ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome 60

1985

N° 2

○ Masson, Paris 1985.

Ann. Parasitol. Hum. Comp.,
1985, t. 60, n° 2, pp. 101-110.

MÉMOIRES ORIGINAUX

ORIGINE DES MEMBRANES DE LA PAROI CHEZ *TOXOPLASMA*¹

E. PORCHET-HENNERE*, E. VIVIER* et G. TORPIER**

RÉSUMÉ. L'origine et l'évolution des membranes constituant la paroi de *Toxoplasma* ont pu être suivies au cours de l'endogenèse par l'étude de coupes fines et de répliques de cryofracture. Le complexe membranaire interne provient de la différenciation de vésicules ergastoplasmiques au contact des microtubules du cytosquelette en formation ; il possède aussitôt sa structure définitive. Il peut aussi dériver du complexe homologue de la cellule-mère. Lors de l'émergence hors de la cellule-mère, les individus-fils acquièrent leur plasmalemmes aux dépens de celui de cette cellule. Le plasmalemmes montre une constante continuité. A la fin de l'endogenèse, la croissance du complexe membranaire interne des parasites-fils s'interrompt, créant un espace circulaire qui subsistera comme une « cicatrice » à la partie postérieure du *Toxoplasme* « adulte ». A cet endroit une jonction rend solidaires le complexe membranaire interne et le plasmalemmes, jonction traquée après cryofracture du plasmalemmes par un anneau de particules intramembranaires.

Origin of membranes of *Toxoplasma*

SUMMARY. The origin and evolution of the three-membraned pellicle of *Toxoplasma* during endogenesis were studied by mean of electron microscopy, on ultrathin sections and freeze fracture replicas. The inner membran complex is built by the differentiation of reticulum vesicles close to the forming microtubules and still have its definitive structure. It may also derive from the mother-cell complex.

During the emergence out of the mother-cell, the daughter-parasites acquire their outer membran by expansion of those of the mother-cell. The outer membran is always continuous.

At the end of endogenesis, growing of internal membran complex stops, making a circular break, which will constitute a persisting scar at the posterior end. At this level a junction occurs between the outer membran and the internal complex, related to a ring of intramembranous particles seen after freeze fracture in the outer membran.

* Laboratoire de Protistologie, SN 3, Université des Sciences de Lille I, F 59655 Villeneuve-d'Ascq Cedex.

** Centre d'Immunologie et Biologie Parasitaire, Unité INSERM 124, Institut Pasteur, 15, rue Camille-Guérin, F 59019 Lille Cedex.

1. Avec la précieuse collaboration de H. Caron pour l'entretien des parasites, et de A. Jacob pour la préparation des répliques de cryofracture.

Accepté le 22 juin 1984.

Toxoplasma effectue des divisions rapides selon le mode asexué, par bourgeonnement de deux individus-fils à l'intérieur d'un parasite (Goldman *et al.*, 1958). Les modalités de ces phénomènes ont été précisées par des investigations en microscopie électronique (Senaud, 1967, Sheffield et Melton, 1968). Ce type de reproduction est maintenant généralement désigné par le terme d'« endogenèse » (Vivier, 1970), celui d'« exogenèse » (Porchet-Henneré, 1972) désignant la formation de nombreux mérozoïtes à la périphérie d'une cellule-mère spécialisée et structuralement dé-différenciée (schizonte). Dans l'endogenèse une cellule-mère non dé-différenciée donne naissance, dans la plupart des cas, à 2 endozoïtes semblables à elle-même et élaborés au sein de son cytoplasme. Un des points importants dans la genèse des individus-fils, que ce soit dans l'exo- ou dans l'endogenèse, est l'origine des membranes de la paroi. La paroi du germe infectieux, identique chez toutes les Coccidies, est en effet complexe. Les coupes fines montrent que sous le plasmalemme existent deux autres membranes, le plus souvent étroitement appliquées, ou « complexe membranaire interne » (Vivier et Petitprez, 1968).

