellules de vertébrés par *Toxoplasma gondii* et *Trypanosoma cruzi*, par l'addition de

certaines monosaccharides dans le milieu de culture.

/ Un apport de cations divalents : la dépendance de la pénétration de cations divalents Mg^{2+} et Ca^{2+} a été démontrée par LYCKE et al (1975), ENDO et al (1982) chez *Toxoplasma*, et en monosaccharides et Mg^{+} dans l'infection des cellules de vertébrés chez le même parasite par TANABE et al (1980).

/ un apport de glycoprotéines ou glycolipides : SCHULMAN et al (1980), rapportent que les sporozoïtes de *Plasmodium* sont capables de fixer les composantes du sérum à leur surface. En outre ils ont montré que celles-ci une fois fixées peuvent jouer un rôle dans l'invasion du foie en fonctionnant comme des sites de reconnaissance des récepteurs à la surface des membranes des cellules de foie-hôte qui vont être envahies, opinion partagée par HOLMBERG et al (1981).

Toutes ces hypothèses avancées sur l'action possible du sérum pourraient être prises en considération à propos de *Besnoitia*.

Par ailleurs, le sérum peut agir aussi sur la cellule-hôte. Ainsi les récepteurs cellulaires peuvent-ils être influencés par l'adsorption de certaines composantes du sérum qui ne disparaissent pas même après un lavage vigoureux (HAMBURGER et al 1963). Une implication pratique de ceci est que, non seulement la culture dans du Xénosérum (ou Sérum hétérologue), mais également n'importe quel contact préalable des cellules avec un Xénosérum peut conduire à des effets inattendus dus à l'adsorption par la surface cellulaire de composantes du sérum (DENIZOT et GOLSTEIN, 1982) On peut considérer les cellules en culture dans du sérum comme si elles étaient dans un Océan de structures étrangères.

et al

TAMM (1982) montre que le sérum de veau foetal à la concentration aussi basse que 2,5% contient des facteurs de croissance et d'autres composantes en quantité suffisante pour assurer la prolifération de la population des cellules Hela à un taux exponentiel maximum.

Nous pouvons donc dire que l'utilisation de 2 à 5% de sérum de veau pour des expériences avec les cellules Hela n'est pas seulement favorable au

développement de celle-ci et à la pénétration de *Besnoitia*, mais permet aussi une économie de grande quantité de sérum lors des cultures en masses des parasites ou bien des cellules.

Temps d'incubation (en heures)		Nombre total de cellules		Nombre total de parasites		Nombre de cellules parasitées		N.R.U.I.		Pourcentage de cellules parasitées	
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
0,5	Σ	710	805	21	42	21	41				
	\bar{X}	47,33	53,67	1,40	2,80	1,40	2,73	2,96	5,22	2,96	5,09
	S	8,06	10,68	1,24	1,93	1,24	1,79				
1	Σ	876	860	44	42	44	39				
	\bar{X}	58,40	57,33	2,93	2,80	2,93	2,60	4,88	5,02	4,53	5,02
	S	11,62	8,83	1,82		1,83	1,59				
4	Σ	982	932	81	65	78	63				
	\bar{X}	65,47	62,13	5,40	4,33	5,20	4,20	6,97	8,25	6,76	7,94
	S	16,06	6,83	2,72	2,35	2,68	2,24				
8	Σ	983	1028	107	135	101	127				
	\bar{X}	65,53	68,53	7,13	9,00	6,73	8,47	10,89	13,13	10,27	12,35
	S	9,56	12,58	2,56	3,72	2,31	3,31				
16	Σ	1255	1315	175	121	160	116				
	\bar{X}	83,67	87,67	11,67	8,07	10,67	7,73	9,20	13,94	8,82	12,75
	S	12,54	11,43	3,54	2,63	2,72	2,22				
24	Σ	1327	1539	159	165	148	157				
	\bar{X}	88,46	102,60	10,60	11,00	9,87	10,47	10,72	11,98	10,20	11,15
	S	19,07	11,72	3,46	5,37	3,14	4,78				

Tableau III : Influence du temps d'incubation sur le nombre relatif d'unités infectantes et sur le pourcentage de cellules parasitées.



II - PENETRATION EN FONCTION DU TEMPS

Nos observations en microscopie photonique des cultures de cellules Hela inoculées avec des bradyzoïtes de *Besnoitia jellisoni*, montrent que ces zoïtes pénètrent dans les cellules dès leur contact avec celles-ci à 37°C; 2 heures après l'inoculation, les parasites semblent perdre leur activité. Ceci suggère que quelques heures après l'inoculation, la pénétration des parasites dans les cellules est presque terminée.

1 - Résultats

6 lots, constitués chacun de 2 boîtes Falcon de 25 cm² sont inoculés. Chaque lot reçoit 4 millions de parasites. Les cultures sont incubées à 37°C. ^{après} des intervalles de temps variés : 0,5; 1; 4; 8; 16 et 24 heures, les cultures sont fixées, colorées, incluses et étudiées. Les résultats des comptages sont portés sur le tableau II. Les NRUI et les pourcentages des cellules parasitées calculés montrent que 3 à 5% des cellules sont parasitées 30 mn après l'inoculation. Vers 8 heures après celle-ci, le maximum de cellules parasitées semble être atteint.

Sur la Fig. 26 le log du NRUI et du pourcentage de cellules parasitées sont portés en fonction du temps d'incubation. Cette figure montre qu'après l'inoculation le nombre de parasites intracellulaires augmente rapidement et se stabilise aux environs de 5 à 6 heures : au delà on a un plateau.

Les conditions de répartition des parasites et des cellules sont rapportées dans le graphique 27 liant S^2 à \bar{X} en échelle log-log. Cette figure montre un nuage de points compris entre les 2 limites de la zone de confiance à 95% de la loi de Poisson on peut dire que la dispersion des cellules et des parasites est faite au hasard.

2 - Discussion

SENAUD et MEHLHORN 1978 ont observé que la pénétration des bradyzoïtes de *Besnoitia jellisoni* dans les cellules en culture monocouche de

Log { NRUI
% de cellules parasitées

Figure 26 :Tracé représentant le log du NRUI et du pourcentage de cellules parasitées en fonction du temps d'incubation.(en heures).

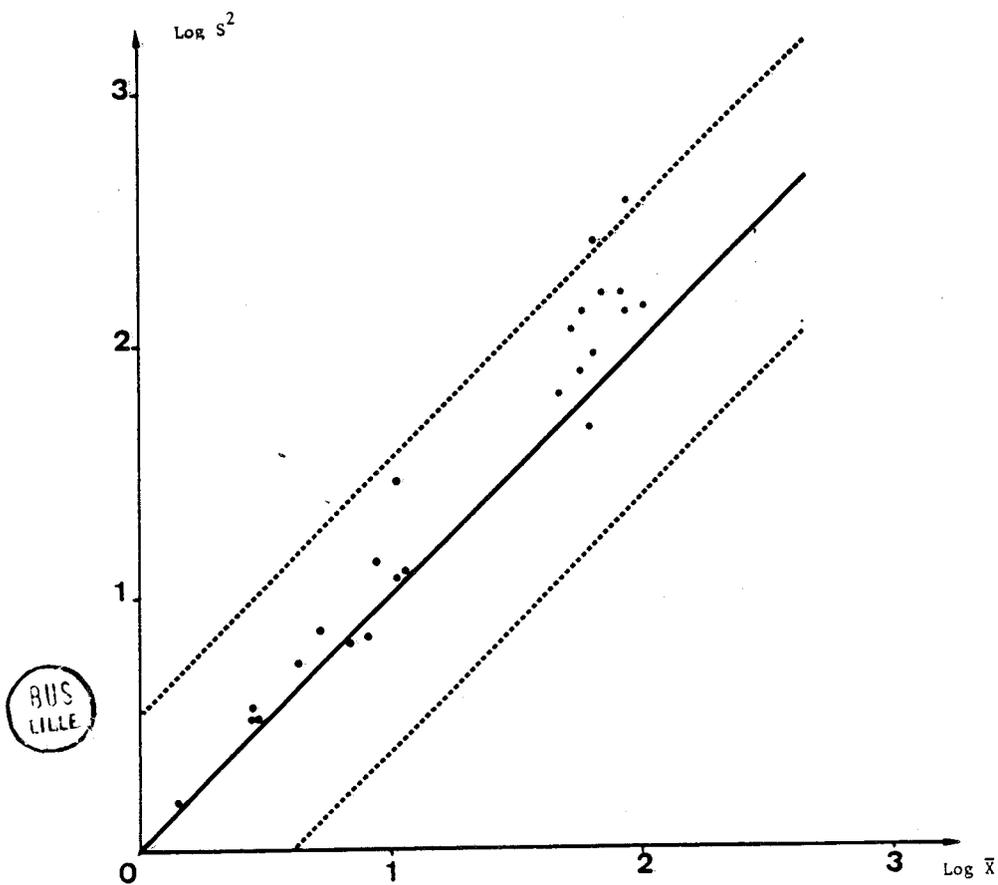
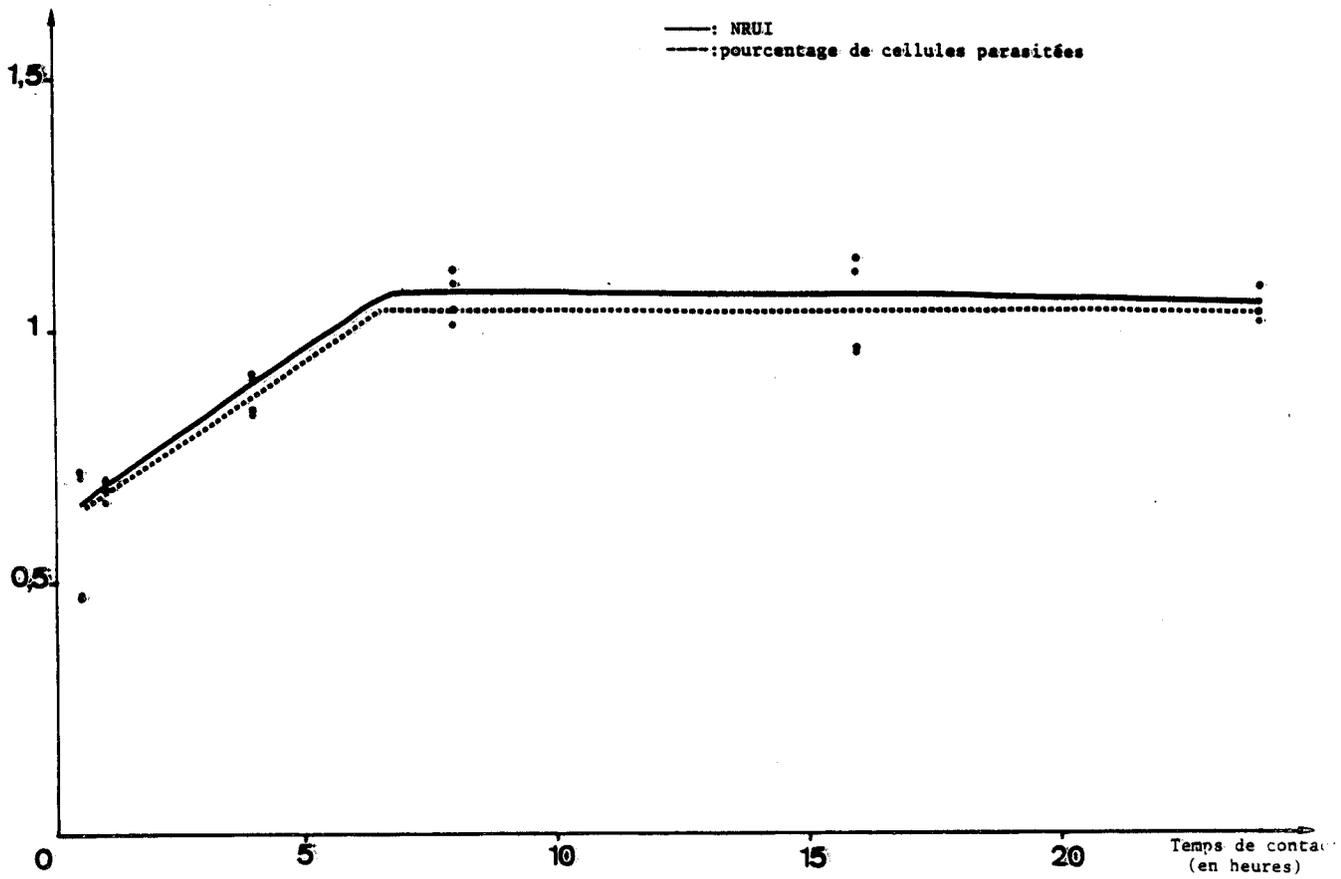


Figure 27:Représentation statistique de la moyenne-variance,(en log-log).La courbe est construite sur le même modèle que la figure 23.

rein de chien (MDCK) que celle-ci s'effectue dès les premières heures après l'inoculation.

Des expériences de cultures de fibroblastes de poulet et des lignées cellulaires transplantables du rein de lapin et du porc, infestées par des tachyzoïtes de *Besnoitia jellisoni* révèlent que la présence de parasites dans les cellules 10 à 30 mm après l'inoculation (AKINCHINA et DOBY 1969 a.), 20 à 30 mm dans les fibroblastes de poulet (DOBY et AKINCHINA 1968 ; AKINCHINA et DOBY 1969 b.) Selon ces auteurs, le délai suffisant à la pénétration de tous les germes infectants est d'environ 45 mm, à condition que l'exudat soit utilisé dans l'heure même de son prélèvement.

L'observation en microscopie photonique d'une culture de cellules Hela à 37°C, qui vient d'être inoculée avec des bradyzoïtes de *Besnoitia*, montre que dès que ceux-ci sédimentent et arrivent au contact avec les cellules, leur pénétration commence.

Les données que nous avons obtenues montrent un maximum de pénétration entre 4 à 8 heures après l'inoculation. A partir de là, l'invasion semble s'arrêter, cependant, si on regarde les résultats détaillés du tableau , on voit que la pénétration peut se poursuivre jusqu'à 24 heures après l'inoculation.

Certains auteurs ont mis en évidence la plus grande capacité infestante des bradyzoïtes fraîchement préparés. Nous avons donc voulu comparer la vitalité de bradyzoïtes "frais" à celle de parasites prélevés depuis un certain temps, étant donné que nos précédentes expériences montrent que la pénétration semble encore être possible assez longtemps après l'inoculation.

Trois types d'expériences ont été réalisées:

a - Infestation d'une culture de cellules Hela confluentes par des bradyzoïtes fraîchement isolés.

b - Infestation d'une culture identique par des bradyzoïtes conservés dans du MEM 2% sérum de veau à 37° pendant 16 heures.

c - Infestation d'une culture par des bradyzoïtes conservés pendant le même temps au contact d'une culture cellulaire, c'est à dire provenant de l'infestation d'une précédente culture.

Chaque lot est composé de 2 boîtes Falcon (25 cm²), contenant des cellules Hela confluentes, avec du milieu MEM 2% sérum de veau, inoculées avec 25 millions de bradyzoïtes. Après un lavage après 6 heures d'inoculation, les boîtes sont réincubées 19 heures à 27°C.

Les résultats obtenus sont les suivants :

1 ^{ère} expérience :	90% des cellules sont infestées
2 ^e expérience :	75% des cellules sont infestées
3 ^e expérience :	5% des cellules sont infestées.

Ceci montre que le contact des parasites avec les cellules diminue leur capacité de pénétration avec le temps, et que seuls quelques parasites gardent leur viabilité et leur pouvoir infectif longtemps après l'inoculation ceci a été montré par NORRBY (1970) chez *Toxoplasma gondii*. On peut aussi penser qu'une "sélection naturelle" s'est opérée et que les parasites encore présents dans le surnageant étaient des parasites par nature peu infectieux ou abimés. AKINCHINA et DOBY 1969 b rapportent que le délai de pénétration^{de} 20 à 30 mn dépend non seulement du nombre de germes inoculés en état d'évoluer ultérieurement, mais aussi du type de cellules utilisées en culture.

Les études sur *Toxoplasma gondii* (tachyzoïtes) rapportent qu'il est déjà intracellulaire 15 minutes ou moins après l'inoculation (SOURANDER et al 1960, LUND et al 1961).

Le taux de pénétration de *Toxoplasma* augmente jusqu'à 3 à 8 heures après l'inoculation (COOK and JACOBS, 1958, KAUFMAN et al 1958), continue jusqu'à 24 heures après celle-ci (ARAI et al 1958).

Il n'y aurait pas d'augmentation de la pénétration après 20mn d'inoculation de *Toxoplasma* selon MATSUBAYASHI et AKAO (1963), et aucune augmentation supplémentaire n'a été noté après 6 heures par LYCKE et LUND (1964 a).

Toujours à propos de *Toxoplasma*, d'après KUSUNOKI (1977),

l'invasion dépend de la source des organismes. Utilisant une souche BEVERLEY, il se trouve que les tachyzoïtes (de l'exudat péritonéal), les sporozoïtes (excystés d'oocystes) et les bradyzoïtes (des kystes) donnent des RNUI (Parasites/100 cellules) de 100, 75 et 55 respectivement.

