ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome 53

1978

N° 4

© Masson, Paris, 1978.

Annales de Parasitologie, (Paris)
1978, t. 53, n° 4, pp. 323 à 331.

Localisation ultra-structurale de l'activité oxydasique chez *Toxoplasma gondii* ⁽¹⁾

par P. STOEBCNER *, P. AMBROISE-THOMAS ** et S. HONNONS *

* Laboratoire de Microscopie électronique. Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Grenoble, B.P. 217 X, F 38043 Grenoble Cedex.

** Service de Parasitologie, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Grenoble, B.P. 217 X, F 38043 Grenoble Cedex.

Résumé.

Des toxoplasmes de souche RH ont été étudiés au microscope électronique à transmission et les activités suivantes ont été recherchées : peroxydase, cytochrome oxydase, phosphatase acide.

Une activité respiratoire cytochrome oxydasique a été observée. Elle est localisée au niveau des crêtes et de la membrane périphérique des mitochondries de *Toxoplasma gondii*.

Dans les conditions expérimentales données, aucune activité comparable n'est apparue au niveau des autres organites du parasite, ni dans les vacuoles des cellules-hôtes contenant des toxoplasmes vivants mais les organites de ces cellules-hôtes présentaient bien une activité oxydasique.

Summary.

Ultrastructural localization of the oxydasic activity in *Toxoplasma gondii*.

Toxoplasma belonging on the RH strain were studied under a transmission electron microscope. The activities looked for were : peroxidase, cytochrome oxydase and acid phosphatase.

(1) Travail réalisé grâce à une subvention du Conseil Scientifique des U.E.R. Médicales de Grenoble.

Accepté le 7 février 1978.

An oxydasic cytochrome respiratory activity was seen. It is localised on the crests and on the peripheral membrane of the mitochondria of *Toxoplasma gondii*.

In the given experimental conditions, no such activity appeared in the other intracytoplasmic organelles of the parasite, nor in the vacuoles of the host-cells containing living toxoplasma but the organelles of those host-cells presented an oxydasic activity.

Introduction

Toxoplasma gondii est un parasite intracellulaire obligatoire très répandu chez les homéothermes et notamment chez l'homme (Jacobs, 1967 ; Vivier, 1970). Son métabolisme est pourtant mal connu.

On lui connaît des activités oxydatives et glycolytiques (Capella et Kaufman, 1964 ; Fulton et Spooner, 1960 ; Lund et coll., 1966). Il contient des enzymes protéolytiques (Lund et coll., 1966). Une catalase active a été dosée par Fulton et Sponner (1960).

Mais la localisation intracytoplasmique des activités enzymatiques précédentes n'a pas été précisée. Seule la présence de phosphatases acides a été décrite au microscope électronique à transmission (Vivier et Petitprez, 1972).

Nous avons donc étudié la forme végétative (trophozoïte) du toxoplasme en nous intéressant plus particulièrement à la localisation intracytoplasmique des fonctions oxydative et phosphatasique acide.

Matériel et méthodes

Nous avons utilisé des toxoplasmes de souche RH qui provoquent chez la Souris blanche une toxoplasmose aiguë généralisée et la mort rapide. La souche est entretenue sur des souris Swiss par passage de liquide d'ascite tous les 3 ou 4 jours.

Nous avons examiné 17 liquides. Les parasites et les cellules inflammatoires ont été recueillis par centrifugation à 2 500 tours/mn pendant 5 mn.

1. *La recherche des peroxydases* a été faite aux pH 7,4 et 9. Le prélèvement a été incubé 60 mn à 37 °C dans les milieux de Graham-Karnovski (1966) et de Novikoff-Goldfischer (1969), ce dernier modifié en remplaçant le tampon propanediol par du véronal sodique.

L'incubation a eu lieu avant fixation et après fixation dans le glutaraldéhyde à 1,5 %, pH 7,4 (15 mn) ou le paraformaldéhyde à 4 %, pH 7,4 (12 heures).