Grâce à l'emploi des techniques de cryofracture, la structure intime de cette paroi est maintenant élucidée (*fig. 1*) (Porchet et Torpier, 1977), en particulier chez *Toxoplasma* (Dubremetz et Torpier, 1978). Le plasmalemme est continu ; par contre le complexe membranaire interne montre deux interruptions opposées, circulaires, aux extrémités antérieure (*fig. 2*) et postérieure (*fig. 9*). Les membranes moyenne et interne sont en fait les parois de larges vésicules aplaties, jointives, ou « plaques », disposées en files longitudinales dont la largeur s'amenuise vers la partie postérieure. Vers l'avant, les files de plaques se terminent au niveau d'une vésicule unique en tronc de cône, la « cape » apicale (Dubremetz et Torpier, 1978). Les limites des vésicules peuvent être révélées en microscopie photonique par imprégnation argentique (Porchet et Torpier, 1977). Il est maintenant admis que le plasmalemme des parasites-fils chez les Coccidies dérive, quel que soit le mode de formation de celui-ci, du plasmalemme de la cellule-mère, avec lequel il est en continuité tout au long de son émergence finale. Les données sont moins précises en ce qui concerne le complexe membranaire interne et c'est pourquoi nous avons réalisé une étude comparative de coupes fines et de préparations de cryofracture des *Toxoplasma* afin de définir l'origine des membranes au cours de l'endogenèse.

Matériel et techniques

Les *Toxoplasma*, souche RH, proviennent de l'élevage de souris parasitées de l'Institut Pasteur de Lille.

Pour la microscopie électronique dite « conventionnelle », les parasites sont fixés dans la glutaraldéhyde à 2 % puis le tétroxyde d'osmium à 1 % en tampon Cacodylate.

La préparation des répliques de cryofracture est la même que celle employée précédemment (Porchet et Torpier, 1977).

La nomenclature des plans de fracture est celle proposée par Branton *et al.* (1975), et conforme aux schémas établis antérieurement pour la paroi des Coccidies (Dubremetz et Torpier, 1978 ; Porchet *et al.*, 1982), et rappelée dans la figure 1.

FIG. 1. — Rappel de la structure de la paroi du germe infectieux des Coccidies, constituée d'une membrane externe (me) et de vésicules aplaties sous-jacentes, formant un complexe membranaire interne (cm). Les faces des vésicules sont, en coupe, les membranes moyennes (mm) et interne (mi). Chaque vésicule recouvre généralement 2 microtubules longitudinaux (mt). Les plans de fractures possibles sont symbolisés par des fenêtres imaginaires dans chaque membrane. Un plan de fracture exposera successivement Pe de la membrane externe, et Em et Pi des deux membranes internes. Sur le plan de fracture complémentaire apparaîtront Ee, Pm et Ei (d'après Porchet *et al.*, 1982).

Résultats et discussion

Structure du complexe membranaire interne au cours de l'endogenèse

L'observation de répliques de cryofracture obtenues dans des *Toxoplasmes* en cours d'endogenèse permet de constater qu'au cours de celle-ci, le complexe membranaire interne possède déjà sa structure définitive avec une cape apicale ouverte vers l'avant (*fig. 2 et 3*), et les files de plaques qui lui font suite (*fig. 2*). La disposition et l'abondance relative des particules intramembranaires (P.I.M.) sont les mêmes que celles qui caractérisent les plans de fracture de l'individu adulte (*fig. 1*). Ainsi le plan E de la membrane moyenne (Em) est-il très pauvre en P.I.M. (*fig. 2*). Dans le plan de fracture P de la membrane interne (Pi) sont visibles, dès ce stade, des alignements longitudinaux réguliers de P.I.M. (*fig. 6*). Parmi ceux-ci, certains sont formés de 2 rangées de particules accolées (*fig. 6*). Les travaux antérieurs ont montré que le nombre de ces doubles rangées correspond à celui des microtubules du cyto-squelette sous-jacent (*fig. 1*) et traduisent vraisemblablement des relations précises avec ces derniers (Porchet et Torpier, 1977 ; Dubremetz et Torpier, 1978 ; Porchet *et al.*, 1982). Les alignements doubles sont particulièrement remarquables, plus écartés et parfaitement parallèles, dans les plans de fracture de la vésicule qui constitue la cape apicale ; les alignements existent aussi bien dans le plan Pi de la membrane interne, directement superposé aux microtubules, que dans le plan Pm de la membrane

FIG. 2. — *Toxoplasma gondii* : endogenèse. Cryofracture montrant la partie antérieure d'un endozoïte Z (en haut à gauche) proche du noyau NM (en haut à droite) de la cellule-mère (M) ; la cellule-fille est fracturée dans sa membrane moyenne dont la face E est exposée (Em) : la cape antérieure (ca) avec son ouverture apicale (flèche) est bien visible ainsi que les plaques (P) qui lui font suite postérieurement. Noter la continuité entre une de ces plaques et une membrane cytoplasmique (flèche courbe). cmM : complexe membranaire interne de la cellule-mère ($\times 60\ 000$).

moyenne qui est en continuité avec Pi mais situé sur la face symétrique de la vésicule membranaire (fig. 1). La figure 3 montre une fracture dans un *Toxoplasme* en cours d'endogenèse, fracture exposant le plan Pm au niveau de la cape apicale d'un endozoïte en formation. Les doubles lignes parallèles de P.I.M. sont déjà bien identifiables. Il est donc clair que le complexe membranaire interne s'élabore pendant l'endogenèse avec sa structure définitive.