Nos observations sur le vivant montrent clairement des mouvements actifs des tachyzoïtes de *Besnoitia* libérés à la fin de leurs divisions par rupture de leurs cellules hôtes. Puis ils rentrent immédiatement dans de nouvelles cellules.

Quelques minutes après l'éclatement de la cellule, les mouvements actifs des parasites restés extracellulaires ne sont plus détectables ; Ainsi, il semble pratiquement assuré que les tachyzoïtes sont plus fragiles que les bradyzoïtes et ne sont infectieux que très peu de temps. Cette hypothèse a été proposée pour la pénétration des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* dans les cultures cellulaires par LUND et al (1963a). DUBREMETZ (1981) constate que les tachyzoïtes de *Toxoplasma* ne survivent guère à un séjour de 1^H dans du MEM à 37°. Nous pensons aussi que le type cellulaire peut agir sur ce délai de pénétration.

Nous avons observé des parasites qui se mettent au contact des cellules par leur pôle antérieur pendant quelques minutes, puis se détachent des cellules sans y être entrés. On peut émettre la même hypothèse que celle de NORRBY (1970) ; à propos de *Toxoplasma gondii* : après sa séparation de la surface cellulaire le parasite aurait perdu une grande partie de sa capacité d'invasion, (par exemple en ayant rejeté sans succès la substance que beaucoup d'auteurs pensent responsable et indispensable à la pénétration ce qui nous mène à penser que les *Besnoitia* qui restent extracellulaires après un maximum de pénétration dans les cellules. Hela 4 à 8 heures après l'inoculation, sont ceux qui ont perdu leur capacité d'invasion par le traitement mécanique et physico-chimique lors de leur extraction des kystes, par leur essai de pénétration manqué, et ceux qui n'ont peut être jamais eu cette capacité. Cependant il reste toujours quelques rares parasites qui gardent leur viabilité et qui peuvent envahir les cellules même 24 heures après l'inoculation.

INFLUENCE DU NOMBRE DES CELLULES EN PRESENCE SUR LE TAUX DE PENETRATION

Nombre de bradyzoïtes introduits (en millions).		Nombre de cellules parasitées		Nombre total de cellules		Nombre total de parasites		N.R.U.I.		Pourcentage cellules parasitées	
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
0,25	E	53	14	418	452	58	14	13,88	3,10	12,68	3,10
	X	3,53	0,93	27,87	30,13	3,87	3,10				
	S	2	0,80	8,77	4,50	2,10	4,50				
0,50	E	110	32	441	491	147	33	33,33	6,72	24,94	6,52
	X	7,33	2,13	29,40	32,73	8,90	2,2				
	S	2,82	1,64	5,03	9,00	4,44	1,78				
1	E	110	50	407	654	123	54	30,22	8,26	27,03	7,65
	X	7,33	3,33	27,13	43,60	8,2	3,60				
	S	2,22	2,06	7,97	5,01	2,98	2,23				
2	E	120	125	404	662	155	143	38,37	21,60	29,70	18,88
	X	8,00	8,33	26,93	44,13	10,33	9,53				
	S	1,93	2,26	4,23	8,33	52,56	2,88				
4	E	221	222	471	641	307	317	65,18	49,45	46,92	34,63
	X	14,73	14,80	31,40	42,73	20,47	21,13				
	S	4,25	3,78	6,38	4,56	6,59	7,91				
8	E	218	190	440	425	357	295	81,14	69,41	49,55	44,71
	X	14,53	12,67	29,33	28,33	23,80	19,67				
	S	4,56	3,48	5,78	6,67	9,81	6,15				
16	E	306	365	333	617	1129	802	339,04	129,98	91,89	59,16
	X	20,40	24,33	22,20	41,13	75,27	53,47				
	S	4,88	5,00	4,71	6,12	22,49	15,83				
32	E	423	337	485	532	1181	826	243,51	155,26	87,22	63,35
	X	28,20	22,47	32,33	35,47	78,73	55,07				
	S	4,65	3,89	5,79	4,24	17,44	15,98				



Tableau IV : influence du nombre de bradyzoïtes inoculés sur le NRIU et le pourcentage de cellules parasitées.

Ce tableau est construit selon le même principe que les tableaux I et II.

I - RELATION ENTRE LA "TAILLE" DE L'INOCULUM ET LE POURCENTAGE DE PENETRATION

Plusieurs auteurs ont réussi à obtenir le développement *in vitro* de *Besnoitia jellisoni* en utilisant différents types de cellules en cultures monocouches. A notre connaissance aucune de ces études ne traite du rapport entre la concentration de l'inoculum en parasites et le taux de pénétration. Dans ce travail nous avons essayé de quantifier cette relation.

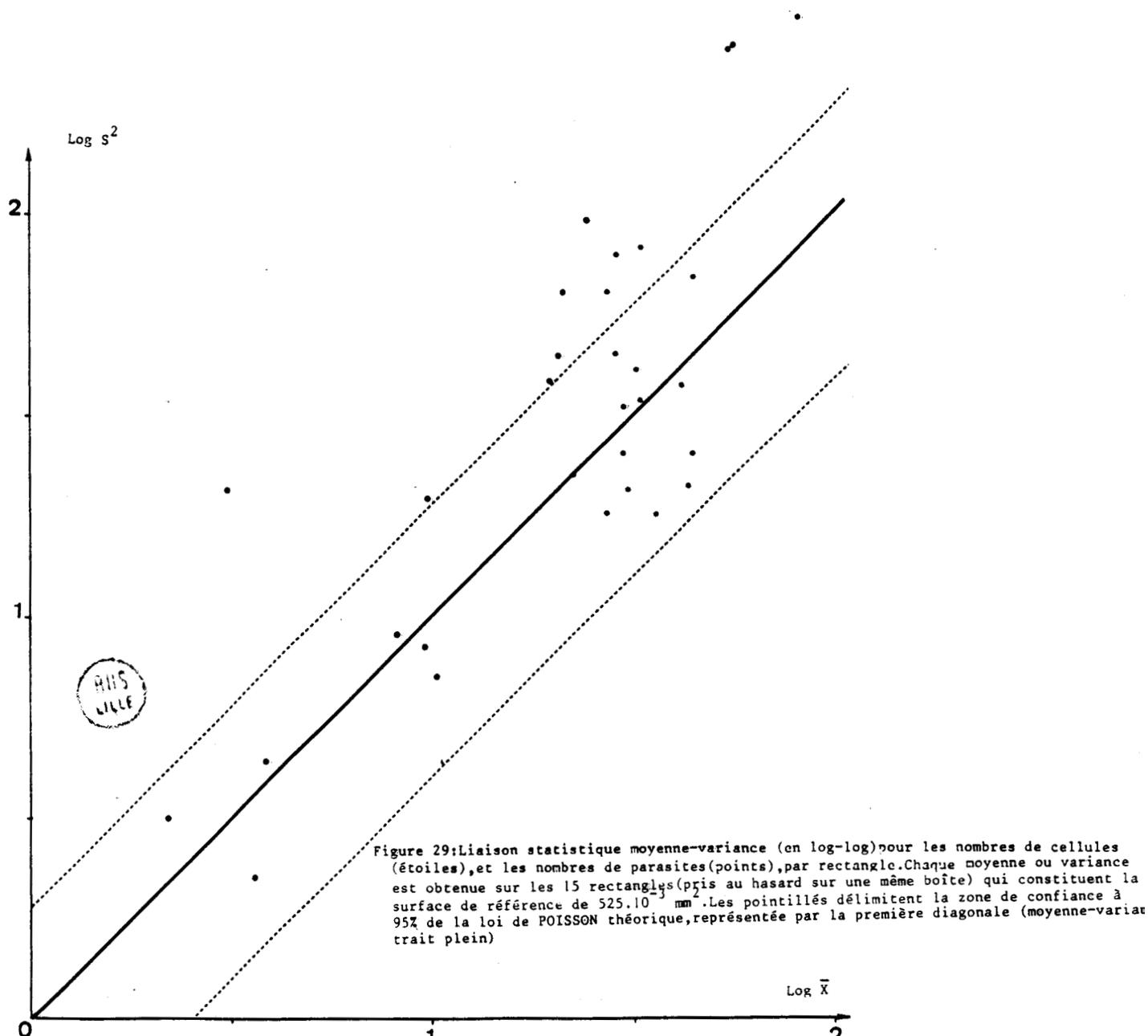
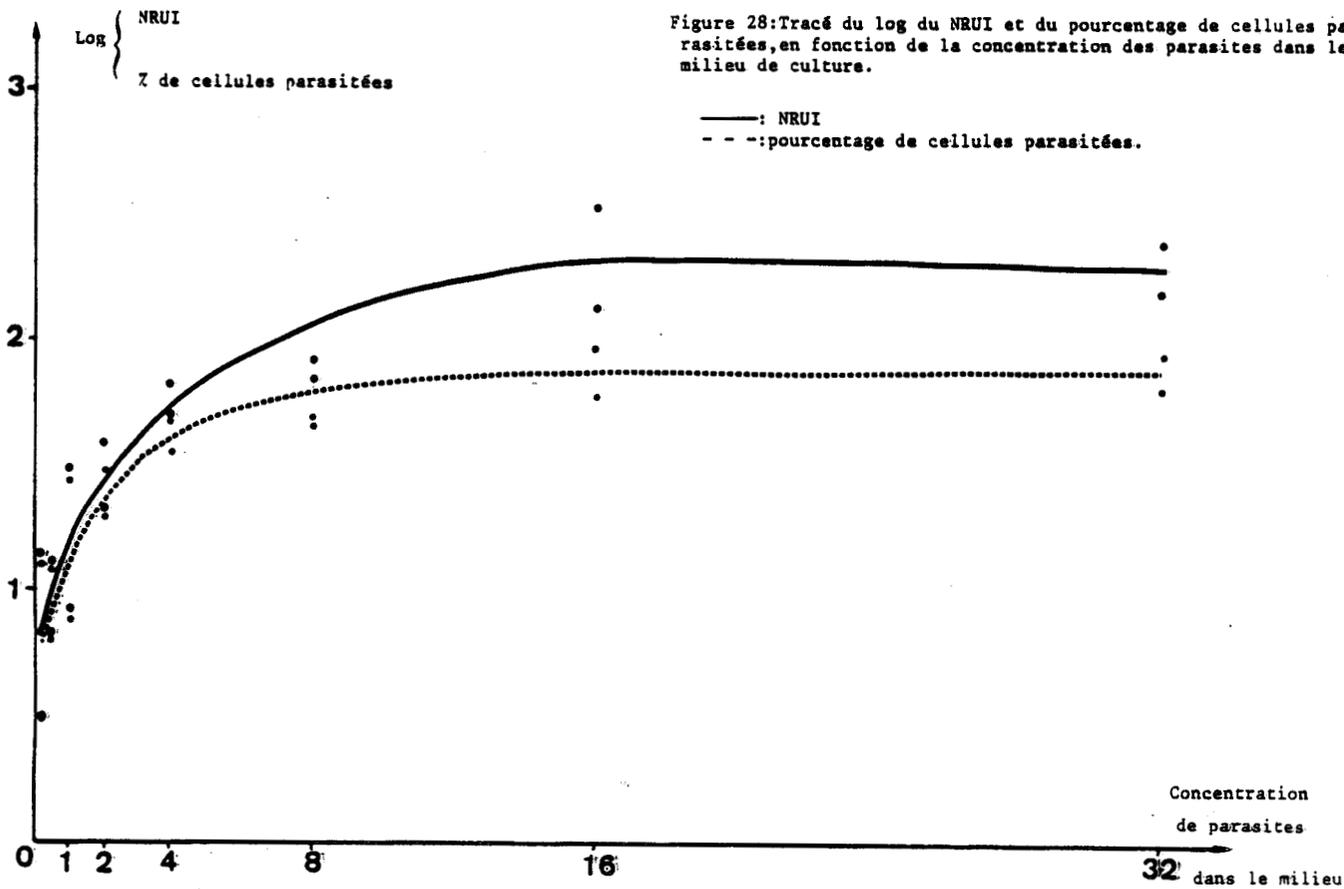
1 - RESULTATS

Des dilutions sériées de zoïtes sont effectuées de façon à avoir des suspensions de 1 ml de MEM 2% sérum de veau contenant de 250.000 à 32 millions de bradyzoïtes. Chaque dilution est inoculée à des cultures de cellules Hela presque confluentes. Les cultures sont incubées à 37°C pendant 19H avec un lavage 6 heures après l'inoculation. Après fixation, coloration et montage, la relation entre le NRUI, le pourcentage de cellules parasitées et la concentration des zoïtes est notée (Tableau IV) Les chiffres de la première expérience nous montrent que le NRUI et le pourcentage de cellules parasitées augmentent avec le nombre de parasites présents dans le milieu jusqu'à 16 millions, puis on a une légère chute (non significative) avec 32 millions. Par contre dans la deuxième expérience l'amélioration de la pénétration continue avec 32 millions de zoïtes.

Le NRUI et le pourcentage de cellules parasitées sont plus importants dans la première expérience.

La courbe 28 reliant le log du NRUI et du pourcentage de cellules parasitées à la concentration de parasites dans l'inoculum nous montre que les pourcentages de cellules parasitées et le nombre de parasites dans les cellules augmentent à peu près proportionnellement à la concentration de l'inoculum jusqu'à 16 millions de zoïtes, au delà la progression est inexistante (ou non significative).

Le graphique 29 illustre la relation entre $\log S^2$ et $\log \bar{X}$. Il montre que la distribution dans l'espace des cellules Hela est faite presque au hasard puisque la majorité des valeurs sont comprises dans la zone de confiance



de la loi de Poisson à 95%.

On peut estimer que la répartition des zoïtes est faite au hasard jusqu'à une concentration de 4 millions de parasites dans l'inoculum, mais qu'au delà on a une superdispersion.

2 - Discussion

HOLTZ et ALBRECHT (1953), LYCKE et LUND (1964 a), NORRBY (1970 b) rapportent que le nombre de *Toxoplasma gondii* entrant dans les cellules est proportionnel à la "taille" de l'inoculum ; LYCKE et LUND ont montré une bonne corrélation linéaire entre la concentration de parasites dans la suspension, et le nombre de parasites infectants, particulièrement entre 700.000 et 1.300.000 parasites par culture.

MATSUOKA et al 1969 inoculent des cultures de cellules de trachée d'embryon de Bovin (EBTr) avec 50.000 à 1 million de sporozoïtes d'*Eimeria tenella*. Ils rapportent que l'inoculation de 1 million de sporozoïtes provoque la destruction d'une partie ^{des} cellules dans la culture, alors qu'avec 50.000 parasites l'infection n'est que légèrement apparente, le meilleur résultat étant obtenu avec 200.000 sporozoïtes. Ces travaux donnent une idée sur l'intensité de l'infection en fonction du nombre de zoïtes, mais ne précisent pas le nombre de cellules infectées.

STROUT et al (1969 b) inoculent des cultures primaires de cellules de rein d'embryon de poulet avec des concentrations de sporozoïtes d'*Eimeria tenella* comprises entre 10.000 et 1 million et comparent l'infection et le développement 96 heures après mais ne définissent pas la relation entre la "dose" et le nombre de parasites entrant dans les cellules.

DORAN (1971) inocule des cultures primaires de cellules de rein de poulet partiellement confluentes avec des nombres d'*Eimeria tenella* allant de 25.000 à 1 million. Il remarque que le nombre de sporozoïtes intracellulaires après 4 heures d'incubation est étroitement proportionnel à la taille de l'inoculum jusqu'à 500000, mais plafonne ensuite pour 750000 et 1 million de sporozoïtes.

Nos résultats montrent que le pourcentage de cellules parasitées est lié au nombre de parasites dans l'inoculum ; cependant les chiffres obtenus diffèrent d'une expérience à l'autre; par exemple nous avons eu à peu près 12% des cellules qui sont parasitées avec 250000 bradyzoïtes dans la première expérience, contre environ 3% lors de la deuxième expérience. Ceci peut être dû à plusieurs facteurs. Parmi ceux-ci le plus vraisemblable est qu'il est possible que dans deux inoculums contenant le même nombre de parasites, mais provenant d'animaux différents, il n'y ait pas le même pourcentage de bradyzoïtes viables ou capables de se développer. L'âge des kystes "donneurs" de bradyzoïtes peut ainsi être pris en considération : en effet avec le temps les kystes finissent par dégénérer plus ou moins et deviennent vraisemblablement moins riches en bradyzoïtes viables. Ainsi les kystes utilisés dans la deuxième expérience étaient-ils plus "vieux" que ceux de la première.

DORAN et VETTERLING (1969) examinant des sporozoïtes d'*Eimeria meleagridis* de différents âges, montrent que les "vieux" parasites ont une pénétration et un développement faibles.

