

LE CHONDRIOME DE *TRYPANOSOMA MEGA*

Observations *in Vivo* et par la Réaction Cytochimique de la NADH-Diaphorase

M. STEINERT. Laboratoire de Parasitologie Expérimentale, Institut pour la Recherche Scientifique en Afrique Centrale, Elisabethville, Katanga, République du Congo

Un organite d'ultrastructure typiquement mitochondriale a été récemment observé chez les trypanosomes, en étroite association avec le kinétonucléus (3, 6-8, 17). Cette même association a été trouvée chez un bodonide (14). Bien que de forme assez variable, cet organite est généralement allongé et a souvent été décrit sous l'aspect d'un long tube ou canal (6, 7) sinueux, allant du kinétonucléus à chacune des deux extrémités de la cellule (8, 15, 19, 20). Cet aspect particulier ne correspond pas du tout aux descriptions plus anciennes des mitochondries chez les trypanosomes, généralement vues sur les frottis colorés par les méthodes mitochondriales comme des grains ou des bâtonnets dispersés dans le cytoplasme. Guha *et al.* (4) ainsi que Chakravarty *et al.* (2) ont également observé de petites mitochondries arrondies dans des trypanosomes soumis à certains tests cytochimiques des déshydrogénases. Ces auteurs n'observent pas l'association de ces mitochondries avec le kinétonucléus.

Cette absence de corrélation entre l'examen au microscope électronique et l'observation optique et cytochimique du chondriome nous a incité à réexaminer le problème sur *Trypanosoma mega*. Nous avons utilisé la réaction cytochimique de la NADH-diaphorase¹ qui, selon Novikoff (11),

serait la plus caractéristique des mitochondries, bien que l'ergastoplasme puisse aussi, dans certaines cellules, montrer une réaction positive. Les résultats d'essais préliminaires sur *T. mega* avaient déjà fait l'objet d'une brève mention (17). Nous avons depuis apporté une légère modification à la méthode et nous nous sommes surtout attachés à comparer minutieusement des trypanosomes fixés et colorés avec d'autres, vivants, examinés en contraste de phase. Nous avons aussi tiré parti d'une observation fortuite: les trypanosomes cultivés dans un milieu vieilli, c'est à dire conservé stérile à la température du laboratoire pendant quelques semaines, ont des mitochondries particulièrement faciles à voir dans un cytoplasme plus clair, moins chargé d'inclusions lipidiques.

MÉTHODES

Trypanosoma mega est cultivé, sous sa forme crithidia, dans un milieu au bactotryptose (16) à pH 7.4, normal ou vieilli par un séjour d'environ deux mois à la température du laboratoire. Les frottis sont séchés à l'air, fixés pendant 2 à 10 minutes à l'acétone glacé puis rincés à l'eau distillée. Les frottis sont recouverts du milieu d'incubation au Nitro-BT (9, 18) avec ou sans substrat, d'après la méthode de Becker *et al.* (1). Ils sont incubés en chambre humide à 24°C pendant 20 à 80 minutes. Le Nitro-BT est un produit de Nu-

chlorure de 2,2'-di-p-nitrophényl-5,5' - diphényl-3,3' - (3,5' - diméthoxy - 4,4' - diphénylene) ditétrazolium.

¹ Abréviations: NADH, dihydronicotinamide adénine dinucléotide; Nitro-BT, Nitro blue tetrazolium,

tritional Biochemicals Corporation (Cleveland, Ohio), le NADH est de Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri), (DPNH, Sigma Grade).

Les examens et les micrographies en contraste de phase sont réalisés avec une optique Zeiss-Winkel, objectif 100Ph et oculaire compensateur 10 X. Les trypanosomes vivants sont immobilisés par écrasement entre lame et lamelle, jusqu'à ce que seule l'extrémité libre du flagelle puisse encore se mouvoir.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La réaction cytochimique de la NADH-tétrazolium réductase colore intensément un appareil de structure continue, constitué d'éléments larges ou allongés reliés entre eux, et qui apparaît le plus souvent en contact étroit avec le kinétonucléus. Ces caractères extérieurs sont ceux du chondriome des trypanosomes tel qu'il ressort des micrographies électroniques de la même espèce (17, et observations non publiées de l'auteur) ou d'autres espèces (3, 8, 14, 20): il est peu douteux qu'il s'agisse du même organite, le microscope électronique ne montrant en effet aucune structure pouvant prêter à confusion.

La fig. 1 montre les formes les plus habituelles de ce chondriome chez la crithidia cultivée en milieu normal: longues mitochondries sinueuses allant d'une extrémité à l'autre de la cellule (Fig. 1, a), réseau d'éléments étroits, anastomosés, complété de quelques mitochondries plus volumineuses (Fig. 1, b). La membrane du kinétonucléus se colore aussi au diformazan. Les figs. 1 et 7 montrent clairement cette réaction qui met en évidence l'association kinétonucléus-mitochondries. Rappelons que le microscope électronique montre cet ensemble enveloppé d'une double membrane commune (17). Le corps du kinétonucléus ne donne pas de réaction positive de la NADH-diphosphatase.