Origine des membranes du complexe interne

La figure 4 montre sur une coupe fine la formation des vésicules du complexe membranaire interne. Celles-ci sont des éléments membranaires discontinus qui

viennent s'apposer chacun sur 2 microtubules. En fait *Toxoplasma* montre rarement cette régularité de 1 vésicule pour 2 microtubules qui semble être la règle chez les autres Coccidies (fig. 1), car on trouve souvent 4 microtubules. ou plus, sous une même vésicule.

L'apposition d'éléments membranaires sur 2 microtubules est particulièrement spectaculaire au cours de l'exogénèse chez *Eimeria* (Dubremetz, 1976). On peut ici observer sur la figure 4 que chaque élément à double membrane se différencie juste au-dessus des microtubules en un système plus net, plus rectiligne et plus dense de deux membranes solidaires. Il est probable qu'à ce stade les membranes contractent des relations d'ancrage avec les microtubules, relations qui ont un rapport avec les doubles alignements de particules observés en cryofracture (fig. 3 et 6).

Dès 1970, Prensier observait que le complexe membranaire interne des sporozoïtes de Grégarines dérive du réticulum endoplasmique de la cellule-mère (spore). Cette origine paraît indiscutable sur la figure 5.

Une telle continuité apparaît aussi parfois, au hasard des fractures de *Toxoplasma*, telle celle de l'endozoïte de la figure 2 (où elle est soulignée par une flèche). Cependant, au cours de la multiplication de *Toxoplasma*, la possibilité de la formation du complexe membranaire interne des cellules-filles, à partir d'émanations du complexe homologue de la cellule-mère, a aussi été envisagée (Vivier et Petitprez, 1968), d'après des études ultrastructurales. Ce phénomène est illustré ici par la figure 7.

Une telle relation a été observée sur des fractures : ainsi le complexe membranaire interne de l'endozoïte de la figure 6 est-il indéniablement en continuité avec celui de la cellule-mère.

Il est donc possible que le complexe membranaire interne des endozoïtes de *Toxoplasma* ait pour origine soit des membranes cytoplasmiques qui subissent une différenciation au contact des microtubules en formation, soit le complexe homologue de la cellule-mère, ainsi que nos études préliminaires l'avaient laissé entendre (Porchet *et al.*, 1980).

L'« induction » dans l'organitogenèse

Il convient de rappeler que chez les Coccidies, la genèse du germe infectieux (que ce soit un mérozoïte, un sporozoïte ou un endozoïte), est centrée sur un endroit précis constitué par l'ensemble centrocône-centrioles, aux deux pôles du noyau en fin de division (voir par exemple Dubremetz, 1976). Dans cette zone apparaissent tous les organites de la partie antérieure du futur parasite : conoïde, anneau d'insertion des microtubules, et microtubules sur lesquels s'organisent les membranes internes (fig. 5). Ultérieurement, au cours de la croissance se différencieront les structures internes. Dans l'endogénèse cette zone est tout à fait intracytoplasmique. Dans l'exogénèse, les nombreux noyaux sont situés en périphérie du schizonte et cette zone est donc directement sous le plasmalemmme de la cellule-mère. Nous avons avancé une théorie selon laquelle la zone centrée autour de l'ensemble centrocône-centrioles serait une zone d'« induction » de l'organitogenèse (voir schéma 47 dans Porchet-

Henneré, 1977). Là se produirait en particulier la différenciation de membranes « banales » en complexe membranaire. Si la zone d'induction est par hasard située contre la paroi du Toxoplasme-mère, le complexe membranaire de celle-ci pourrait ainsi être localement dérivé et participer à la construction de la paroi du germe-fils.

Interruption de la croissance du complexe interne

A la partie postérieure de *Toxoplasma* (et des autres Coccidies) existe une interruption circulaire du complexe membranaire interne (fig. 9), où se « terminent » les files de plaques vésiculaires. Cette interruption est la « cicatrice » laissée par le détachement du parasite, à la fin de l'endogenèse. Ce détachement est visible sur la figure 8 sur laquelle deux parasites frères se séparent. Le sort du reliquat de la cellule-mère n'est pas vraiment élucidé chez *Toxoplasma*. Ce reliquat est souvent très réduit. Il est connu qu'après plusieurs divisions de *Toxoplasma* (ce qui est facile à observer dans des cellules en culture parasitées) la séparation des endozoïtes ne se fait plus aussi régulièrement ; on observe alors des « rosettes » dans lesquelles de nombreux parasites sont plus ou moins attachés à une petite masse cytoplasmique. La figure 10 montre ainsi trois parasites en voie de détachement ; on constate que dans sa partie terminale le complexe membranaire est doublé par un épaissement dense qui vient s'attacher au plasmalemm. Cette solidarité du plasmalemm avec le complexe membranaire interne se traduit par la présence d'un anneau de particules intramembranaires, de taille plus importante que les autres, dans le plan P de la membrane externe (Pe) (fig. 12). Cet anneau persiste après isolement des parasites (fig. 11).