Avec des inoculats de plus de $8 \bar{M}$ de parasites

nous avons obtenu des NRUI dépassant les 100% : ceci vient du fait qu'à partir d'une certaine concentration de parasites le nombre d'infections multiples (plusieurs pénétrations dans la même cellule) augmente. Ceci se traduit sur la courbe reliant le $\log S^2$ au $\log \bar{X}$ par la tendance des parasites à une superdispersion vers les fortes concentrations en parasites de l'inoculum.

DORAN (1973, 1982) rapporte que la taille de l'inoculum influence le nombre de parasites entrant dans les cellules, ainsi que la vitesse avec laquelle sont détruits les tapis cellulaires.

Nous avons remarqué que le nombre d'infections multiples augmente avec la concentration des parasites inoculés, ainsi que la "virulence" du parasite. Nous avons observé qu'en boîte de Petri (30mm), des cellules Hela inoculées avec 60 millions de bradyzoïtes de *Besnoitia* ne sont pas parasitées à 100%, se détachent rapidement de leur substrat au bout de quelques heures.

Cette expérience nous suggère 2 conclusions :

- Si on veut faire une expérience de cinétique cellulaire qui demande une maintenance des cultures plus d'une semaine, il faut utiliser un très faible nombre de parasites (pas plus de 2 millions), si l'expérience exige moins d'une semaine 4 millions de bradyzoïtes par boîte de culture de 25 cm² sont suffisants pour donner une infection facilement repérable, ne dépassant pas les 50%, seuil d'équilibre entre destruction et croissance cellulaire, notion importante soulignée par LUND et al (1963 a).

L'utilisation d'un grand inoculum de *Besnoitia* (8 millions de parasites ou plus) donnerait des cellules avec plus qu'un parasite ce qui a été vu chez *Toxoplasma* aussi par KAUFMAN et MALONEY (1962) ; ce qui montre que lors des études portant sur la cinétique de multiplication de ces parasites, et probablement d'autres organismes intracellulaires, on doit tenir compte de la possibilité d'une invasion initiale par plus qu'un parasite, ce qui peut compliquer les comptages.

II - INFECTIONS MULTIPLES

Bien qu'il ait été depuis longtemps rapporté que plusieurs *Besnoitia jellisoni* peuvent envahir la même cellule en culture *in vitro* ; (4 organismes pour une cellule de la trachée d'embryon de Bovin (EBTr) FAYER et al (1969), plusieurs parasites dans une même cellule de rein de chien (MDCK) SENAUD et MEHLHORN (1978), aucune étude n'a été faite sur la relation entre le nombre de *Besnoitia jellisoni* et la pénétration simple ou multiple.

Nous avons obtenu dans l'expérience reliant la taille de l'inoculum au pourcentage de pénétration des NRUI de plus de 100%, ce qui témoigne indiscutablement de l'existence d'infections multiples.

Si les infections sont indépendantes les unes des autres (c'est à dire si une infection réalisée ne modifie pas les probabilités des infections suivantes), il faut s'attendre à ce que les nombres de parasites par cellule

obéissent à la loi de Poisson. Pour le vérifier nous avons repris les données détaillées sur la distribution des parasites intracellulaires de 3 lots de cultures de cellules Hela de l'expérience précédente (dose - réponse), chaque lot est composé de 2 boîtes de cultures infestées respectivement avec 8, 16 et 32 millions de bradyzoïtes.

Pour chacun de 15 rectangles observés dans une boîte nous avons noté le nombre de cellules contenant $k = 0, 1, 2, \dots, 10$ parasites. Pour tester la loi de Poisson, nous avons calculé la moyenne \bar{X} et la variance estimée S^2 du nombre de parasites par cellule pour chaque concentration d'inoculat. Le rapport S^2/\bar{X} trouvé ("coefficient de surdispersion") est toujours légèrement plus grand que 1.

Il est possible de tester ce coefficient grâce au test de FISHER (1954). Cet auteur a en effet montré que si \bar{X} et S^2 sont calculés à partir de N observations, la quantité $(N - 1) \frac{S^2}{\bar{X}}$ est un χ^2 à $(N - 1)$ degrés de liberté (DL). D'autre part pour les très grands DL (ici > 300), $\sqrt{2 \chi^2}$ n'est pas différente d'une variable normale de moyenne $\sqrt{2N-1}$ et de variance 1, ce qui autorise de calculer la quantité $|\sqrt{2 \chi^2} - \sqrt{2N-1}|$ et à la comparer à son écart type 1 ; la différence est significative à 5% si elle est $> 1,96$, à 1% si elle est $> 2,61$ et 0,1% si elle est $> 3,29$.

Nous avons trouvé dans tous les cas la différence

$$|\sqrt{2 \chi^2}_{\text{observé}} - \sqrt{2N-1}| > 3,29$$

Ce qui permet de rejeter la loi de Poisson au seuil 0,1%.

(tableau V ci dessous :)

Concentrations inoculées	N	\bar{X}	S^2	S^2/\bar{X}	Test de FISHER $ \sqrt{2 \chi^2} - \sqrt{2N-1} $	Seuil de signification
8	440	0,83	1,09	1,31	4,27	0,1%
8	425	0,70	0,87	1,24	3,29	(0,1%)
16	333	3,35	5,77	1,72	8,01	0,1%
16	617	1,30	2,28	1,75	11,32	0,1%
32	485	2,42	3,91	1,62	8,47	0,1%
32	532	1,57	3,41	2,17	15,40	0,1%

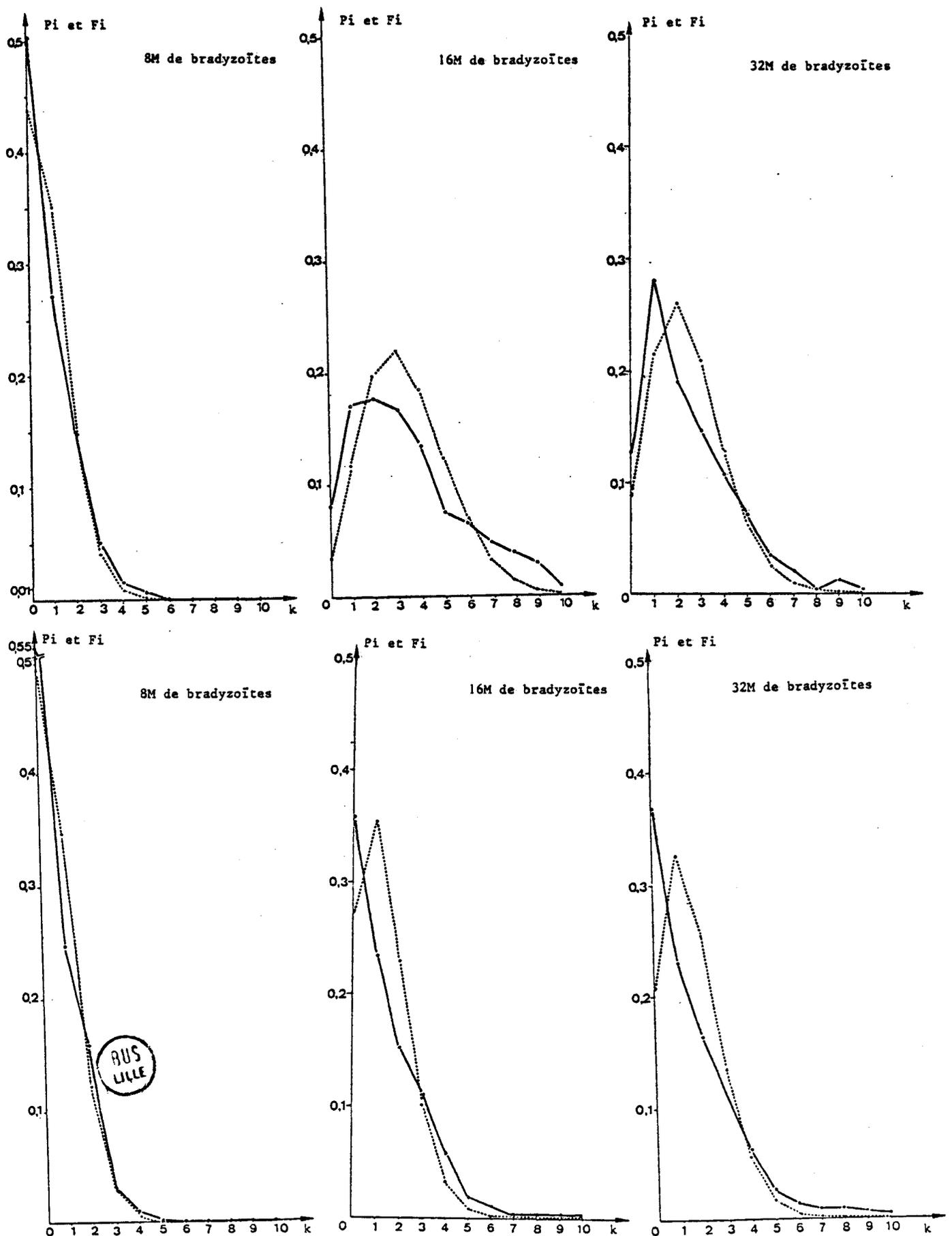


Figure 30: Courbes représentant les distributions de fréquences observées (Fi: trait plein) et théoriques selon la loi de POISSON (Pi: pointillés), du nombre de parasites solitaires par cellule pour différentes concentrations de parasites inoculés (8, 16, 32 millions). (Chaque concentration était testée 2 fois).

Pour préciser la comparaison, nous avons ensuite calculé les fréquences théoriques $Pr(k)$ à partir de l'hypothèse d'une loi de Poisson de moyenne théorique égale à la moyenne observée \bar{X} , selon la formule :

$$Pr(k) = e^{-\bar{X}} \frac{\bar{X}^k}{k!}$$

et les avons comparées aux fréquences observées. La différence entre distribution théorique et distribution observée est testée, dans chaque cas, par un χ^2 et est de plus, représentée par un double histogramme (Figure 30).

La différence entre la distribution de Poisson théorique et la distribution observée apparaît toujours très hautement significative (tableau VI, ci dessous)

Concentrations inoculées	χ^2 calculé	Nombre de DL	Seuil du χ^2 pour 1°/°°	Niveau de signification
8	20,65	3	16,266	< 1°/°°
8	19,40	3	16,266	< 1°/°°
16	97,45	8	26,125	≪ 1°/°°
16	100,43	5	20,515	≪ 1°/°°
32	74,52	7	24,322	≪ 1°/°°
32	151,04	6	22,457	≪ 1°/°°

Dans les 6 cas, les courbes comprennent trois parties : une partie centrale où les fréquences observées sont inférieures aux fréquences théoriques, et deux parties extrêmes (les plus petites et les plus grandes valeurs du nombre de parasites par cellule) où les fréquences observées sont supérieures aux théoriques. Cela peut s'interpréter en disant que les cellules déjà parasitées ont plus de chances d'être atteintes par un autre parasite. En effet dans ces conditions, les cellules contenant plusieurs parasites seront plus nombreuses que si les infestations se réalisaient "au hasard"

(infestations successives totalement indépendantes) et en compensation il existe un nombre de cellules indemnes plus grand que "par hasard" ; enfin, le nombre de cellules contenant un nombre "moyen" de parasites sera par conséquent plus faible que prévu.

Discussion - conclusion

LYCKE et LUND (1964 a) ont rapporté que toutes les cellules Hela qu'ils avaient utilisé, étaient également sensibles à la parasitémie avec *Toxoplasma gondii*, donc que les infections multiples qu'ils avaient noté étaient dues au hasard.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons montré qu'avec les grands nombres de parasites ($> 8\bar{M}$) toutes les cellules n'ont pas la même chance d'être infectées, certaines ont reçu plusieurs parasites alors que d'autres ont peu ou pas de zoïtes.

On peut émettre l'hypothèse que les zoïtes s'agglomèrent dans un inoculum dense, ce que l'on peut d'ailleurs constater au microscope, et de ce fait ne se répartissent pas régulièrement sur le tapis cellulaire.

On peut aussi supposer que certaines cellules sont plus réceptives que d'autres, par exemple dans certaines phases de leur cycle. Il se peut également qu'une cellule qui vient d'être envahie par un parasite soit, pour des raisons qui restent à définir, plus accueillante pour un autre zoïte infectieux qu'une cellule saine.

Ces résultats ouvrent donc le champ à de nouvelles possibilités expérimentales.

Nombre de cellules HeLa en millions/boîte	Durée de l'expérience (en heures)	Nombre total de cellules comptées	Nombre total de parasites intracellulaires	Nombre de cellules parasitées	NRUI	Pourcentage de cellules parasitées
0,20	1	600	32	43	7,17	5,33
	1	600	43	44	7,33	7,17
	6	600	167	198	33,00	33,00
0,40	1	600	57	60	10,00	9,50
	1	600	68	72	12,00	11,33
	6	600	180	215	35,83	30
0,80	1	600	67	69	11,50	11,17
	1	600	68	69	11,50	11,33
	6	600	214	317	52,83	35,67
1,00	1	600	67	68	11,33	11,17
	1	600	70	72	12	11,67
	6	600	232	334	55,67	38,67
2,00	1	600	72	74	12,33	12
	1	600	77	83	13,83	12,83
	6	600	235	332	55,33	39,17



Tableau VI : relation entre le nombre de cellules en culture et le taux de pénétration des parasites (explication dans le texte).

III - ACTION DU NOMBRE DE CELLULES EN CULTURE SUR LE TAUX DE PENETRATION DES PARASITES

Le parasite dans un système de culture *in vitro* est soumis à l'action d'un certain nombre de facteurs externes environnants qui agissent sur sa motilité, sa pénétration, son développement. Plusieurs de ces facteurs ont été étudiés (DORAN 1982). Mais ce qui semble avoir été négligé à notre connaissance, c'est l'influence éventuelle du nombre de cellules offertes aux parasites sur leur pénétration.

1 - Résultats.

5 lots constitué chacun de 3 boîtes FALCON 25 cm² ont été respectivement ensemencés avec 0,2; 0,4; 0,8; 1 et 2 millions de cellules Hela. Après 4 heures d'incubation à 37°C, nous avons inoculé chaque boîte avec 1ml de MEM 2% de sérum de veau contenant 4 millions de bradyzoïtes. Après une réincubation de 1 ou de 6 heures, nous avons lavé, coloré et inclus nos boîtes dans l'alcool polyvinylique (comme décrit page 13).

Pour la comparaison statistique des proportions de cellules parasitées, il faut que les unités d'échantillonnage soient les mêmes c'est à dire, que les pourcentages soient calculés sur un nombre de cellules constant : ici 600, au lieu de les calculer sur une surface de culture constante, où leur nombre est variable dans le cas de tapis non confluent, ce qui fausse les résultats de comparaison entre faibles et fortes concentrations de cellules. L'examen des cultures, montre que le nombre de cellules par champ de microscope est faible avec 200000 cellules ; la répartition de celles-ci devient homogène à partir de 400.000 cellules).

Les résultats des dénombrements sont reportés sur le tableau VI: Le nombre de cellules parasitées et le NRUI augmentent quand la concentration d'origine des cellules varie de 200000 à 400000 pour une incubation de 1 heure, au delà ces 2 indices restent stables. Le lavage des cultures après 6 heures d'inoculation au lieu de 1 heure, montre une augmentation du nombre de cellules

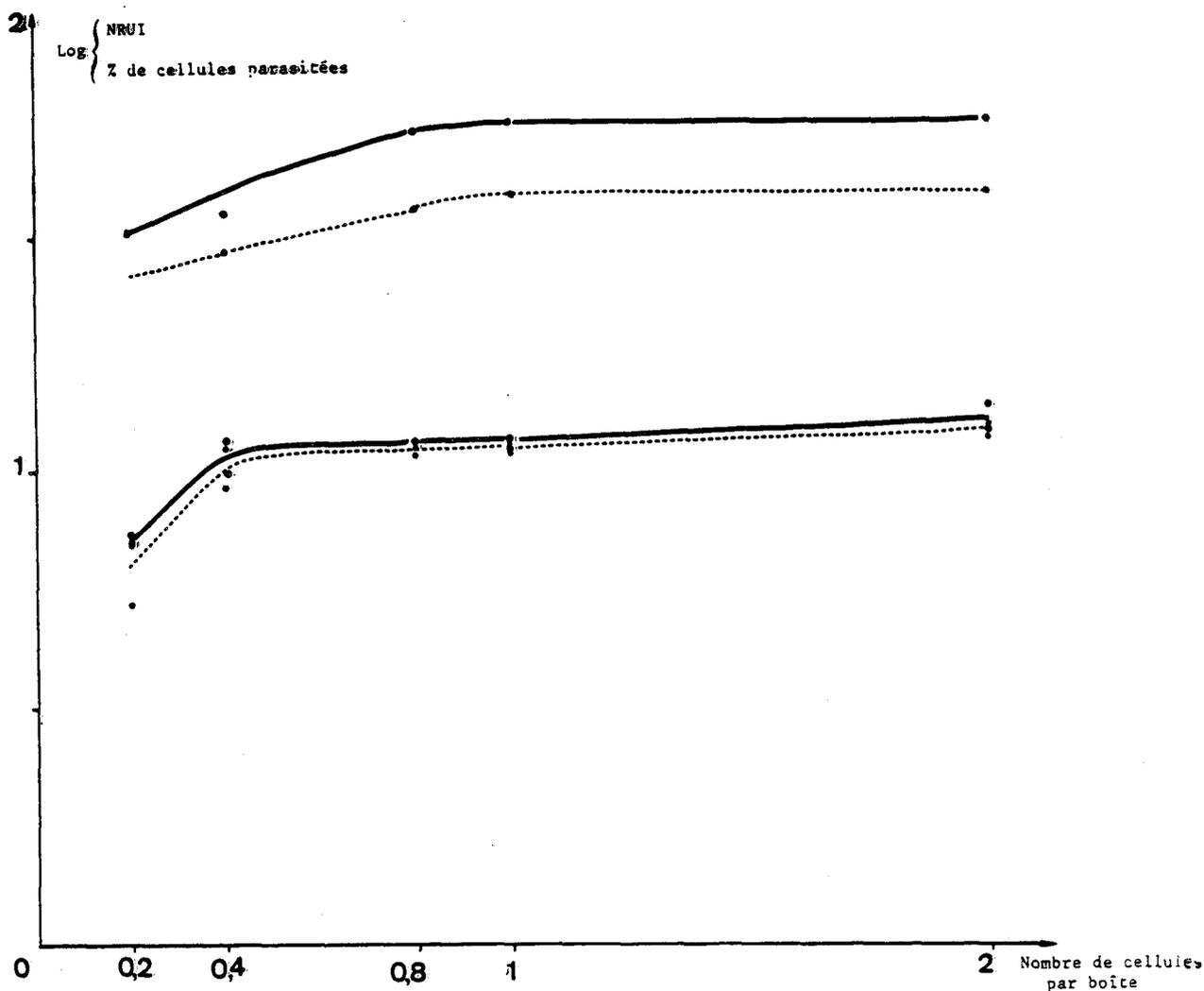


Figure 31: Elle met en relation le log du NRUI et le pourcentage de cellules parasitées avec le nombre des cellules Helaensemencées, par boîte Nunclon 25 cm².