Les contrôles ont été effectués en utilisant un milieu sans substrat (peroxyde d'hydrogène) et l'immersion des toxoplasmes pendant 5 mn dans le fixateur à 100 °C. Les inhibiteurs utilisés ont été l'azide de sodium (0,02 M en préincubation) et le cyanure de potassium (0,01 M ajouté au milieu d'incubation).

2. — *La recherche des cytochromes oxydases* a été faite au pH 7,4.

La suspension cellulaire a été incubée 30 mn à 37 °C dans le milieu de Seligman et coll. (1968).

L'incubation a eu lieu avant fixation et après fixation, dans le glutaraldéhyde à 1,5 % pH 7,4 (15 mn) ou le paraformaldéhyde à 4 % pH 7,4 (1 heure).

Les contrôles ont été effectués en utilisant un milieu sans substrat (cytochrome c) et l'immersion de 5 mn dans le fixateur bouillant. La réaction d'inhibition (0,01 M dans le milieu d'incubation) a été faite avec le cyanure de potassium.

3. — *Les phosphatases acides* ont été détectées à pH 5. Le prélèvement a été incubé 30 mn à 37 °C dans le milieu au plomb de Gomori (Gomori, 1946, modifié par Miller et Palade, 1964). L'incubation a eu lieu après 15 mn de fixation dans le glutaraldéhyde à 1,5 % pH 7,4 et avant fixation.

Un milieu sans substrat (sodium β glycérophosphate) a été utilisé comme réaction témoin.

4. — Dans tous les cas, les rinçages ont été faits par centrifugation 5 mn à 2 500 t/mn dans le tampon cacodylate de sodium à pH 7,4 sauf lors de la fixation par le paraformaldéhyde où nous avons utilisé le tampon phosphate de sodium à pH 7,4.

5. — Après fixation et incubation, nous avons effectué l'inclusion selon la méthode classique : postfixation osmiée, déshydratation alcoolique et inclusion dans l'épon (aidées par centrifugation douce).

Les blocs obtenus ont été coupés avec des couteaux de verre sur l'ultratorme Reichert Omu 3. Les coupes ultrafines ont été examinées au microscope électronique Philips EM 201, sans aucune contre-coloration au citrate de plomb ou à l'acétate d'uranyle.

Résultats

1) Recherche des peroxydases.

Les réactions de Graham-Karnovski et de Novikoff-Goldfischer ont été positives dans les toxoplasmes.

Les structures de type mitochondrial contenues dans les parasites intra ou extra-cellulaires étaient contrastées (sauf en cas de fixation dépassant 24 heures). Cette réaction positive était localisée aux crêtes mitochondriales et à la membrane périphérique (*pl. I, fig. 2, 3 et 4*). Les mitochondries des lymphocytes et des polynucléaires présentaient le même aspect.

Aucun marquage n'est jamais apparu dans les vacuoles parasitaires contenant des toxoplasmes vivants (*pl. II, fig. 5*).

Tous les clichés proviennent de coupes ultrafines non contre-colorées.

Planche I. Fig. 1. Mise en évidence des cytochromes oxydases. Marquage des structures mitochondriales ($\rightarrow$). Cas 36 XP 77 $\times$ 6 000.

Fig. 2. Activité peroxydasique à pH 7,4. Cas 36 XP 77 $\times$ 6 000

Fig. 3 et 4. Activité peroxydasique à pH 7,4. Noter le marquage mitochondrial exclusif ($\rightarrow$). Cas 36 XP 77 $\times$ 24 400.

Quel que soit le fixateur et le temps de fixation, les granulations des polynucléaires et les lysosomes des lymphocytes étaient toujours fortement contrastées.

Les réactions témoins nous ont donné des résultats dissemblables.

Après incubation dans le milieu sans substrat (peroxyde d'hydrogène), les mitochondries et les granulations étaient seulement faiblement colorées.

Après action des inhibiteurs comme après ébullition pendant 5 mn, aucune coloration mitochondriale ou granulaire n'était plus observée (*pl. II, fig. 6*).

2) Recherche des cytochromes oxydases.

Les mitochondries des parasites et des cellules inflammatoires présentaient un marquage au niveau des crêtes et de la membrane périphérique (*pl. I, fig. 1*).