Origine du plasmalemm

Le plasmalemm des endozoïtes est acquis, lors de leur émergence hors de la cellule-mère, par la croissance du plasmalemm de celle-ci, qui forme tout au long des phénomènes une enveloppe parfaitement continue (fig. 10 et 12). Ceci est général chez toutes les espèces de Coccidies, quelque soit leur mode de reproduction.

-
- FIG. 3. — Fracture dans un parasite (M) en cours d'endogenèse. La partie apicale de l'endozoïte (Z) montre, dans la face P de sa membrane moyenne (Pm), des doubles rangées longitudinales de P.I.M. (têtes de flèches) correspondant aux microtubules sous-jacents, comme chez le parasite mature ($\times 40\ 000$).
- FIG. 4. — Apparition des vésicules du futur complexe membranaire interne sous forme d'éléments membranaires (têtes de flèches), qui viennent s'apposer aux microtubules (mt) lors de l'endogenèse. cc : centrocone ($\times 45\ 000$).
- FIG. 6. — Coupe fine d'un Toxoplasme au début de l'endogenèse. Un seul endozoïte en formation est visible sur la préparation ; le cône antérieur est déjà élaboré au-dessus des centrioles (C) et du centrocone (cc) de l'appareil nucléaire (NM) de la cellule-mère. Une continuité (flèches courbes) existe entre les membranes du complexe membranaire interne (cm) du futur endozoïte et le réticulum endoplasmique (RE). Co : conoïde ($\times 60\ 000$).
- FIG. 6. — Fracture dans un parasite (M) en cours d'endogenèse. Ici le complexe membranaire interne de la cellule-fille (Z), fracturé dans les plans Em et Pi, est en continuité (flèches courbes) avec son homologue de la cellule-mère (M) ($\times 36\ 000$).
- FIG. 7. — Une continuité entre le complexe membranaire interne maternel et celui de l'endozoïte Z est ici visible sur une coupe fine (flèches) (me : plasmalemm de la cellule-mère) ($\times 70\ 000$).

FIG. 8. — Fracture, dans les plans de leur complexe membranaire interne, de deux endozoïtes frères sur le point de se séparer. Au niveau de cette séparation, les « plaques » s'interrompent selon une zone circulaire (têtes de flèches) ($\times 45\ 000$).

Lors de l'exogénèse la membrane du schizonte se soulève en même temps que croissent les protubérances périphériques qui deviendront les mérozoïtes. Parfois les mérozoïtes acquièrent leur plasmalemme à partir de membranes de « vacuoles » internes : c'est le cas chez *Eimeria tenella* (Hoppe, 1974) ou *Globidium* (Porchet-Henneré, 1972), *Eimeria iroquoïna* (Patterson et Dessser, 1981) ; dans les deux premiers cas une étude approfondie des stades antérieurs a permis d'établir que ces vacuoles sont en fait des éléments du plasmalemme internalisés précocement dans des invaginations qui ont pour conséquence une augmentation considérable de la surface bourgeonnante du schizonte. Dessser (communication personnelle), quoiqu'il la juge peu probable, n'exclut pas une telle possibilité chez *Eimeria iroquoïna*.

Conclusion

L'étude comparative de coupes fines et de répliques de cryofracture permet de préciser les modalités de la formation du complexe membranaire interne de *Toxoplasma* au cours de l'endogénèse, la façon dont se séparent les parasites et les répercussions de ces phénomènes sur la structure de la paroi dans la partie postérieure. Il semble donc que, chez les Coccidies, la pérennité du plasmalemme de génération en

FIG. 9. — La zone circulaire témoignant du phénomène montré sur la fig. 8 persiste à la partie postérieure des Toxoplasmes libres. Les plaques du complexe membranaire convergent en un assemblage hélicoïdal vers la « cicatrice » de séparation (flèches) ($\times 50\ 000$).