Les 2 courbes du haut représentent le résultat des comptages faits sur des cultures fixées 6 heures après l'inoculation du parasite.

Les 2 courbes du bas représentent le résultat des comptages sur des cultures fixées 1 heure après l'inoculation.

— : NRUI

- - - : pourcentage de cellules parasitées.



parasitées et du NRUI, le premier indice reste stable avec la variation du nombre de cellules dans les boîtes, alors que le deuxième ne se stabilise qu'à partir de 800000 cellules.

La fig 31 (Log du NRUI et du pourcentage de cellules parasitées par rapport au nombre de cellules en culture) montre une ascension des courbes jusqu'à 400000 cellules, au delà, elles accusent presque un plateau.

2 - Discussion

Cette étude montre que le pourcentage de cellules parasitées est presque stable au delà d'une concentration de 400000 cellules, cela apparait sur les courbes qui accusent presque un plateau; le NRUI suit la même variation. Cependant le temps d'incubation a agi sur ces 2 indices, avec un lavage après 6 heures d'inoculation au lieu d'une heure on obtient un NRUI et un pourcentage de cellules parasitées plus important mais stable aussi avec la variation de la concentration des cellules.

A notre connaissance l'influence du nombre de cellules sur l'invasion n'a pas été étudiée, les chercheurs ont rapporté l'effet du nombre de cellules sur le développement de parasites comme *Eimeria* et *Toxoplasma* (DORAN 1982) ou la résistance du tapis cellulaire. C'est ainsi qu'il faut une semaine pour que la moitié d'une culture de cellules Hela faite à partir de 25000 à 50000 cellules éclate ; alors qu'à une concentration de 5000, la lyse des cellules Hela infestées par *Toxoplasma gondii* se produit en 24 heures (LUND et al 1963 a). SHIMIZU (1961 a), LUND et al (1963 a) ont indiqué que les variations du nombre de cellules et l'âge des cultures peuvent influencer le taux de croissance et le rendement en parasites.

LYCKE et LUND (1964 a) ont trouvé une moyenne de 40% de *Toxoplasma gondii* inoculés qui sont infectants pour les cellules Hela de leurs cultures.

Nous suggérons comme ces auteurs que dans nos inoculums de départ il y a le même pourcentage de bradyzoïtes infectants, fixe. Cela nous permet d'émettre l'hypothèse suivante :

Le faible résultat de pénétration obtenu avec une culture de 200000 ou 400000 cellules pourrait être dû à la séparation des cellules les unes des autres par une assez grande distance, ce qui ôte aux parasites infectants des possibilités de rencontre avec une cellule, alors qu'avec des concentrations au delà de 400000 cellules l'espace intercellulaire est assez réduit pour permettre à ces parasites d'atteindre leur cible et on retrouve presque tous les parasites qui ont une capacité infectieuse dans un hôte. Mais cela suppose aussi qu'au départ, dans toutes les boîtes on a le même nombre de cellules dans une phase de leur cycle convenable pour l'infestation.

On peut donc conclure que le pourcentage de cellules parasitées varie avec le temps de contact parasites-cellules, mais ne varie pas avec le nombre de cellules exposées à l'infestation sauf pour les faibles concentrations.

ETUDE CINEMATOGRAPHIQUE

ETUDE CINEMATOGRAPHIQUE DU DEVELOPPEMENT DE
BESNOITIA JELLISONI EN CULTURE DE CELLULES

Nous avons étudié le développement de *Besnoitia jellisoni* en culture de cellules; les observations et les comptages ont été faits sur des cultures non synchrones de *Besnoitia* en cellules Hela. Il était donc nécessaire de rechercher des données précises sur les durées du cycle des cellules et des parasites. Pour ce faire nous avons employé la technique de cinématographie "time-lapse" pour préciser certains des résultats obtenus précédemment et apporter dans la mesure du possible de nouvelles données par l'observation sur le vivant.

1 - Résultats : observation de films pris à 1 vue/30 secondes.

Les bradyzoïtes ajoutés à une boîte de culture de cellules Hela comme il a été décrit précédemment, (page 12) pénètrent dans les cellules après leur sédimentation à 37°C. La plupart des parasites se placent contre le noyau, ils gardent leur forme en banane (stade A). Ces parasites effectuent des mouvements en avant et en arrière sur une très faible distance avant de se stabiliser.

Quelques heures après la pénétration, le parasite change de forme, il devient plus large, ovale et peut atteindre 3 fois la taille initiale, mais sa longueur ne change presque pas (stade B).

Avant la division, le zoïte s'arrondit (stade C) et rentre dans une phase d'agitation qui dure assez longtemps ; après quoi on observe souvent deux zoïtes fils se dégager l'un après l'autre de la masse arrondie ; ils finissent par former une paire d'organismes sous forme d'un "V", reliés par un corps résiduel (stade D). Le parasite met à peu près 5 heures 30 , pour passer du stade B au stade D, où 2 nouveaux zoïtes sont formés.

La première division n'a été observée que 24 heures après l'inoculation, elle est presque synchrone dans une même culture. Les divisions suivantes se sont faites au rythme d'une division par 24 heures pour ceux

qui ont continué leur cycle. Ces divisions répétées de parasites s'effectuent de la même façon que celle décrite précédemment. Comme les parasites augmentent en nombre, l'espace qu'ils occupent dans la cellule augmente de taille et peut occuper occasionnellement la totalité du cytoplasme ; parfois ils semblent "disloquer" le noyau. Les parasites frères dans un même clone paraissent se diviser d'une façon à peu près synchrone, mais parfois il faut un intervalle de quelques minutes avant que tous les parasites de la même génération soient divisés.

Certaines cellules ont été envahies par plusieurs organismes. Chaque élément peut donner naissance à un clone qui est contenu dans une vacuole. Les parasites y sont le plus souvent groupés sans ordre, ou bien sous forme de "rosettes". Parfois 2 clones ou plus dans une cellule se rapprochent si étroitement qu'on ne peut plus faire de différence entre les éléments de l'un ou l'autre.

Après un certain nombre de divisions du parasite, un seuil critique est atteint, la rupture de la cellule se produit. Ce phénomène est observé habituellement 3 à 4 jours après l'inoculation, il n'est pas dépendant d'un nombre fixe de parasites, mais plutôt de la résistance de la cellule et probablement de la localisation des clones dans le cytoplasme et de leur nombre. L'éclatement de cellules contenant de petits clones a été observé surtout chez les cellules qui avaient subi une pénétration initiale de plusieurs parasites. Les parasites libérés sont actifs: en quelques secondes les cellules avoisinantes sont envahies, mais quelques parasites restent attachés à la surface et aux débris cellulaires, parfois groupés en masse.

La vague d'éclatement des cellules n'est évidente que le troisième jour après l'inoculation. Les noyaux des cellules éclatées paraissent conserver leur intégrité, au moins leur volume.

La mitose des cellules infestées est observée. Quand la cellule contient un seul clone, une des cellules filles se trouve saine, alors que l'autre contient le clone. Cependant, occasionnellement, après la division du noyau, la division du cytoplasme est interrompue, le clivage n'est pas complété dans cette partie qui contient un large clone. Dans le cas où la

cellule mère contient 2 ou plusieurs clones, les 2 cellules filles sont souvent infestées toutes les 2.

2 - Discussion

Besnoitia jellisoni a été cultivé sur différents types de cellules ; le temps requis pour la pénétration du parasite semble être sous l'influence du nombre de germes inoculés en état d'évoluer ultérieurement, du type de cellules utilisées en culture (AKINCHINA et DOBY 1969 b) et de l'origine des parasites (Tachyzoïtes ou bradyzoïtes).

Après l'installation du parasite dans la cellule, celui-ci semble bouger en avant et en arrière pendant un certain temps avant de se stabiliser et généralement on le voit atteindre une position juxtanucléaire; cette localisation a été rapportée auparavant par AKINCHINA et DOBY (1969 a, b); AKINCHINA et ZASUKHIN (1971), HENDRICKS et FAYER (1973) pour *Besnoitia jellisoni*, et DORAN (1982) pour les sporozoïtes d'*Eimeria* et les zoïtes de *Besnoitia*, *Sarcocystis* et *Toxoplasma*.

La motilité intracellulaire a été perçue chez *Sarcocystis* par FAYER (1970).

Cette position juxtanucléaire pourrait laisser supposer que le parasite trouve dans le voisinage du noyau certaines substances nécessaires à son développement. Cependant JONES (1973), SETHI et al (1973) ont obtenu le développement de *Toxoplasma gondii* sur des cellules énucléées, ceci les a conduits à conclure qu'il n'y a aucune participation de l'appareil nucléaire hôte durant la multiplication intracytoplasmique du parasite. Par ailleurs JONES (1973) suggère que la concentration des parasites près des noyaux des cellules en culture est peut être due au fait que le volume cytoplasmique dans cette région est beaucoup plus grand qu'ailleurs.

Avant de se diviser, *Besnoitia* augmente de taille et devient presque arrondie. DOBY et AKINCHINA (1968) observent une forme ovale. SENAUD et

une

MEHLHORN (1978) forme arrondie qui devient globuleuse.

Toxoplasma devient ovale (SHEFFIELD et MELTON 1968), arrondi (SCHMIDT-HOENSDORF et HOLZ (1953), cités par DORAN (1973)).

D'après nos comptages et nos observations sur le vivant, nous pouvons dire que les premières divisions des bradyzoïtes de *Besnoitia* dans les cellules Hela s'effectuent entre 20 et 24 heures après l'inoculation, contre 3 à 5 heures après celle-ci (DOBY et AKINCHINA 1968) pour les tachyzoïtes de l'exudat péritonéal de souris inoculés à des fibroblastes d'embryons de poulets. Sur des cellules de rein de chien, les premiers stades de multiplication des zoïtes d'origine kystique de *Besnoitia* apparaissent 2 jours après l'inoculation (SENAUD et MEHLHORN 1978).

Les tachyzoïtes de la souche RH de *Toxoplasma* se multiplient 2 à 5 heures après leur pénétration (LUND et al 1961), en 3 heures pour la souche BEVERLEY (KUSUNOKI 1977).

Par coloration au protéinate d'argent et observation au microscope photonique GOLDMAN et al (1957) avaient rapporté les premiers la division par endodyogénie chez *Toxoplasma gondii* et *Besnoitia jellisoni*. Ce mode de division a été décrit chez ce dernier parasite par SENAUD et MEHLHORN (1978) en microscopie électronique.

L'endodyogénie est le mécanisme général de multiplication asexuée rapporté chez *Besnoitia jellisoni*. Selon certains auteurs il pourrait se produire une fission binaire (SHEFFIELD 1966), un autre mode de multiplication AKINCHINA et DOBY (1969 a), une endopolygénie (AKINCHINA et DOBY, 1969 b), une fission binaire et une schizogonie FAYER et al (1969), une fission binaire et des divisions multiples, SENAUD (1969 b), fission binaire SENAUD (1969 a) dans les kystes, occasionnellement ^{une} endopolygénie (SENAUD et al 1974).

Nous avons vu sur des coupes fines en microscopie électronique (non publié) de cellules Hela infestées par *Besnoitia jellisoni* un mécanisme de multiplication par endogénèse, nos observations et descriptions sur le vivant rappellent l'endodyogénie décrite chez *Toxoplasma* par BOMMER (1969) et BOMMER et al (1969) à savoir que les 2 zoïtes fils sortent activement de

la membrane de la cellule mère en même temps ou par une succession rapide, la nouvelle paire de zoïtes formée reste attachée par un reste de membrane formant une figure sous forme d'un "papillon" en V.

VIVIER en 1970 rapporte l'endodyogenèse et l'endopolygenèse chez *Toxoplasma* et propose le terme endogenèse qui suggère l'élaboration interne des individus fils et ne préjuge pas de leur nombre.

L'endodyogénie est le seul type de division chez *Hammondia hammondi* (SHEFFIELD et al 1976).

Les descendants immédiats d'un zoïte constituant une génération ; le temps de génération est l'intervalle séparant 2 générations. Le taux de multiplication chez *Besnoitia*, *Hammondia* et *Toxoplasma* est souvent exprimé en temps de génération (DORAN 1982).

Le temps de génération de *Besnoitia jellisoni* dans les fibroblastes primaires de Hamster est de 6,3 heures, alors que dans les macrophages de souris non immunisées et immunisées contre *Besnoitia* et contre *Toxoplasma*, le temps de génération est de 12,8; 38,5 et 12,8 heures, respectivement. (HOFF et FRENKEL, 1974, cités par DORAN 1982).

Nous avons trouvé un temps de génération de *Besnoitia* en culture sur des cellules Hela dans cette expérience de 24 heures et en général de 22 heures.

Chez *Toxoplasma* le temps de génération semble être plus court pour les espèces virulentes ; dans une même espèce les tachyzoïtes se multiplient plus vite que le bradyzoïte et le sporozoïte ; le temps de génération des tachyzoïtes dépend du type de cellule qui lui est proposé et de leur "passé immunologique" (voir DORAN 1982).

Le temps de génération de *Hammondia hammondi* est de 24 heures (SHEFFIELD et al 1976).

La présence d'une vacuole parasitophore entourant les parasites de

Besnoitia est rapportée par plusieurs chercheurs en microscopie photonique par exemple par DOBY et AKINCHINA (1968), FAYER et al (1969) et en microscopie électronique par exemple par SENAUD et MEHLHORN (1978).

En microscopie photonique la fig. 18 montre cette vacuole dans les cellules Hèla.

Nous avons observé quelques rosettes de *Besnoitia* souvent formées par 4 organismes provenant de 2 divisions du parasite et souvent des parasites sans arrangement. Cette forme en rosette a été décrite par DOBY et AKINCHINA 1968, FAYER et al (1969), ces derniers ont aussi décrit des formes en régime de bananes ou sans organisation évidente.

FAYER et al (1969) ont rapporté que ces structures organisées étaient formées d'organismes reliés par un corps résiduel; les rosettes étaient formées de 3 à 8 organismes 2 jours après l'inoculation. Ces chercheurs ont observé des cellules avec un grand nombre de parasites.

Des structures en rosettes sont rapportés chez *Hammondia hammondi* avec 8 parasites 4 jours après l'inoculation, et chez *Toxoplasma* par plusieurs chercheurs avec parfois 32 organismes (voir DORAN 1982). LUND et al (1961) ont rapporté qu'une cellule peut comporter jusqu'à 200 *Toxoplasma*.

La rupture des cellules nous paraît étroitement liée à la multiplication des parasites intracellulaires, notre impression est que la rupture de la membrane cellulaire a surtout lieu quand sa capacité élastique est dépassée : ceci peut se voir par le rejet des parasites avec force et parfois loin de la cellule.

Ce lien entre la capacité élastique de la cellule et son éclatement a été évoqué par LUND et al (1961) en utilisant la méthode de cinématographie time-lapse pour suivre le développement de *Toxoplasma* sur des cellules Hèla.