La certitude qu'il ne s'agit pas d'artéfacts nous vient de l'observation parallèle d'individus vivants. En contraste de phase, ce chondriome se voit en effet très bien pour autant qu'il ne soit pas masqué par les abondantes inclusions lipidiques que contiennent généralement les crithidias (Figs. 2, 4 à 6, et 8). La fig. 2 montre des crithidias dont le chondriome affecte la forme d'un réseau (comparer avec la Fig. 1, b) tandis que la fig. 8 montre le cas particulièrement favorable des crithidias cultivées dans un milieu vieilli: ces crithidias sont totalement dépourvues de globules de graisse et leur chondriome est visible dans toute son étendue et se montre bien tel qu'on

le voit dans le frotti fixé et coloré de la Fig. 6. Le kinétonucléus est peu apparent en contraste de phase, à moins d'être coloré vitalement au Vert Janus B: dans ce cas on l'observe au contact du chondriome, soit accolé à l'un des éléments dilatés de ce dernier, soit prolongé vers l'arrière ou latéralement (Figs. 4 et 5) par une ou plusieurs mitochondries étroites et allongées. Cet aspect correspond exactement aux images que donne la réaction cytochimique (Figs. 1, d, et 3).

Cette parfaite similitude des structures vues en contraste de phase et colorées par le diformazan (comparer surtout les Figs. 7 et 8) montre les qualités de la méthode au Nitro-BT appliquée à des frottis fixés à l'acétone. Notons que nous avons obtenu des résultats concordants après fixation au formol-Ca⁺⁺ (12), mais les cellules se contractent plus dans ce fixateur et la coloration du chondriome est moins forte. De plus, de très nombreux grains denses de diformazan, dispersés dans le cytoplasme, obscurcissent la préparation: ces grains sont sans aucun doute des artéfacts semblables à ceux qui ont été décrits à l'intérieur ou à la surface de globules de graisse (11, 14). Hitzeman (5) a déjà attiré l'attention sur les avantages de la fixation à l'acétone préalable à l'utilisation cytochimique des sels de tétrazolium.

En conclusion, il nous apparaît comme certain que l'organite lié au kinétonucléus que révèle le microscope électronique dans des coupes ultra-minces de trypanosomes, organite entouré d'une double membrane et contenant des membranes internes ou crêtes, est identique au chondriome tel que nous l'avons observé en contraste de phase et coloré par la réaction de la NADH-tétrazolium réductase. L'examen de cet organe dans diverses cultures nous a montré que sa forme varie non seulement d'une cellule à l'autre mais surtout selon le type morphologique (crithidia courte ou longue, forme sanguicole) et en fonction du milieu. Ces variations seront décrites ultérieurement.

Reçu le 21 Juin 1963.

BIBLIOGRAPHIE

1. BECKER, N. H., GOLDFISHER, S., SHIN, W. Y., et NOVIKOFF, A. B., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1960, 8, 649.
2. CHAKRAVARTY, N., SANCHEZ, M., et ERCOLI, N., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1962, 110, 517.

3. CLARK, T. B., et WALLACE, F. G., *J. Protozool.*, 1960, **7**, 115.
4. GUHA, A., PYNE, C. K., et SEN, B. B., *J. Histochem. and Cytochem.*, 1956, **4**, 212.
5. HITZEMAN, J. W., *J. Histochem. and Cytochem.*, 1963, **2**, 62.
6. MEYER, H., DE OLIVEIRA MUSACCHIO, M., et DE ANDRADE MENDONCA, I., *Parasitology*, 1958, **48**, 1.
7. MEYER, H., et QUEIROGA, L. T., *J. Protozool.*, 1960, **7**, 124.
8. MÜHLFORDT, H., et BAYER, M., *Z. Tropenmed. u. Parasitol.*, 1961, **12**, 334.
9. NACHLAS, M. M., TSOU, K. C., DE SOUZA, E., CHENG, C. S., et SELIGMAN, A. M., *J. Histochem. and Cytochem.*, 1957, **5**, 420.
10. NOVIKOFF, A. B., *J. Histochem. and Cytochem.*, 1959, **7**, 301.
11. NOVIKOFF, A. B., et ESSNER, E., *Fed. Proc.*, 1962, **21**, 1130.
12. NOVIKOFF, A. B., et MASEK, B., *J. Histochem. and Cytochem.*, 1958, **6**, 217.
13. NOVIKOFF, A. B., SHIN, W. Y., et DRUCKER, J., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1961, **9**, 47.
14. PITELKA, D. R., *Exp. Cell Research*, 1961, **25**, 87.
15. PITTAM, M. D., et VICKERMAN, K., *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1962, **56**, 270.
16. STEINERT, M., *Exp. Cell Research*, 1958, **15**, 560.
17. STEINERT, M., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1960, **8**, 542.
18. TSOU, K. C., CHENG, C. S., NACHLAS, M. M., et SELIGMAN, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 6139.
19. VICKERMAN, K., *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 1962, **56**, 270.
20. VICKERMAN, K., *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 1962, **56**, 487.