L'absence de substrat (cytochrome c) dans le milieu d'incubation laissait apparaître une positivité très atténuée mais de même localisation que lors de la réaction complète.

Par contre, aucun marquage n'était observé après inhibition de la réaction ou après ébullition (*pl. II, fig. 7*).

3) Mise en évidence des phosphatases acides.

Nous avons observé une positivité légère et irrégulière des granules des polynucléaires.

Cependant aucun marquage significatif n'était présent dans les toxoplasmes.

Aucune différence n'existait entre les réactions effectuées avant ou après fixation.

Discussion

L'incubation dans les milieux de Graham-Karnovski et de Novikoff-Goldfischer révèle l'activité peroxydasique endogène (Breton Gorius, 1974). Elle existe au niveau des crêtes et de la membrane périphérique des structures mitochondriales de *Toxoplasma gondii* et nulle part ailleurs.

L'abolition de cette activité en présence de cyanure de potassium confirme sa nature oxydasique (Lund et coll., 1966). L'absence de réaction positive après ébullition préalable des toxoplasmes affirme le caractère enzymatique des marquages observés.

Le marquage apparaît aussi après incubation dans les milieux de Seligman et coll. (1968). Cela prouve qu'une partie au moins des oxydases révélées par les autres méthodes sont des cytochromes. Les structures mitochondriales ont donc bien une activité respiratoire. D'ailleurs, les mitochondries des cellules inflammatoires sont toutes également marquées lors des réactions complètes, notamment lorsque les organites entourent une vacuole parasitaire contenant des toxoplasmes vivants.

La faible réaction positive observée sur les témoins incubés dans des milieux dépourvus de substrat mais contenant du 3-3' diaminobenzidine (DAB), peut s'expliquer par la production endogène de peroxyde d'hydrogène qui oxyde le DAB et permet sa polymérisation au niveau des sites enzymatiques (Poux, 1974). La négativité complète des réactions effectuées en présence d'inhibiteurs confirme cette dernière hypothèse.

Nous n'avons pas trouvé aux pH utilisés et dans nos conditions d'expérimentation, la catalase mise en évidence par Fulton et Spooner (1960) dans les homogénats de parasites. En effet, aucune différence significative n'existe entre les réactions effectuées à pH 7,4 et à pH 9, de même qu'entre celles effectuées avant ou après fixation. Or la détection cytochimique des catalases ne serait possible qu'en milieu alcalin et après fixation (Breton Gcrius, 1974). Mais la spécificité de cette technique reste à démontrer.

Enfin l'activité phosphatasique acide du toxoplasme semble peu développée sinon absente. Nous n'avons pas pu confirmer les observations de Vivier et Petitprez (1972). Des précipités sont effectivement présents dans le cytoplasme des parasites. Certaines rhoptries et des parties limitées du complexe membranaire interne du toxoplasme pourraient présenter un marquage très léger. Mais la différence entre le témoin sans substrat et la réaction ne nous a pas semblé assez significative pour affirmer la présence de phosphatase acide dans les toxoplasmes (*pl. II, fig. 8*).

Il a d'ailleurs été constaté depuis longtemps (Barka et Anderson, 1962 ; Holt et Hicks, 1961) que la réaction des phosphatases acides par la méthode de Gomori devait être interprétée avec prudence étant donnée la fréquence des fausses réactions positives (précipités ou simple ombrage au plomb des structures cellulaires). Par contre une très faible quantité d'enzymes peut être présente dans le parasite sans être révélée par cette réaction relativement peu sensible aux faibles concentrations de phosphatase acide (Barka et Anderson, 1962 ; Holt et Hicks, 1961).

Cependant des précipités plus ou moins abondants sont visibles dans certains lysosomes et granulations de polynucléaires présents dans les liquides d'ascite étudiés. Mais aucune réaction positive n'est jamais observée dans les vacuoles parasitaires, ce qui corrobore l'étude de Jones (1974) sur la non fusion lysosomiale.