Nous avons noté une vague d'éclatements entre le troisième et quatrième jour après l'inoculation. 30 à 40 heures après celle-ci DOBY et

AKINCHINA(1968) commencent à trouver des *Besnoitia* dans le milieu nutritif. FAYER et al(1969) notent un maximum d'organismes intracellulaires 3 et 4 jours après l'inoculation et un grand nombre d'organismes extracellulaires 5 et 6 jours après celle-ci.

Les organismes sont fréquemment observés quittant les cellules après une certaine période de multiplication (FAYER et al 1969) ; aucune description d'éclatement de cellule par *Besnoitia* n'a été rapportée.

Cependant nous n'excluons pas la sortie de parasites de leur cellule-hôte sans éclatement, simplement par dégénérescence des cellules dans des conditions de vie défavorables.

Les deux modes de sortie : actif et passif, ont été décrits par plusieurs chercheurs chez *Toxoplasma* (voir DORAN 1982).

Les parasites libérés doivent pouvoir trouver immédiatement des cellules-hôtes saines, sinon leur pouvoir de pénétration diminue très vite dans le milieu de culture (DOBY et AKINCHINA 1968), nous avons remarqué que les parasites rentrent vite dans les cellules environnantes, ceux qui restent à l'extérieur voient leur motilité diminuée.

En cinématographie nous n'avons pas observé de noyaux géants des cellules-hôtes, comme ceux observés par AKINCHINA et DOBY (1969 a,b) et dans la paroi des kystes (SHEFFIELD 1968; SENAUD 1969 a,b; SADAK 1981) cela peut témoigner de la résistance des cellules Hela à l'infection.

Le résultat de l'infection par *Besnoitia* comme par *Toxoplasma* est une perte de la plupart des cellules de la monocouche (FAYER et al 1969).

Dans cette étude nous avons vu que les cellules peuvent continuer à se diviser tant que le clone ne gêne pas ce phénomène et qu'une cellule parasitée peut donner naissance à des cellules apparemment saines, dont il conviendrait cependant d'étudier les modifications éventuelles du métabolisme, étant donné que tous leurs organites ont été au contact et sous l'influence du parasite pendant 1 cycle.

ETUDE MICROKINEMATOGRAFIQUE DE L'INFLUENCE
DE L'INOCULATION DE *BESNOITIA JELLISONI* SUR LA DUREE
DU CYCLE ET DE LA MITOSE DES CELLULES HELA

Le cycle cellulaire a été étudié par de nombreuses méthodes décrites dans des ouvrages comme celui de BASERGA (1976). Cependant, ces méthodes ne permettent pas, comme la microcinématographie, une étude directe du cycle et de la mitose (voir revue générale par COLLYN-d'HOOGHE 1980).

Cette technique a été déjà utilisée pour étudier la motilité et le développement sur le vivant sur plusieurs Coccidies (DORAN 1973, 1982) ; nous l'avons employée dans le cadre des relations hôte-parasite pour déterminer l'action de *Besnoitia jellisoni* sur la durée du cycle et de la mitose des cellules Hela en fonction des générations. Nous avons en outre étudié l'influence de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'infestation.

I - METHODES PARTICULIERES A LA MICROKINEMATOGRAFIE.

A - Généralités

Pour les études microcinématographiques, 150000 cellules Hela ont été inoculées dans des boîtes NUNCLON 25 cm² puis placées sur la platine du microscope.

Nous avons choisi d'observer les cellules pendant 2 jours avant de les inoculer ; ceci nous permet de contrôler le bon déroulement de la croissance des cellules. L'addition d'1 ml de milieu contenant des parasites-ou sans parasites pour les cultures témoins- a lieu 48 heures après l'ensemencement, soit généralement durant la troisième génération après le repiquage ; Cette génération est dénommée "génération traitée" ; la génération qui la précède est appelée "génération pré-traitée", la génération suivante est appelée "génération post-traitée" (voir schéma d'un pedigree (fig. 7). Rappelons

que nous avons suivi la prodédure de manipulation décrite par COLLYN-d'HOOGHE (1980).

B - Retard à la mitose et allongement de la mitose : définition :

Le retard à la mitose et l'allongement de la mitose sont calculés selon la méthode utilisée par COLLYN-d'HOOGHE (1980).

Le retard à la mitose des cellules d'une population inoculée par des parasites est défini comme la différence entre la durée moyenne du cycle des cellules de cette population et le cycle moyen des cellules témoins.

L'allongement de la mitose est défini et obtenu de la même façon.

C - Méthode dévaluation de l'influence de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'inoculation de parasites.

Dans le but d'étudier les variations des effets de l'inoculation des parasites en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment de l'inoculation, les cellules ont été divisées en 5 groupes en fonction du délai entre la fin de la mitose précédente et le moment du "traitement".

0 à 4 heures

4 à 8 heures

8 à 12 heures

12 à 16 heures

et plus de 16 heures.

D - Notion de probabilité de division.

La technique de cinématographie a rendu possible l'observation de l'évolution des cellules dans une culture. Certaines anomalies concernent des cellules mortes ou incapables de se diviser ; cette incapacité se traduit par différents aspects : pycnose, éclatement cellulaire, cellules qui n'entrent pas en division durant la période d'observation, fusions cellulaires.

	Témoïn	Traité	Post-traité	2 ^e post-traité	3 ^e post-traité
. Durée du cycle-moyenne \bar{X} (h) + intervalle d'estimation (ou de sécurité)	26,03±1,53	29,63±2,26	28,95±1,91	29,56±0,77	NS 28,01±1,42
. S : Ecart type estimé	4,13	9,60	10,09	4,49	3,62
. Nombre de valeurs	29	72	112	135	26
. Retard (h)	—	3,60±2,73	2,92±2,45	3,53±1,71	1,98±2,09
. CV =coefficient de variation	0,16	0,32	0,35	0,15	0,13
. Durée du cycle-moyenne \bar{X} (h) + intervalle d'estimation	Parasitées	X 33,20±6,17	NS 21,98±6,13	NS 26,84±4,17	NS 26,93
	Autres	28,26±1,97	***29,92±1,91	***29,70±0,77	NS 28,05±1,47
. S = écart type estimé	Parasitées	13,80	11,88	5,52	—
	Autres	7,11	9,39	4,40	3,69
. Nombre de valeurs	Parasitées	20	15	7	1
	Autres	52	97	128	25
. Retard (h)	Parasitées	7,17±6,36	(-) 4,05±6,32	0,81±4,44	0,9±1,53
	Autres	2,23±2,49	4,89±2,45	3,67±1,71	2,02± 2,12

Tableau VII . Effet de l'inoculation de *Besnoitia jellisoni* à des cultures
Hela sur la durée de leur cycle.

X Significatif à 5%
. Significatif à 2%
.. Significatif à 1%
... Significatif à 1°/1%
NS = non significatif



Nous avons calculé la probabilité de division selon la définition de WHITMORE et TILL (1964, 1967) qui la considèrent comme le pourcentage de cellules capables, pour une génération donnée, de donner naissance à deux cellules filles.

II - RESULTATS

A - Effet de l'inoculation de *Besnoitia jellisoni* sur la durée du cycle et de la mitose des cellules Hela

En raison des problèmes de disponibilité des appareils de microcinématographie, nous n'avons pas eu la possibilité de réaliser simultanément une culture témoin et une culture infectée ; nous avons donc pris comme témoins les cellules de la génération prétraitée des cultures infectées, ainsi nous avons comparé les cycles des générations traitées à celui de la génération prétraitée; nous avons fait la même chose pour la mitose.

Afin d'étudier l'influence de l'inoculation des bradyzoïtes de *Besnoitia jellisoni* sur la durée du cycle et de la mitose des cellules Hela, les valeurs individuelles des durées du cycle et de la mitose ont été regroupées à partir de plusieurs expériences et les valeurs moyennes obtenues pour les différentes générations sont notées sur des tableaux.

1 - Effet de l'inoculation sur les différentes générations

a - Effet sur la durée du cycle.

L'inoculation des cellules Hela par des bradyzoïtes de *Besnoitia* a provoqué une augmentation de la durée moyenne du cycle cellulaire.

Le tableau VII résume les paramètres statistiques : la moyenne \bar{X} l'écart type estimé S, le coefficient de variation SV ($SV = \frac{S}{\bar{X}}$)

La différence, comparée par le test t , entre les moyennes des cycles

des différentes générations et la moyenne du cycle témoin s'est révélée significative sauf pour la 3^e génération post-traitée.

La comparaison de ces générations entre elles par ce même test n'a pas révélé de différence significative.

Le retard à la mitose (ou allongement de la durée du cycle) observé au niveau de la génération traitée persiste au niveau des générations post-traitées.

Nous avons séparé pour chaque génération, les cellules en deux groupes : celles "parasitées" et les autres dites "non parasitées" ; la distinction a été faite de la façon suivante :

Après l'éclatement d'une cellule et le rejet de parasite, nous remontons l'arbre généalogique pour retrouver la cellule initiale qui a donc été parasitée "à coup sûr" ; ainsi nous notons toutes celles qui ont abrité des parasites jusqu'à la phase d'éclatement.

Nous considérons comme cellules "non parasitées", toutes celles qui n'ont pas éclaté pendant la durée de l'expérience, ce qui n'exclut pas qu'elles n'aient pas été momentanément au contact d'un parasite, ou que des éclatements nous aient échappé.

La différence entre la moyenne du cycle de la génération témoin et celles des générations des cellules parasitées "à coup sûr" ne se révèle significative qu'au niveau de la génération traitée. L'augmentation de la durée du cycle des cellules "non parasitées" n'est significative qu'au niveau des générations post-traitée et 2^e post-traitée (Tableau VII).

b - Effet sur la durée de la mitose.

La mitose est relativement stable au travers des générations après l'inoculation des bradyzoïtes de *Besnoitia* sauf pour la 2^e génération post-traitée où l'on observe une diminution significative de la durée de la mitose.

	Témoïn	Traité	Post-traité	2 ^e P.T.	3 ^e P.T.
. Durée de la mitose moyenne (h) ± intervalle d'estimation	0,66±0,10	NS 0,58±0,17	NS 0,72±0,17	**0,49±0,07	NS 0,51±0,11
. S	0,28	0,71	0,89	0,33	0,28
. Nombre de valeurs	29	72	107	90	26
. Retard (R)		(-)0,08±0,20	0,06±0,20	(-)0,17±0,12	(-)0,15±0,15
. Durée de la mitose-moyenne (h) ± intervalle d'estimation	<i>Parasitées</i>	NS 0,78±0,57	NS 1,07±0,84	***0,26±0,17	*** 0,22
	<i>Autres</i>	X 0,50±0,07	NS 0,66±0,15	X 0,50±0,07	NS 0,52±0,11
. S	<i>Parasitées</i>	1,29	1,57	0,23	—
	<i>Autres</i>	0,25	0,74	0,33	0,28
. Nombre de valeurs	<i>Parasitées</i>	20	14	7	1
	<i>Autres</i>	52	93	83	25
. Retard (R)	<i>Parasitées</i>	0,12±0,58	0,41±0,85	(-)0,4±0,20	(-)0,44±0,24
	<i>Autres</i>	(-)0,16±0,12	0 ±0,18	(-)0,16±0,12	(-)0,55±0,15

Tableau VIII : Effet de l'inoculation de *Besnoitia jellisoni* sur la durée de la mitose des cellules HeLa.

	Témoïn	0	4	4	8	8	12	12	16	16
. Durée du cycle-moyenne (h) ± intervalle d'estimation	26,03 ± 1,53	X 30,65±4,15	NS 28,90 ± 3,63	NS 26,07 ± 3,63	NS 33,48± 17,54	X 33,57± 7,23				
. S Ecart type estimé	4,13	9,95	7,48	5,32	19,59	10,85				
. Nombre de valeurs	29	23	17	19	5	9				
. Retard (H)		4,62± 4,4	2,87± 3,9	0,04± 2,9	7,45± 17,6	7,54± 7,4				
. CV		0,32	0,26	0,20	0,59	0,32				
. Durée du cycle-moyenne (h) ± intervalle d'estimation	<i>Parasitées</i>	NS 36,21±13,04	NS 30,71± 10,32	NS 28,22± 2,88	NS 39,25 ± 29,22	NS 29,94 ± 2,54				
	<i>Autres</i>	X 28,22± 1,19	NS 28,51± 3,99	NS 25,50± 2,97	NS 24,84 ± 3,39	NS 35,38 ±10,73				
. S	<i>Parasitées</i>	17,25	8,94	2,88	25,31	3,07				
	<i>Autres</i>	2,37	7,46	5,75	2,40	13,14				
. Nombre de valeurs	<i>Parasitées</i>	7	3	4	3	3				
	<i>Autres</i>	16	14	15	2	6				
. Retard (R)	<i>Parasitées</i>	10,18± 13,12	4,68±10,43	2,19±3,26	13,22±29,26	3,91± 3,86				
	<i>Autres</i>	2,19 ± 1,94	2,48± 4,27	0,53±3,34	-1,19± 3,72	9,35±10,84				

Tableau IX :

a - Influence de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement sur la durée du cycle cellulaire de la génération traitée.

En analysant de façon séparée la durée de la mitose des cellules parasitées "à coup sûr" et non parasitées (autres) et en les comparant à la valeur moyenne de la mitose témoin $0,66 \pm 0,10$ heures, on observe une diminution significative de la durée de la mitose de la 2^e et 3^e génération post-traitée chez les cellules parasitées "à coup sûr" et pour les générations traitées et 2^e post-traitée chez les autres (Tableau VIII).

2 - Effet de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement.

La plupart des études faites sur la pénétration ne sont pas quantifiées (DORAN 1982), mais les auteurs remarquent une pénétration massive durant les premières heures après l'inoculation, sinon les premières minutes ; DOBY et AKINCHINA rapportent qu'il ne faut que 45 mm pour que tous les tachyzoïtes de *Besnoitia jellisoni* soient intracellulaires.

a - Effet sur la durée du cycle.

L'addition de *Besnoitia* dans le milieu de culture de la cellule Hela entraîne un allongement significatif de la durée du cycle de la génération traitée. Nous avons donc recherché une éventuelle influence de l'âge de la cellule hôte dans le cycle au moment de l'addition du parasite dans la culture.

Les résultats sont groupés dans le tableau IX.

Il semble que les cellules parasitées entre 0 et 4 heures et plus de 16 heures après leur dernière mitose soient les plus sensibles à l'action du parasite au niveau de la durée de leur cycle.

Si l'on analyse de façon séparée les cellules parasitées "à coup sûr" et celles supposées non parasitées, on n'observe pas de variation significative de la durée du cycle en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement. Seules les cellules supposées non parasitées présentent un allongement significatif de la durée de leur cycle lorsqu'elles sont traitées entre 0 et 4 heures après leur dernière mitose. Notons que la

	Témoins	Traitées	Post-traitée	1ère post-traitée	2 ^e post-traitée
Toutes les cellules n	0,94 31	0,94 77	0,90 124	0,88 152	0,58 45
Cellules parasitées "à coup sûr" n	0,94 31	0,81 26	0,58 26	0,32 22	0,09 11
Autres n	0,94 31	1 51	0,98 98	0,98 130	0,74 34

Tableau X Probabilité de division des générations traitées et post-traitées
(n représente le nombre de valeurs individuelles).

	Témoïn	0 à 4 H	4 à 8 H	8 à 12 H	12 à 16	16
Toutes les cellules groupées n	0,94 32	1 23	0,94 18	0,95 20	0,83 6	0,80 10
Cellules parasitées "à coup sûr" n	0,94 32	1 7	0,75 4	0,80 5	0,80 4	0,60 5
Autres n	0,94 32	1 16	1 14	1 15	1 2	1 5

Tableau XI :

Variation de la probabilité de division en fonction de l'âge pour la génération traitée.
(n représente le nombre de valeurs individuelles).



non signification du test t pour les cellules parasitées "à coup sûr" peut provenir du nombre de valeurs très faible.

b - Effet sur la durée de la mitose

Nous n'avons observé aucun effet significatif de l'addition de parasites sur la durée de la mitose de la génération traitée. Il ne nous a donc pas semblé nécessaire d'effectuer une étude de l'influence de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement.

B - Probabilité de division.

1 - En fonction des générations.

Le tableau X montre que la probabilité de division ne décroît d'une façon nette que pour la 3^e génération post-traitée, cette probabilité passe de 0,95 pour le témoin à 0,57 pour cette génération.

La probabilité de division des cellules parasitées "à coup sûr" décroît rapidement jusqu'à une valeur presque nulle (0,09) vers la 3^e génération post-traitée.

2 - En fonction de l'âge des cellules de la génération "traitée" au moment de l'inoculation.

Les résultats sont groupés dans le tableau XI, nous notons une légère diminution de la probabilité de division pour toutes les cellules du groupe inoculées de 8 à 12 heures et > de 16 heures depuis le début de leur cycle, cette diminution est causée par les cellules parasitées "à coup sûr", la probabilité de division de celles-ci décroissant nettement au delà de l'âge 0 à 4 heures.