Explication des Figures

KN, kinétonucléus
 L, lipides
 m, mitochondrie

N, noyau
 Vp, vacuole pulsatile

Toutes les figures représentent *T. mega* sous la forme de culture (crithidia). Grossissement uniforme de 3,300.

FIGURE 1 NADH-Diaphorase. Les mitochondries apparaissent en noir ou en demi-teinte. Les trypanosomes *c* et *d* montrent particulièrement bien la réaction positive de la membrane du kinétonucléus (voir aussi Fig. 3).

FIGURE 2 Contraste de phase. La partie postérieure des crithidias est chargée de globules de graisse, noirs sur la photographie. Le chondriome apparaît en demi-teinte comme un réseau de filaments et de quelques éléments plus larges.

FIGURE 3 Représentation schématique de la cellule *d*, Fig. 1. NADH-Diaphorase. L'association kinétonucléus-mitochondrie est très nette dans cet exemple.

FIGURE 4 Représentation schématique du trypanosome des Figs. 5 et 6. Contraste de phase. L'individu, biflagellé, est en prédivision.

FIGURES 5 et 6 Contraste de phase. La même cellule photographiée dans deux plans optiques légèrement différents. La Fig. 5 montre bien le kinétonucléus coloré au Vert Janus B. Les mitochondries sont plus apparentes dans la Fig. 6. L'association kinétonucléus-mitochondrie est évidente.

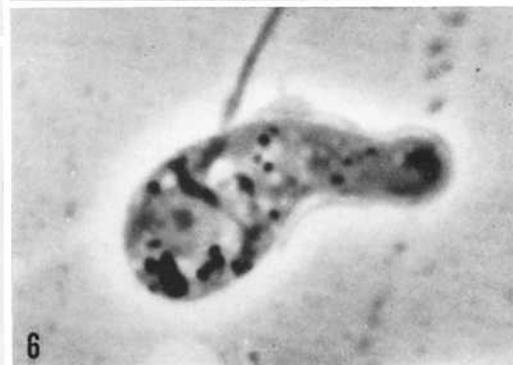
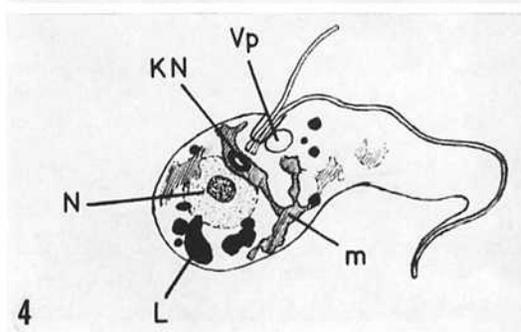
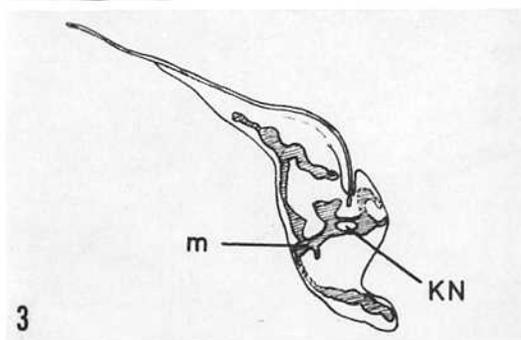
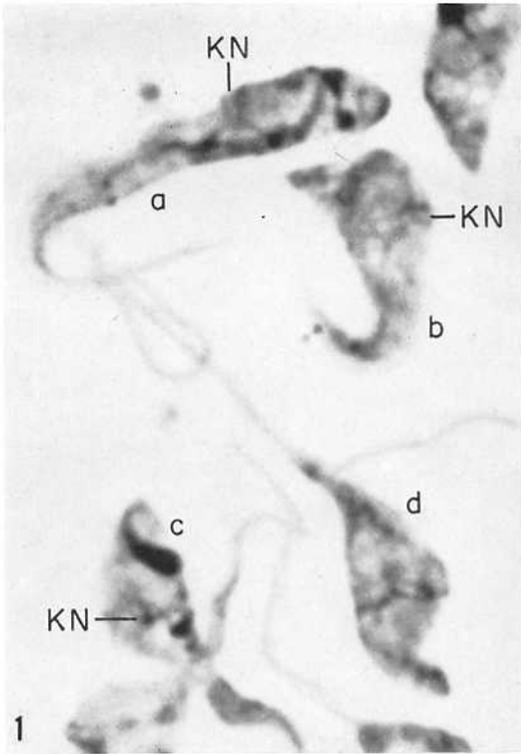


FIGURE 7 NADH-Diaphorase. Trypanosomes cultivés en milieu vieux. La continuité du chondriome est particulièrement remarquable. Remarquer la mitochondrie longue et sinueuse dans la moitié antérieure de chaque cellule et comparer avec la Fig. 8.

FIGURE 8 Contraste de phase. Crithidias semblables à celles de la Fig. 7. Le chondriome et le noyau avec son nucléole se voient clairement. Noter l'absence totale de globule de graisse.