FIG. 10. — Coupe dans la partie postérieure de trois endozoïtes en voie de séparation après des divisions multiples. Le même plasmalemme recouvre toutes les cellules mais les complexes membranaires internes des zoïtes, doublés par un épaississement dans leur tracé terminal (flèches grasses) s'arrêtent à l'extrémité des cellules filles où ils sont reliés à la membrane externe (flèches fines) ($\times 30\ 000$).

FIG. 11. — Une fracture dans le Plan Pe de la membrane externe permet d'observer (flèche) un arrangement particulier circulaire de P.I.M. à l'extrémité postérieure de zoïtes libres ($\times 30\ 000$).

FIG. 12. — A l'extrémité postérieure de ces 2 endozoïtes presque séparés du reliquat maternel, une même disposition circulaire de P.I.M. (flèches), sensiblement plus grandes que les autres particules, est nettement visible. Ces particules sont vraisemblablement en relation avec la jonction entre les membranes, visible sur la figure 10 ($\times 35\ 000$).

génération soit un fait pratiquement établi. Les deux membranes internes du germe infectieux au contraire sont des cytomembranes hautement différenciées au cours de l'organitogenèse, au contact des microtubules du cytosquelette.

BIBLIOGRAPHIE

- BRANTON D., BULLIVANT S., GILULA N. B., KARNORSKY M. J., MOOR H., MÜHLETHALER K., NORTHCOATE D. H., PACKER L., SATIR B., SATIR P., STAEHELIN L. A., STEERE R. L., WEINSTEIN R. S. : Freeze etching nomenclature. *Science*, 1975, 190, 54-56.
- DUBREMETZ J. F. : La genèse des mérozoïtes chez la coccidie *Eimeria necatrix*. Étude ultrastructurale. *J. Protozool.*, 1976, 22, 71-84.
- DUBREMETZ J. F., TORPIER G. : Freeze fracture of an eimerian sporozoïte (Protozoa, Coccidia). *J. Ultrastruct. Res.*, 1978, 64, 94-109.
- GOLDMAN M., CARVER R. K., SULZER A. J. : Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. *J. Parasitol.*, 1958, 44, 161-171.
- HOPPE G. : La formation des mérozoïtes chez la coccidie *Eimeira tenella* (Railliet et Lucet, 1891). Étude au microscope électronique. *Protistologica*, 1975, 10, 185-205.
- PATERSON W. B., DESSER S. S. : An ultrastructural study of *Eimeria iroquoiana* Molnar et Fernando, 1974, in Experimentally Infected Fathead Minnows (*Pimephales promelas*, Cyprinidae) 3. Merogony. *J. Protozool.*, 1981, 28, 302-308.
- PORCHET-HENNERÉ E. : Considérations générales sur les processus de schizogonie chez les Sporozoaires, à la lumière des données de la microscopie électronique. *Ann. Biol.*, 1972, 10, 413-426.
- PORCHET-HENNERÉ E. : Étude ultrastructurale de la schizogonie chez la coccidie *Globidium gilruthi*. *Protistologica*, 1977, 13, 31-52.
- PORCHET E., TORPIER G. : Étude du germe infectieux de *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii* par la technique du cryodécapage. *Z. Parasitenk.*, 1977, 54, 101-124.
- PORCHET E., TORPIER G., RICHARD A. : Étude après cryofracture du mérozoïte de la coccidie *Aggregata eberthi*. *Z. Parasitenk.*, 1982, 66, 257-271.
- PORCHET HENNERÉ E., VIVIER E., TORPIER G., CARON H. : Multiplication et mode de pénétration de *Toxoplasma* : comparaison des données de la cryofracture et des coupes fines. *J. Protozool.*, 1980, 27, 88 A.
- PRENSIER G. : Premières observations ultrastructurales sur la formation des sporozoïtes à partir du sporoblaste chez *Diplotaxia hatti*. *C.R. Acad. Sc., Paris*, 1970, 270, 100-103.
- ROBERTS W. L., HAMMOND D. M., ANDERSON L. C., SPEER C. A. : Ultrastructural study of schizogony in *Eimeria callospermophili*. *J. Protozool.*, 1970, 17, 584-592.
- SENAUD J. : Contribution à l'étude des Sarcosporidies et des Toxoplasmes (Toxoplasmea). *Protistologica*, 1967, 3, 169-232.
- SHEFFIELD H. G., MELTON M. L. : The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, 1968, 54, 209-225.
- VIVIER E. : Observations nouvelles sur la reproduction asexuée de *Toxoplasma gondii* et considérations sur la notion d'endogenèse. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1970, 271, 2123-2126.
- VIVIER E., PETITPREZ A. : Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus-fils chez *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Biol.*, 1968, 43, 329-342.