C - Influence de l'âge de la cellule sur la pénétration du parasite.

Nous avons voulu étudier le problème de la pénétration du parasite dans la cellule hôte.

Cette pénétration se fait elle préférentiellement à un âge particulier de la cellule hôte ? Pour tenter de répondre à cette question nous avons recensé les cellules parasitées "à coup sûr" en fonction de l'âge de la cellule hôte au moment du traitement. Les résultats sont groupés sur le tableau ci-dessous :

Tableau XII

Age en heures	0 à 4	4 à 8	8 à 12	12 à 16	16	Total
Nombre total de cellules	23	18	20	6	10	77
Nombre de cellules parasitées	7	4	5	4	5	25
Pourcentage de cellules parasitées (%)	30,43	22,22	25	66,66	50	32,47

Les cellules traitées 12 à 16 heures après le début de leur cycle présentent le pourcentage de cellules parasitées le plus élevé : 66,66%

III - DISCUSSION

Nous avons expliqué précédemment que, pour des raisons de non disponibilité des appareils de microcinématographie, nous n'avons pu réaliser l'analyse des cultures témoins simultanément à celles des flacons infectés. Nous avons donc utilisé comme témoin les durées du cycle et de la mitose de la génération qui précède le traitement.

GENERATIONS	Prétraitée	Traitée	post-traitée	2 ^e post-traitée	3 ^e post-traitée
Durée de cycle cellulaires - moyenne + (h) Intervalle d'estimation	pas assez de valeurs	28,31±2,93	26,86±0,91	31,24±1,88	28,99±1,67
Ecart type estimé S		8,03	2,87	5,72	4,57
Coefficient de variation ($CV = \frac{S}{\bar{X}}$)		0,28	0,11	0,18	0,16
Nombre de valeurs : N		(30)	(40)	(37)	(30)
Durée de la mitose - moyenne + (h) Intervalle d'estimation		0,53±0,09	0,60±0,10	0,57±0,07	0,57±0,10
Ecart-type estimé S	0,19	0,26	0,20	0,29	0,38
Coefficient de variation ($CV = \frac{S}{\bar{X}}$)	0,36	0,43	0,35	0,52	0,76
Nombre de valeurs : N	(19)	(29)	(37)	(37)	(30)

Tableau XIII : Durée du cycle et de la mitose des cellules Hela en fonction des Générations.



Il était logique de se demander si pour la cellule hôte les durée du cycle et de la mitose ne varient pas spontanément en fonction des générations. Nous avons donc réalisé quelques films sur des cultures témoins. Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau XIII.

On constate que les durées du cycle et de la mitose des cellules Hela sont relativement stables au travers des générations et que l'allongement du cycle observé après inoculation de *Besnoitia jellisoni* résulte bien de la présence du parasite dans la culture. La probabilité division est constante au travers des générations (Tableau XIV).

Cette stabilité du temps de cycle dans une même expérience pourrait être expliquée par plusieurs hypothèses (dans nos conditions de cultures) parmi lesquelles on peut citer :

- La concentration des éléments nutritifs reste suffisante pendant au moins 5 générations : ainsi TAMM et al (1982) considèrent que des concentrations de sérum aussi basses que 2,5% apportent aux cellules Hela les facteurs de croissance et d'autres composantes en quantités suffisantes pour assurer leur prolifération jusqu'à un taux de croissance maximum.

- La densité de saturation cellulaire joue un rôle prédominant dans la variation de la durée du cycle et de la mitose au cours des générations en agissant sur l'espace intercellulaire et la mobilité des cellules (COLLYN-d'HOOGE 1980). ABERCOMBIE et AMBROSE (1958) montrent une corrélation positive entre la mobilité cellulaire et la capacité de division.

Dans nos conditions expérimentales, il semble que la concentration de départ (150000 cellules) permette une croissance sans grande influence du degré de densité : la saturation n'est pas atteinte au moment de l'arrêt de nos mesures.

- Le pH reste constant pendant toute la durée de l'expérience DAWSON et al (1965) et MIYAMOTO et al (1973) ont également enregistré des durées de cycle parfaitement stables pendant plusieurs générations pour des cultures de

	traitée	post-traitée	2 ^e post-traitée	3 ^e post-traitée
Valeurs	$\frac{29}{31}$	$\frac{40}{40}$	$\frac{37}{37}$	$\frac{30}{30}$
Probabilités	0,94	1	1	1

Tableau XIV

Probabilité de Division des cellules Hela
au travers des générations



Sarcome de rat et de fibroblastes de souris (NCTC 929).

Par contre d'autres auteurs rapportent une variation du cycle et de la mitose au travers des générations d'autres cellules par exemple les cellules EMT 6 (COLLYN-d'HOOGHE et al. 1977). Les divergences des résultats entre les différents auteurs peuvent s'expliquer par la souche cellulaire utilisée, les conditions de culture et/ou la densité cellulaire initiale.

La valeur du cycle de la cellule Hela dans nos conditions de culture est en moyenne comprise entre 26 et 29 heures, cette valeur est proche de celle observée par : HSU(1960) (30,5 heures) et BRAVO et CELIS(1980) (24,5 heures), mais diffère de celle observée par PUCK et STEFFEN(1963) (20,5 ± 1,55 heures) FROESE(1966) (18 à 21 heures) TAMM et al(1982) (17 à 18,5 heures), BEETHAM et TOLMACH(1982) (16 heures).

Les différences enregistrées résultent très certainement de l'utilisation de sous clones différents et surtout des différentes méthodes d'étude du cycle (microcinéma, indices mitotiques ...)

A notre connaissance, aucune étude quantifiée de l'influence de l'introduction de parasites dans une culture cellulaire sur la durée du cycle et de la mitose n'a été publiée jusqu'à présent.

L'inoculation des cellules Hela par *Besnoitia* a provoqué un allongement significatif de la durée moyenne du cycle de celle-ci. Cette augmentation peut être expliquée en partie pour la génération traitée par les perturbations créées par les modifications de la membrane de celle-ci (voir le chapitre : pénétration) et par la présence du parasite dans le cytoplasme

des cellules parasitées à coup sûr. Les cellules dites non parasitées ne semblent ressentir l'introduction du parasite dans le milieu qu'à partir de la génération post-traitée. Cet allongement du cycle peut être dû à divers facteurs perturbant le métabolisme de la cellule-hôte :

- Parce qu'il y a une prédominance de métabolisme de carbohydrates chez les Coccidies, il n'est pas exclu de penser que le parasite puise l'oxygène contenu dans le cytoplasme de la cellule hôte infestée durant sa croissance

(WANG 1982) ; ceci expliquerait la production massive d'acide lactique par des cellules infestées, ce qui a été montré à propos du tissu intestinal parasité par *Eimeria acervulina* (VAN DER HORST et KOUWENHOUEN 1973), ou bien la diminution de pH chez l'hôte infesté : ceci a été retrouvé par exemple pour *Eimeria necatrix* (STEPHENS 1965).

- Les Coccidies montrent une incapacité de synthétiser certains acides gras essentiels insaturés (WANG 1982), on peut penser que le parasite les puise dans le cytoplasme hôte.

- D'autres substances peuvent être puisées dans le cytoplasme hôte (voir WANG 1982).

Des perturbations dans les échanges entre la cellule et son environnement peuvent être observées après une infection. BROWNING et al 1976 ont montré par autoradiographie, qu' aussi bien les cellules parasitées que non parasitées dans une culture infestée montrent une augmentation de l'incorporation de la thymidine tritiée ; cet effet n'a été significatif que 24 heures après l'inoculation. Cette expérience illustre un exemple des perturbations qui peuvent altérer les mécanismes métaboliques dans une culture infestée.

On peut suggérer les hypothèses suivantes pour la perturbations du déroulement normal du cycle des cellules Hela infestées par *Besnoitia* :

- L'augmentation de la durée du cycle des cellules parasitées à coup sûr pendant la génération traitée serait peut être due à la production de certaines substances par la cellules-hôtes pour réparer les dégats provoqués par la pénétration du parasite, et en même temps l'élaboration de substances pour rejeter ou s'adapter à ce corps étranger ; globalement ce serait les réactions de défense qui auraient augmenté la durée du cycle.

- Le parasite aurait pu en cours de pénétration produire une substance facilitant sa pénétration puis des substances de camouflage ou de protection (vis à vis des lysosomes de la cellules hôte par exemple) et puiser des substances pour assurer son développement, tout ceci aurait agi sur la cellule

hôte en l'affaiblissant, ce qui se traduirait par une augmentation de la durée de son cycle.

- L'effet tardif de la présence du parasite sur les cellules présumées saines (1^e génération après l'inoculation) pourrait être dû : au temps nécessaire pour l'atteinte d'un seuil critique en concentration de substances nocives ou toxiques produites par les parasites et/ou les cellules parasitées à coup sûr dans le milieu de culture et qui auraient sensibilisé les cellules dites saines. Dès cette génération nous trouvons aussi des cellules sans parasites, qui proviennent de la division de cellules mères parasitées ayant donné 1 cellule fille avec parasite et une sans parasite mais dont les mécanismes cytologiques ont pu être altérés.

Les cellules parasitées à coup sûr semblent "s'adapter" aux conditions impliquées par la présence du parasite (création d'un équilibre assurant la survie des deux partenaires ?) alors que celles supposées saines "souffrent" de cette présence jusqu'au début de la 3^e génération post-traitée. Mais ici encore la prudence s'impose étant donnée la disproportion importante entre le nombre de valeurs des 2 groupes de cellules.

N'ayant trouvé que peu de renseignements sur les échanges entre le parasite et son hôte aussi bien que sur la manière dont se font ceux-ci, il nous est difficile de faire une comparaison avec d'autres agents qui allongent la durée du cycle (par exemple les irradiations).

L'effet du traitement sur la mitose n'entraîne de modification de la durée de celle-ci d'une façon significative que pour la génération deuxième post-traitée pour l'ensemble des cellules. Quand on sépare la population en cellules parasitées et non parasitées, ces dernières semblent montrer une diminution significative de la durée de la mitose à la génération traitée et 2^e post-traitée ; ce qui pourrait être lié à la présence du parasite dans le milieu extracellulaire ; pour la génération traitée la culture vient d'être inoculée avec des *Besnoitia*, pour la génération 2^e post-traitée cela correspond à des éclatements cellulaires : en effet nous avons calculé la durée moyenne du cycle du parasite; pour ces expériences elle est de $75,05 \pm 14,05$ heures

Nous ne pouvons expliquer par quel mécanisme pourrait arriver cette diminution de la durée de la mitose.

Remarquons, cependant, que la génération 2^e post-traitée correspond à celle où on a une vague d'éclatement des cellules parasitées "à coup sûr" donc une génération où les clones de parasites sont volumineux et peuvent gêner le déroulement normal de la mitose.

L'influence de l'âge de la cellule dans le cycle au moment du traitement n'implique de variation significative de la durée du cycle que pour les cellules traitées entre 0 à 4 heures et > 16 heures depuis le début de leur cycle c'est à dire en dehors de la phase de synthèse d'ADN.

La probabilité de division ne commence à décroître qu'au delà de la génération post-traitée donc après un temps de contact avec le parasite d'à peu près 3 jours ou plus, on remarque que cette diminution de la faculté des cellules à se diviser est surtout observée au niveau des cellules parasitées. Notons que cela correspond à nos observations sur le vivant ; l'éclatement de certaines cellules parasitées débute 48 heures après l'inoculation du parasite, et une vague d'éclatement arrive entre le troisième et le quatrième après celle-ci.

La variation de la probabilité de division en fonction de l'âge de la cellule dans le cycle ne semble provenir que des cellules parasitées à coup sûr. En général ces cellules qui ne sont pas divisées éclatent après 48 heures d'inoculation ou plus.

La pénétration du parasite dans la cellule hôte intervient préférentiellement lorsque la cellule est traitée de 12 à 16 heures après le début de son cycle, elle est alors de 66,66%.

Le cycle des cellules somatiques est divisée en 4 phases, nommées G₁ (phase de présynthèse) suivie par S (phase de synthèse d'ADN) G₂ (période dite de post synthèse) et M (phase de division cellulaire).

Pour BRAVO et CELLIS (1980) le cycle moyen de la cellule Hela de 24,5 heures est divisé en G_1 (11,5 heures), S (8,8 heures), et M 4 heures. Pour BEETHAM et TOLMACH (1982) le temps de génération est de 16 heures avec 6,5 heures pour G_1 , 6 heures pour S et 3 heures pour G_2 . Pour FIRKET et MAHIEU (1966) rapportent une durée moyenne de la phase S de 8 heures.

On peut donc estimer que l'âge : 12 à 16 heures pourrait correspondre à la phase S, ou à une deuxième partie de cette phase.

DVORAK et HOWE 1977 rapportent que l'âge de la culture des cellules BESM (Secondary bovine embryo Skeletal muscle) influence directement la capacité de *Toxoplasma gondii* à pénétrer les cellules.

La sensibilité à l'infection des cellules Hela par *Toxoplasma gondii* et *Trypanosoma cruzi* augmente quand les cellules Hela passent de la phase G_1 à la phase S de leur cycle de croissance et décroît quand la cellule passe en G_2 - M (DVORAK et CRANE 1981). D'après ces auteurs les composantes de la surface des cellules Hela faisant fonction de récepteurs apparaîtraient en forte concentration dans la phase S et pourraient être responsables de ce phénomène.

Notre résultat, obtenu avec une technique différente est tout à fait en accord avec celui de DVORAK et CRANE (1981).

AVANTAGES ET LIMITES DE LA METHODE

La microcinématographie permet l'étude directe du comportement du couple parasite/cellule-hôte, elle nous permet de déterminer avec précision l'action du parasite sur la durée du cycle et de la mitose de sa cellule hôte et l'évolution de ces 2 paramètres en fonction des générations ; par cette méthode l'âge des cellules au moment du "traitement" est déterminé sans avoir recours à des artifices physico-chimiques, le moment des éclatements cellulaires est situé avec exactitude ; la possibilité de "remonter le temps" établit ainsi le moment de l'infection. Mais cette méthode nécessite de n'avoir au

départ qu'un faible nombre de cellules, ce qui rend difficile l'interprétation statistique des résultats. Par ailleurs elle ne permet pas d'étudier les différentes phases du cycle : pour les connaître il faut la coupler avec d'autres méthodes (par exemple méthodes autoradiographiques, la cytofluorométrie de flux ...)

Les résultats que nous avons obtenus sont certes préliminaires et peuvent susciter un certain nombre de critiques. Le manque de références sur le sujet était total en ce qui concerne le développement des Coccidies *in vitro*, et presque total pour les cellules Hela, de sorte que nous avons dû mettre au point le protocole expérimental. Ce n'est que lors de l'interprétation des résultats que sont apparues clairement les lacunes ou les erreurs que nous avons pu commettre. Ainsi, nous nous étions basés sur des travaux qui rapportaient que la pénétration d'une suspension^{de} zoïtes de Coccidies dans une culture est très rapide (moins de 1 heure après l'inoculation). Effectivement l'étude approfondie des films laisse supposer que les cellules ont été infectées dans les premiers instants. Cependant nous avons voulu vérifier si ceci pouvait être considéré comme absolu, et les expériences que nous avons faites dans ce sens (chapitre : page 39) ont montré que les bradyzoïtes restaient ^{infectieux} pendant plusieurs heures. La rigueur expérimentale exige donc que les expériences ultérieures en microcinématographie comprennent un lavage efficace des cultures étudiées 1/2 heure ou 1 heure après l'inoculation des parasites ; ceci constitue d'ailleurs un résultat en soi et une étape vers une standardisation des méthodes.

L'étude de clones de cellules, c'est à dire en utilisant une seule cellule-hôte au départ permettra de suivre avec certitude les cellules soeurs, en particulier d'évaluer les perturbations qui ont pu être infligées à la cellule redevenue "saine" après la division d'une cellule-mère porteuse d'un parasite. Enfin il faudra coupler cette méthode avec celles qui permettent de situer dans le cycle cellulaire les stades sensibles au parasite.

RESUME ET CONCLUSION GENERALE

Résumé et Conclusion Générale

L'étude des corrélations entre *Besnoitia jellisoni* (Coccidie) et sa cellule-hôte *in vitro* a été abordée à l'aide de différentes techniques dont certaines nouvelles pour ce matériel.

L'observation sur le vivant complétée par quelques données ^{de} microscopie électronique montre que la motilité est un phénomène très important pour la pénétration des zoïtes de *Besnoitia* dans la cellule hôte, et que cette pénétration est active.

Notre travail confirme la non spécificité des cellules-hôtes potentielles à l'égard de *Besnoitia* (comme de *Toxoplasma*) puisque toutes les cellules que nous avons utilisées se sont révélées accueillantes. Nous avons cependant choisi d'expérimenter sur la cellule Hela car elle permet une excellente "lecture" des infections en raison de la faible densité de son cytoplasme et de l'homogénéité des tapis qu'elle forme (à la différence des cellules embryonnaires par exemple) ainsi que pour sa longévité à l'état confluent et sa résistance (d'autres cellules se décolent plus facilement).