Planche II. *Fig. 5.* Toxoplasmes intracellulaires. Les mitochondries de la cellule hôte (→), comme celles des parasites, sont marquées. La vacuole parasitaire (X) ne contient aucun produit de réaction. Peroxydase à pH 7,4. Cas 36 XP 77 × 12 800.

Fig. 6. Toxoplasme témoin à pH 9, après ébullition. Absence de marquage.
Cas 52 XP 77 × 17 600.

Fig. 7. Toxoplasme témoin de la réaction cytochrome oxydasique. Absence de marquage après incubation dans le milieu avec inhibiteur. Cas 54 XP 77 × 17 600.

Fig. 8. Mise en évidence des phosphatases acides. Sur ce toxoplasme témoin, incubé dans un milieu sans substrat, le plomb précipite finement sur toutes les membranes.
Cas 35 XP 77 × 17 600.

Conclusion

Il existe une activité respiratoire cytochrome oxydasique au niveau des crêtes et de la membrane périphérique des mitochondries de *Toxoplasma gondii*. Mais aucune activité oxydasique et phosphatasique acide n'a été visualisée dans nos conditions expérimentales au niveau des autres structures intracytoplasmiques de ce parasite. Avant de conclure à une absence de ces enzymes chez le toxoplasme, il faudra compléter cette étude en faisant varier les différents paramètres du milieu de Graham et Karnovski (pH, concentrations en DAB notamment) et en utilisant d'autres milieux pour la recherche des phosphatases acides.

Les vacuoles des cellules-hôtes contenant des toxoplasmes vivants sont dépourvues d'activité phosphatasique acide et oxydasique.

Bibliographie

- Barka T. and Anderson P. J. (1962): Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.*, 10, 741-753.
- Breton Gorius J. (1974): Mise en évidence des activités peroxydasiques endogènes des cellules animales. *J. Microsc.*, 21, 275-282.
- Capella J. A. and Kaufman H. E. (1964): Enzyme histochemistry of *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 13, 664-666.
- Fulton J. D. and Spooner D. F. (1960): Metabolic studies of *Toxoplasma gondii*. *Exp. Parasitol.*, 9, 293-301.
- Gomori G. (1946): The study of enzymes in tissue sections. *Am. J. Clin. Pathol.*, 16, 347-352.
- Graham R. C. and Karnovsky M. J. (1966): The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14, 291-302.
- Holt S. J. and Hicks R. M. (1961): The localization of acid phosphatase in rat liver cells as revealed by combined cytochemical staining and electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11, 46-66.
- Jacobs L. (1967): *Toxoplasma* and toxoplasmosis. Dawes B. éd.: advances in parasitology. Academic Press, London, 5, 1-45.
- Jones T. C. (1974): Macrophages and intracellular parasitism. *J. reticulo-endothel. Soc.*, 15, 439-450.
- Lund E., Hansson H. A., Lycke E., Sourander P. (1966): Enzymatic activities of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 68, 59-67.
- Miller F. and Palade G. E. (1964): Lytic activities in renal protein absorption droplets. *J. Cell. Biol.*, 23, 519-552.
- Novikoff A. and Goldfischer S. (1969): Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *J. Histochem. Cytochem.*, 17, 675-680.
- Poux N. (1974): Localisation des activités phosphatasiques acides et peroxydasiques au niveau des ultrastructures végétales. *J. Microsc.*, 21, 265-274.

- Seligman A.M., Karnovsky M.J., Wasserkrug H.L., Hanker J.S. (1968): Non droplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxydase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidin (DAB). *J. Cell. Biol.*, 38, 1-14.
- Vivier E. et Petitprez A. (1969): Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus-fils chez *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Biol.*, 43, 329-342.
- Vivier E. (1970): Observations nouvelles sur la reproduction asexuée de *Toxoplasma gondii* et considérations sur la notion d'endogénèse. *C.R. Acad. Sci. Sér. D*, 271, 2123-2126.
- Vivier E. et Petitprez A. (1972): Données ultrastructurales complémentaires morphologiques et cytochimiques sur *Toxoplasma gondii*. *Protistologica*, 8, 199-221.
-