L'incubation dans de la trypsine pendant un temps court s'est révélée activatrice de la pénétration pour les bradyzoïtes, mais nocive pour les tachyzoïtes.

La présence de sérum dans le milieu de culture augmente la pénétration des zoïtes de *Besnoitia jellisoni* dans sa cellule hôte. Le pourcentage de cellules parasitées augmente avec le nombre de parasites inoculés ; à partir de 8 millions de *Besnoitia* par boîte (de 25 cm²), la répartition des parasites ne se fait plus au hasard, et il faut admettre qu'une cellule parasitée est plus apte qu'une cellule saine à recevoir d'autres parasites.

Nous avons pu montrer que l'ensemencement avec moins de 400 000 cellules Hela par boîte (de 25 cm²) n'est pas compatible avec une étude de répartition statistique de la parasitémie.

Nous avons montré par comptage qu'un grand nombre de parasites rentrent dans les cellules hôtes quelques heures après l'inoculation, mais que pour les bradyzoïtes la pénétration peut continuer jusqu'à 24 heures après l'inoculation. Par contre l'étude en cinématographie met en évidence une perte rapide de la motilité et du pouvoir de pénétration des tachyzoïtes.

Ce procédé permet de confirmer que le temps de génération du parasite est de 24 heures; vague d'éclatement de cellules après 3 jours d'inoculation; qu'une cellule parasitée peut se diviser et comporter dans sa descendance des cellules redevenues "saines".

Enfin nous avons recherché l'influence du parasite sur la durée du cycle et la mitose de la cellule hôte en utilisant la technique de microcinématographie, ce qui à notre connaissance, n'avait jamais été réalisé. Ainsi nous avons noté une augmentation significative de la durée du cycle des 3 premières générations après l'infestation pour l'ensemble des cellules de la culture, une diminution de la durée de la mitose de la 2^e génération post-traitée, une plus grande réceptivité au parasite des cellules inoculées par *Besnoitia jellisoni* 12 à 16 heures après le début de leur cycle.

De l'ensemble de notre travail ressortent un certain nombre de résultats qui pourront être mis à profit par de futurs expérimentateurs:

Pour une étude *in vitro* sur les relations entre le parasite et une cellule hôte, nécessitant une durée assez longue (plus d'une semaine), il est préférable d'utiliser un faible nombre de parasites (ne dépassant pas 2 millions de bradyzoïtes par boîte de 25cm²) et une quantité de cellules ne dépassant pas 200 000, un pourcentage de sérum de veau de 5 à 10%.

Alors que pour étudier ces relations sur une durée de temps ne dépassant pas une semaine, 4 millions de bradyzoïtes par boîte sont suffisants pour donner une infection facilement repérable, ne dépassant pas 50% des cellules, une concentration de sérum de 2 à 5% convient à une bonne croissance des cellules hôtes; celles-ci peuvent êtreensemencées au départ

avec une concentration qui donne presque la confluence, ce qui nous permet d'avoir une grande partie des cellules dans un même stade (G_1), et autorise des comparaisons raisonnables d'une manipulation à l'autre.

Pour les expériences nécessitant la synchronisation des parasites et pour la cinématographie surtout lors de la recherche de l'action de l'âge de la cellule dans le cycle sur la pénétration du parasite, un lavage des cellules au maximum une heure après l'inoculation s'impose.

Si on est obligé d'utiliser un grand nombre de parasites, on doit tenir compte de la possibilité de pénétrations multiples dans une même cellule.

Toutes ces conditions permettent de maintenir un bon équilibre entre les parasites et les cellules.

Nous avons montré que la méthode de microcinématographie permet d'étudier avec précision les variations au cours des générations et avec l'âge, de la durée moyenne du cycle et de la mitose. La connaissance des stades sensibles au parasite dans le cycle d'une cellule peut à coup sûr faire progresser les recherches sur les récepteurs membranaires et l'efficacité des drogues.

La microcinématographie pourra permettre de préciser le degré de synchronisation des cultures, de suivre individuellement l'évolution d'une cellule saine fille d'une cellule parasitée; couplée à des études structurales elle pourra aider à connaître l'action cytotoxique des parasites ou de leurs extraits sur les cellules hôtes, ou l'action de drogues sur ces parasites ainsi que le rétablissement des fonctions normales des cellules.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

ABERCOMBIE M. et AMBROSE E.J., 1958.

Interference microscope studies of cell contacts in tissue culture. *Exp. cell Res.*, 15, 332-345.

AIKAWA M., MILLER L.H., JOHNSON J. and RABBEGE J. 1978.

Erythrocyte entry by malarial parasites : a moving junction between erythrocyte and parasite. *J. Cell Biol.*, 77, 72-82.

AIKAWA M., COCHRANE A.H., NUSSENZWEIG R.S. et RABBEGE J., 1979.

Freeze-fracture study of Malaria Sporozoites : Antibody-induced changes of the pellicular membrane
J. Protozool., 26, 273-279.

AKINCHINA G.T. et DOBY J.M., 1969 b.

Multiplication de *Besnoitia jellisoni* Frenkel, 1953 (Protozoaire Toxoplasmatea) en cultures de cellules de tissus d'origines différentes. *Protistologica*, 5, 249-253.

AKINCHINA G.T. et DOBY J.M., 1969 a.

Etude comparée de la multiplication de *Toxoplasma gondii* et de *Besnoitia jellisoni* dans les cultures de cellules. *Progr. Protozool.* (Proc. III Int. Cong. Protozool.), p. 222.

AKINCHINA G.T. et ZASUKHIN D.N., 1971.

Intranuclear localization of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni* in conditions of tissue culture and some remarks on the intranuclear parasitism. *Acta Protozool.*, 7, 341-348.

- ARAI H., SAITO H. et NOMURA T., 1958.
Invasion and multiplication of *Toxoplasma gondii* in HeLa cells.
Jap. J. Med. Progr., 45, 663-669.
- ASHWELL G. et MORELL A.G., 1977.
Membrane glycoproteins and recognition phenomena. Trends Biochem.
Sci., 2, 76-78.
- BANNISTER L.H., 1977.
The invasion of red cells by *Plasmodium*. Symposia of the British
Society for Parasitology vol. 15, Ed. A.E.R. Taylor and R. Muller
Blackwells, Oxford, 27-55.
- BANNISTER L.H., BUTCHER G.A., DENNIS E.D. et MITCHELL G.H., 1975.
Structure and invasive behaviour of *Plasmodium knowlesi* me-
rozoïte *in vitro*. Parasitology 71, 483-491.
- BASERGA R., 1976.
Multiplication and division in mammalian cells. In the Biochemis-
try of Disease, M. DEKKER, INC., New-York, 6.
- BAUMANN H. et DOYLE D., 1979.
Effects of trypsin on the cell surface proteins of hepatoma tissue
culture cells. Characterization of a carbohydrate-rich glycopep-
tide released from a calcium - binding membrane glycoprotein.
J. Biol. chem., 254, 3935-3946.
- BEETHAM K.L. et TOLMACH L.J., 1982.
Growth and death of HeLa cells in the presence of caffeine J.
Cellul. Physiol., 113, 385-397.
- BOMMER W., 1969.
The life cycle of virulent *Toxoplasma* in cell culture. Aust. J.
Exp. Biol. Med. Sci., 47, 505-512.
- BOMMER W., HEUNERT H.H. et MILTHALER B., 1969.
Kinematographische Studien Über die Eigenbewegung von *Toxoplasma
gondii*. Z. Tropenmed. Parasitol., 20, 450-458.
- BRAVO R. et CELIS J.E., 1980.
A search for differential polypeptide synthesis throughout the
cell cycle of HeLa cells. J. Cell. Biol., 84, 795-802.

BROWNING R.F., PATTON W.H. et LYTTLE C.F., 1976.

Eimeria tenella : Stimulation of DNA synthesis in infected cultured animal cells. *Exp. Parasitol.*, 39, 195-203.

CHBOUKI N., 1982

Etudes sur la structure et la physiologie de la pellicule des zoïtes de coccidies. Thèse de 3^e cycle, Université de Lille I, n° 1013.

CHOBOTAR B., SCHOLTYSECK E., 1982.

Ultrastructure. In the Biology of the coccidia, P. LONG ed. University Park Press, Baltimore, 101-165.

COHEN S., BUTCHER G.A. et CRANDALL R.B., 1969.

Action of malarial antibody *in vitro*. *Nature (London)*, 223, 369-371.

COLLYN-D'HOOGE M., 1980.

Etude microcinématographique de la durée du cycle, de la durée de la mitose et de la probabilité de division des cellules EMT 6 soumises ou non a une irradiation (rayons gammas, ions lourds). Thèse Université de Lille I, n° 481.

COLLYN-D'HOOGE M., VALLERON A.J., MALAISE E.P., 1977.

Time-Lapse cinematography studies of cell cycle and mitosis duration. *Exp. cell Res.*, 106, 405-407.

COOK M.K. et JACOBS L., 1958.

Cultivation of *Toxoplasma gondii* in tissue cultures of various derivations. *J. Parasitol.*, 44, 172-182.

CRANE M.St.J. et DVORAK J.A., 1982.

Influence of monosaccharides on the infection of vertebrate cells by *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 5, 333-341.

DANFORTH H.D., AIKAWA M., COCHRANE A.H. et NUSSENZWEIG R.S., 1980.

Sporozoïtes of Mammalian Malaria : Attachment to, interiorisation and fate within Macrophages. *J. Protozool.*, 27, 193-202.

DAWSON K.B., MADOC J.H. et FIELD O., 1965.

Variation in the generation times of a strain of rat sarcoma in culture. *Exp. cell Res.*, 38, 75-84.

DENIZOT F. et GOLSTEIN P., 1982.

The functional effects of foetal calf serum on mouse lymphocytes in culture. *Bull. Inst. Pasteur*, 80, 247-276.

DOBY J.M. et AKINSHINA F.T., 1968.

Possibilités de développement de *Besnoitia jellisoni* (Protozoaire parasite Toxoplasmatea) en culture de cellules. Quelques aspects de son comportement en fibroblasts d'embryon de poulet. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 162, 1207-1210.

DORAN D.J., 1971 .

Increasing the yield of *Eimeria tenella* oocysts in cell culture. *J. Parasitol.*, 57, 891-900.

DORAN D.J., 1973.

Cultivation in avian embryos and cell culture. The Coccidia (HAMMOND D.M. et LONG P.L., Eds), 185-252, (University Park Press, Baltimore).

DORAN D.J., 1982.

Behaviour of Coccidia *in vitro*. In the Biology of the Coccidia P. LONG ed. University Park Press, Baltimore, 229-287.

DORAN D.J. et FARR M.M., 1962.

Excystation of the poultry coccidium *Eimeria acervulina* J. Protozool., 9, 154-161.

DORAN D.J. et VETTERLING J.M., 1969.

Influence of storage period on excystation and development in cell culture of sporozoites of *Eimeria meleagridis* Tyzzer, 1929. *Proc. Helminth. Soc. Wash.*, 36, 33-35.

DUBREMETZ J.F., 1981.

Le zoïte des Coccidies : Cytologie, Biochimie, Physiologie et interactions avec la cellule-hôte. Thèse Université LILLE, n° 515.

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

Freeze fracture study of the pellicle of an eimerian sporozoite
(Protozoa, Coccidia) J. Ultrastr. Res. 62, 94-109.

DUBREMETZ J.F., DISSOUS C. et FERREIRA E., 1982.

Toxoplasma gondii : libération d'une protéine 25 KD associée à
l'invasion de la cellule-hôte. J. Protozool., 29, 303.

DUBREMETZ J.F., PORCHET-HENNERE E. et PARENTY M.D., 1975.

Croissance de *Sarcocystis tenella* en culture cellulaire. C.R.
Acad. Sci. (D) (Paris), 280, 1793-1795.

DVORAK J.A. and CRANE M.St.J., 1981.

Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites.
Science, 214, 1034-1036.

DVORAK J.A. et HOWE C.L., 1977.

Toxoplasma gondii vertebrate cell interactions. I. the influence
of bicarbonate ion, CO₂ pH and host cell age on the invasion of
vertebrate cells *in vitro*. J. Protozool., 24, 416-419.

ENDO T., PELSTER B. et PIEKARSKI G., 1981.

Infection of murine peritoneal macrophages with *Toxoplasma gondii*
Exposed to ultraviolet light. Z. Parasitenkd, 65, 121-129.

ENDO T., SETHI K.K. et PIEKARSKI G., 1982.

Toxoplasma gondii : Calcium ionophore A 23187 - Mediated exit
of trophozoites from infected murine macrophages. Exp. Parasitol.,
53, 179-188.

ERNST J.V., CHOBOTAR B., OAKS E.C. et HAMMOND D.M., 1968.

Besnoitia jellisoni (Sporozoa : Toxoplasmea) in rodents from Utah
and California. J. Parasitol., 54, 545-549.

FAYER R., 1970 .

Sarcocystis : Development in cultured avian and mammalian cells.
Science, 168, 1104-1105.

FAYER R., HAMMOND D.M., CHOBOTAR B. et ELSNER Y.Y., 1969.

Cultivation of *Besnoitia jellisoni* in bovine cell cultures.
J. Parasitol., 55, 645-653.

FIRKET H. et MAHIEU P., 1966.

Irradiation et protection de cultures synchrones de cellules Hela.
I. Effet sur le premier cycle cellulaire. Int. J. Rad. Biol., 11,
245-253.

FISHER R.A., 1954.

Statistical methods for research workers. Oliver and Boyd,
London, 356.

FRENKEL J.K., 1953.

Infections with organisms resembling *Toxoplasma* together with the
description of a new organism : *Besnoitia jellisoni*. Atti. del,
VI Cong. Int. Microbiol. Roma, 5, 426-434.

FRENKEL J.K. et LUNDE M.N., 1966.

Effects of corticosteroids on antibody and immunity in *Besnoitia*
infection of hamsters. J. Inf. Dis., 116, 414-424.

FROESE G., 1966.

Division delay in Hela cells and chinese hamster cells. A
time lapse study. Int. J. Radiat. Biol., 10, 353-367.

GARNHAM P.C.C., 1961.

The ultrastructure of Haemosporidia and allied protozoa with
special reference to the motile stages. Progr. in Protozool.
Proc. Int. Congr. Protozool. Prague, IX, 427-433.

GARNHAM P.C.C., BIRD R.G. et BAKER J.R., 1960.

Electron microscope study of motile stages of malaria parasites :
I. the fine structure of the sporozoites of *Haemamoeba (Plas-*
modium) gallinacea. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 54, 274-278.

GOLDMAN M., CARVER R.K. et SULZER A.J., 1957.

Similar internal morphology of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia*
jellisoni stained with silver protein. J. Parasitol., 43,
490-491.

GRASSE P.P., 1953.

Anatomie - Systematique - Biologie. Traité de Zoology T.I., fasc. 2.
(Masson et C^{ie}, eds).

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

Toxoplasma gondii : purification of Trophozoites propagated in cell culture.

Exp. Parasit., 48, 282-286.

HAMBURGER R.N., PIOUS D.A. et MILLS S.E., 1963.

Antigenic specificities acquired from the growth medium by cells in tissue culture. *Immunology* 6, 439-449.

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

Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, 124, 2578-2583.

HENDRICKS L.D. et FAYER R., 1973.

Development of *Hepatozoon griseisciuri* in cultured squirrel cells. *J. Protozool.*, 20, 550-554.

HENNERE E., 1967.

Etude cytologique des premiers stades du développement d'une Coccidie : *Myriosporides amphiglenae*. *J. Protozool.*, 14, 27-39.

HOLMBERG S., SCHULMAN S. et VANDERBERG J.P., 1981.

Role of a serum factor in enhancement of *in vitro* interaction between *Plasmodium berghei*. Sporozoites and hamster peritoneal macrophages. *J. Parasitol.*, 67, 893-897.

HOLZ A. et ALBRECHT M., 1953.

Die Zuchtung von *Toxoplasma gondii* in Zellkulturen. *Z. Hyg. Infekt.*, 136, 605-609.

HSU T.C., 1960.

Generation time of HeLa cells determined from cine records
Texas Rep. Biol. Med., 18, 31-33.

HURWITZ C. et TOLMACH L.J., 1969.

Time lapse cinematographic studies of X - irradiated HeLa S₃
Cells. I. Cell progression and cell desintegration. Biophys.
J., 9, 607-633.

HURWITZ C. et TOLMACH L.J., 1969.

Time lapse cinematographic studies of X - irradiated HeLa S₃
Cells. II. Cell fusion. Biophys. J., 9, 1131-1143.

JACKSON A.R.B., 1962.

Excystation of *Eimeria arloingi* (Marotel 1905). Stimuli from
the host sheep. Nature, London 194, 847-849.

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

Possible secretory function of the rhoptries of *Eimeria magna*
during penetration of cultured cells. J. Parasit., 62, 988-992.

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

Effects of antiphagocytic agents on penetration of *Eimeria magna*
sporozoites into cultured cells. J. Parasitol., 62, 203-206.

JENSEN J.B. et EDGAR S.A., 1978.

Fine structure of penetration of cultured cells by *Isospora*
canis sporozoites. J. Protozool., 25, 169-173.

JENSEN J.B. et HAMMOND D.M., 1975.

Ultrastructure of the invasion of *Eimeria magna* sporozoites
into cultured cells. J. Protozool., 22, 411-415.

JONES T.C., 1973.

Multiplication of *Toxoplasma* in enucleate fibroblasts. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 42, 1268-1271.

JUNGERY M., BOYLE D., PATEL T., PASVOL G. et WEATHERALL D.J., 1983.

Lectin-like polypeptides of *Plasmodium falciparum* bind to red cell sialoglycoproteins. Nature 301, 704-705.

KAUFMAN H.E. et MALONEY E.D., 1962.

Multiplication of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. J. Parasitol., 48, 358-361.

KAUFMAN H.E., REMINGTON J.S. et JACOBS L., 1958.

Toxoplasmosis : The nature of virulence. Am. J. Ophthalmol., 46 (Nov., Part 2), 255-261.

KEUSCH G.T., 1979.

Specific membrane receptors : Pathogenic and therapeutic implication in infectious diseases. Rev. Infect. Dis., 1, 517-529.

KILEJIAN A., 1976.

Does a histidine - rich protein from *Plasmodium lophurae* have a function in merozoite penetration ? J. Protozool., 23, 272-277.

KUSUNOKI Y., 1977.

In vitro study on the invasion and multiplication of *Toxoplasma gondii* sporozoites in cultured cells. (In Japanese ; English summary) Jpn. J. Parasitol., 26, 6-16.

LADDA R., AIKAWA M. et SPINZ H., 1969.

Penetration of erythrocytes by merozoites of mammalian and avian malarial parasites. J. Parasitol., 55, 633-644.

LONG P.L. et SPEER C.A., 1977.

Invasion of host cells by Coccidia. In : Parasite invasion 15 th Symposium of the British society for Parasitology, 1 - 26 Blackwell Scientific Publication, Led., Oxford.

LUFT J.H., 1961.

Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. cytol., 9, 409-414.

LUND E., LYCKE E. et SOURANDER P., 1961.

A cinematographic study of *Toxoplasma gondii* in cell cultures. Br. J. Exp. Pathol., 42, 357-362.

LUND E., LYCKE E. et SOURANDER P., 1963 a

Some aspects of cultivation of *Toxoplasma gondii* in cell cultures. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 57, 199-210.

LYCKE E. et LUND E., 1964 a

A tissue culture method for titration of infectivity and determination of growth rate of *Toxoplasma gondii* Acta Pathol. Microbiol. Scand., 60, 221-233.

LYCKE E. et LUND E., 1964 b.

A tissue culture method for titration of infectivity and determination of growth rate of *Toxoplasma gondii*. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 60, 209-220.

LYCKE E. et NORRBY R., 1966.

Demonstration of a factor of *Toxoplasma gondii* enhancing the penetration of toxoplasma parasites into cultured host cells British. J. Exp. Pathol., 47, 248-256.

LYCKE E., CALBERG K. et NORRBY R., 1975.

Interaction between *Toxoplasma gondii* and its host cells : function of the penetration - enhancing factor of *Toxoplasma*. Infect. Immun., 11, 853-861.

MATSUBAYASHI H. et AKAO S., 1963.

Morphological studies on the development of the *Toxoplasma* cyst.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 12, 321-333.

MATSUOKA T., CALLENDER M.E. et SCHUMARD D.F., 1969.

Embryonic bovine tracheal cell line for *in vitro* cultivation
of *Eimeria tenella*. Am. J. Vet. Res., 30, 1119-1122.

Mc LAREN D.J., BANNISTER L.H., TRIGG P.I. et BUTCHER G.A., 1979.

Freeze fracture studies on the interaction between the malaria
parasite and the host erythrocyte in *Plasmodium knowlesi* in-
fections. Parasitology, 79, 125-139.

De MEIRELLES M.N.L., De ARACIJO JORGE T.C. et De SOUZA W., 1982.

Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages *in vitro* :
dissociation of the attachment and internalization phases by
low temperature and cytochalasin B.Z. Parasitenkd., 68, 7-14.

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

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

MILLER L.D., AIKAWA M. et DVORAK J.A., 1975.

Malaria (*Plasmodium knowlesi*) merozoites : Immunity and the
surface coat. J. Immunol., 114, 1237-1241.

MILLER L.H., AIKAWA M., JOHNSON J.G. et SHIROISHI T., 1979.

Interaction between cytochalasin B - treated malarial parasites
and erythrocytes. J. Exp. Med., 149, 172-184.

MIYAMOTO H., ZEUTHEN E. et RASMUSSEN L., 1973.

Clonal growth of mouse cells (Strain L). J. Cell. Sci.,
13, 879-888.

MYLER P., SAUL A., MANGAN T. et KIDSON C., 1982.

An automated assay of merozoite invasion of erythrocytes using highly synchronized *Plasmodium falciparum* cultures. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 60, 83-89.

NICHOLS B.A. et O'CONNOR G.R., 1981.

Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. Laboratory Invest., 44, 324-334.

NICHOLS B.A., CHIAPPINO M.L. et O'CONNOR G.R., 1983.

Secretion from de rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. J. Ultrastruct. Res. (sous presse).

NORRBY R., 1970 a.

An immunological study on the host cell penetration factor of *Toxoplasma gondii*. p. 79. Elanders Boktryckeri Aktiebolag. Goteborg. Sweden.

NORRBY R., 1970 b.

Host cell penetration of *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun., 3, 250-255.

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

Les polysaccharides associés à la surface cellulaire d'une grégarine (Protozoaire Parasite). II Caracterisation cytochimique et analyse biochimique des "ghosts". Bio. Cell. 35, 165-174.

PHILLIPS D.R. et GARTNER T.K., 1980.

Cell recognition systems in eukaryotic cells. In : Receptors and Recognition (Cuatrecasas, Pand Greaves, M.F., eds), 6 (B), 400-438.

PHILLIPS R.S., TRIGG P.I., SCOTT-FINNIGAN T.J. et BARTHOLEMEW R.K., 1972.

A substructure technique used for demonstrating anti-plasmodial activity in serum from some Gambians resident in an endemic malarious area. Parasitology 65, 525-535.

PORCHET E. et TORPIER G., 1977.

Etude du germe infectieux de *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii* par la technique du cryodécapage. Z. Parasitenkd. 54, 101-124.

PORCHET-HENNERE E. et NICOLAS G., 1983.

Are rhoptries of Coccidia really extrusomes ? J.U.R. (sous presse).

PORCHET-HENNERE E. et TORPIER G., 1983.

Relations entre *Toxoplasma* et sa cellule-hôte. Protistologica 19, (sous presse).

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

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

PORCHET E., VIVIER E., TORPIER G. et CARON H., 1980.

Multiplication et mode de pénétration de *Toxoplasma* : comparaison des données de la cryofracture et des coupes fines. J. Protozool., 27, 3.

PUCK T.T. et STEFFEN J., 1963.

Life cycle analysis of mammalian cells. A method for localizing metabolic events within the life cycle and its application to the action of colcemide and sublethal doses of X - irradiation. Biophys. J., 3, 379-397.

ROCKWELL S.C. et KALLMAN R.F., 1972.

Characteristics of a serially transplanted mouse mammary tumor and its tissue culture adapted derivative. J. Nat. Cancer Inst., 49, 735-749.

RUDZINSKA M.A., TRAGER W., LEWENGRUD S.J., GUBERT E., 1976.

An electron microscopic study of *Babesia microti* invading erythrocytes. Cell Tiss. Res., 169, 323-334.

RUSSELL D.G., 1982.

Host Cell invasion by apicomplexa : an expression of the parasite's contractile system ? (sous presse).

RUSSELL D.G. et SINDEN R.E., 1981.

The role of the cytoskeleton in the motility of Coccidian Sporozoites Cell. Sci., 50, 345-359.

SADAK A., 1981.

Besnoitia (Sporozoaire, Coccidiomorphe) est-il un bon matériel de recherche pour un laboratoire de Parasitologie ? Etude de la multiplication expérimentale de ce parasite, *in vivo*, et *in vitro*. Mémoire de D.E.A. Université des Sciences et Techniques de Lille.

SCHOLTYSECK E. et MEHLHORN H., 1970.

Ultrastructure study of characteristic organelles (paired organelles micronèmes, micropores) of sporozoa and related organisms. Z. Parasitenkd., 34, 97-127

SCHULMAN S., OPPENHEIM J.O. et VANDERBERG J.P., 1980.

Plasmodium berghei and *Plasmodium knowlesi* : serum binding to sporozoites. Exp. Parasitol., 49, 420-429.

SENAUD J., 1969 a.

Sur l'ultrastructure des kystes de *Besnoitia jellisoni* FRENKEL, 1953, Sporozoa, Toxoplasmae, chez la souris (*Mus musculus*), C.R. Acad. Sc. Paris, 268, 816-819.

SENAUD J., 1969 b.

Ultrastructure des formations kystiques de *Besnoitia jellisoni* (FRENKEL, 1953) Protozoaires, Toxoplasmae parasite de la souris (*Mus musculus*). Protistologica, 5, 413-430.

SENAUD J. et MEHLHORN H., 1974.

Etude ultrastructurale des Coccidies formant des kystes : *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis tenella*, *Besnoitia jellisoni* et *Frenkelia* sp. II. Mise en évidence de l'ADN et de l'ARN au niveau des ultrastructures. Ann. Stat. Biol. Besse-en-Chaudesse, 9, 111-156.

SENAUD J. et MEHLHORN H., 1978.

Besnoitia jellisoni FRENKEL 1953 (Sporozoa, Apicomplexa) en culture sur cellules de Rein de chien (MDCK). Etude au microscope électronique. Protistologica, 14, 5-14.

SENAUD J. et MEHLHORN H. et SCHOLTYSECK E., 1974.

Besnoitia jellisoni in macrophages and cysts from experimentally infected laboratory mice. J. Protozool., 21, 715-720.

SETHI K.K., PELSTER B., PIEKARSKI G., et BRANDIS H., 1973.

Multiplication of *Toxoplasma gondii* in enucleated L Cells. Nature New Biol., 243, 255-256.

SHARON N. et LIS H., 1972.

Lectins : cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science 177, 949-959.

SHARMA S.P. et DUBEY J.P., 1981.

Quantitative survival of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and Bradyzoites in Pepsin and in trypsin solutions. Am. J. Vet. Res., 42, 128-130.

SHEFFIELD H.G., 1966.

Electron microscope study of the proliferative form of *Besnoitia jellisoni*. J. Parasitol., 52, 583-594.

SHEFFIELD H.G., 1968.

Observation on the fine structure of the "cyst stage" of *Besnoitia jellisoni*. J. Prot., 15, 685-693.

SHEFFIELD H.G. et MELTON M.L., 1968.

The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol., 54, 209-226.

SHEFFIELD H.G., MELTON M.L. et NEVA F.A., 1976.

Development of *Hammondia hammondi* in cell cultures. Proc. Helminth. Soc. Wash., 43, 217-225.

SHIMIZU K., 1961 a.

Studies on toxoplasmosis : III. Observations on the tissue culture method of *Toxoplasma gondii* (In Japanese ; English summary Jpn. J. Vet., 23, 33-44.

SHIMIZU K., 1963.

Studies on toxoplasmosis : V. Complemental observations on the tissue culture method, especially the effect of the nutrient fluid upon the invasion and multiplication of the organism. Jpn. J. Vet. Res., 11, 1-11.

SINDEN R.E., 1981.

The Role of cell motility in host invasion by the apicomplexa. In Parasitological Topics., 242-247.

SMITH D.D., 1981.

The Sarcocystidae : *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Toxoplasma*, *Besnoitia Hammondia*, and *cystoisospora*. J. Protozool., 28, 262-266.

SOLURSH M., REITER R.S., AHRENS P.B. et VERTEL B., 1981.

Stage and position-related changes in chondrogenic response of chick embryonic wing mesenchyme to treatment with dibutyryl cyclic AMP. Develop. Biol., 83, 9-19.

SOURANDER P., LYCKE E. et LUND E., 1960.

Observations on living cells infected with *Toxoplasma gondii* Br. J. Exp. Pathol., 41, 176-178.

STEPHENS J.P., 1965.

Some physiological affects of Coccidiosis caused by *Eimeria necatrix* in the chicken J. Parasitol., 51, 331-335.

STROUT R.G., OUELLETTE C.A. et GANGI D.P., 1969 b.

Effect of inoculum size on development of *Eimeria tenella* in cell cultures. J. Parasitol., 55, 406-411.

TAKEUCHI T., 1977.

Ultrastructural study on the mechanism of entry into host cells in *Toxoplasma gonulii*. Jap. J. of Parasitol. 26, 75-85.

TAMM I., KIKUCHI T. et MURPHY J.S., 1982.

Serum enhance the cycling and survival of HeLa cells treated with 5, 6 - dichloro - 1-B-D - ribofuranosulbenzimidazole. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79, 2569-2573.

TANABE L., KIMATA I. et TAKADA S., 1980.

Penetration of chick embryo erythrocytes by *Toxoplasma gondii* tachyzoites in simplified incubation media. J. Parasitol., 66, 240-244.

TURNER M.B.F. et BOX E.D., 1970.

Cell culture of *Isospora* from the English sparrow, *Passer domesticus domesticus*. J. Parasitol., 56, 1218-1223.

URQUHART C., 1982.

The invasion of chick kidney cells by sporozoites of *Eimeria tenella* in the presence of serum and protease inhibitions (sous presse).

VANDERBERG J.P., 1974.

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

VAN DER HORST C.T.G. et KOUWENHOVEN B., 1973

Biochemical investigation with regard to infection and immunity of *Eimeria acervulina* in the fowl. Z. Parasitenkd., 42, 23-38.

VIVIER E., 1970.

Criteria of fine structure to be considered of taxonomy of Sporozoa. 2nd Internat. Congr. Parasitology Washington J. Parasitol., 56, 354.

VIVIER E., 1979.

Données nouvelles sur les sporozoaires. Cytologie-cycles systématiques. Bulletin de la société zoologique de France. 104, 345-381

VIVIER E. et PETITPREZ A., 1972.

Données ultrastructurales complémentaires morphologiques et cytochimiques sur *Toxoplasma gondii*. Protistologica 8, 199-221.

WALLACE G.D. et FRENKEL J.K., 1975.

Besnoitia species (Protozoa, Sporozoa, Toxoplasmatidae) : recognition of cyclic transmission by cats. Science 188, 369-371.

WANG C.C., 1982.

Biochemistry and physiology of Coccidia, P. LING ed. University Park Press, Baltimore, 167-228.

WEISS L., 1969.

The cell periphery. Int. Rev. Cytol., 26, 63-105.

WERK R. et BOMMER W., 1980.

Toxoplasma gondii : Membrane properties of active energy dependent invasion of host cells. Tropem. Parasit. 31, 417-420.

WHITMORE G.F. et TILL J.E., 1964.

Quantitation of cellular radiobiological responses. Ann. Rev. Nucl. Sci., 14, 347-374.

WHITMORE G.F., TILL J.E. et GULYAS S., 1967.

Radiation induced mitotic delay in L - cells Rad. Res. 30, 155-171.



RESUME

Besnoitia jellisoni est un Protozoaire parasite (Coccidie) dont une partie du cycle est encore inconnue. Voisine de *Toxoplasma*, dont l'intérêt médical est considérable, elle présente sur cette espèce deux avantages majeurs pour l'expérimentation : elle n'est pas pathogène pour l'homme, et ses divisions se font à un rythme plus lent et plus régulier.

Le stade étudié est le stade d'infection dans la cellule ; le mode de pénétration et le développement ont été suivis en culture cellulaire *in vitro*. Un des problèmes majeurs en Parasitologie et en Biologie cellulaire est de disposer d'organismes à développement synchrone et d'obtenir des résultats répétitifs.

L'influence de divers paramètres sur le taux de pénétration des parasites dans les cellules, ou qui permettent d'assurer à ce système de deux partenaires interdépendants la meilleure survie et un état d'équilibre autorisant une longue expérimentation a été testée ; des relations précises ont ainsi pu être décelées, qui permettent une standardisation des méthodes de culture.

Par deux approches complémentaires : les comptages sur préparations fixées et colorées dont les résultats étaient soumis aux tests statistiques et l'étude en cinématographie "time-lapse", méthode nouvelle pour ce matériel, des corrélations ont été mises en évidence : la susceptibilité d'une cellule à l'infection dépend de son âge (phase de son cycle), du fait qu'elle soit déjà pré-parasitée ou non ; la durée du cycle des cellules-hôtes est influencée par la présence du parasite dans la culture.

MOTS-CLEFS

SPOROZOAIRE - RELATION HOTE-PARASITE - *BESNOITIA JELLISONI* - CELLULE HELA
PENETRATION (TAUX DE) - CINEMA (TIME-LAPSE).