

- 1 Supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 112 Zellsystemphysiologie).
- 2 Present address: Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin, Arnimallee 22, D-1000 Berlin 33, West.
- 3 With technical assistance by M. Grünefeld.
- 4 A.A. Axelrad and R.A. Steeves, Virology 24, 513 (1964).
- 5 F. Lilly and R.A. Steeves, Virology 55, 363 (1973).
- 6 E.A. Mirand, R.A. Steeves, L. Avila and J.R. Grace, Jr, Proc. Soc. expt. Biol. Med. 127, 900 (1968).
- 7 E.A. Mirand, R.A. Steeves, R.D. Lange and J.T. Grace, Jr, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 128, 844 (1968).
- 8 R.A. Steeves, E.A. Mirand, A. Bulba and P.J. Trudel, Int. J. Cancer 5, 346 (1970).
- 9 D.H. Troxler, W.P. Parks, W.C. Vass and E.M. Scolnick, Virology 76, 606 (1977).
- 10 C. Friend, J. exp. Med. 105, 307 (1957).
- 11 D. Metcalf and M.A.S. Moore, in: Haemopoietic Cells, North Holland Research Monographs, vol. 24, p. 476. North Holland Publ. Comp. Amsterdam and London 1971.
- 12 J.S. Horoszewics, S.S. Leong and W.A. Carter, J. nat. Cancer Inst. 54, 265 (1975).
- 13 S.K. Liao and A.A. Axelrad, Int. J. Cancer 15, 467 (1975).
- 14 U. Opitz, H.-J. Seidel and I.S. Rich, Blut 35, 35 (1977).
- 15 D.H. Pluznik and L. Sachs, J. nat. Cancer Inst. 35, 535 (1964).
- 16 N.N. Iscové and F. Sieber, Exp. Hemat. 3, 32 (1975).

## Etude ultrastructurale de la transformation du corps élémentaire en corps initial chez les *Rickettsiella*

### An ultrastructural study of the transformation of elementary bodies of *Rickettsiella* into initial bodies

A. Yousfi<sup>1</sup>, C. Louis et G. Meynadier

Station de Recherches de Pathologie Comparée, INRA-CNRS, F-30380 Saint Christol (France), 3 août 1978

**Summary.** An intermediate stage between the elementary and the initial bodies of the *Rickettsiella* genus is defined as the beginning of an intracellular cycle. It is characterized by several structural changes in the dense elementary body: the cytoplasm becomes less electron-dense; thus, the nucleoid and the ribosomes are visible. The inner layer of the cell-wall becomes progressively clearer and the trilamellar structure of the inner and outer membranes appears distinctly. 'Pre-initial body' is proposed as name of this stage of development.

Parmi les procaryotes intracellulaires à parasitisme obligatoire, l'ordre des Chlamydiales se caractérise par la présence d'un cycle de développement intravacuolaire<sup>2</sup>. Les mêmes particularités se rencontrent chez le genre *Rickettsiella* (Philip 1956) qui regroupe plusieurs agents pathogènes d'invertébrés appartenant à des classes et des ordres divers (insectes, crustacés, arachnides, myriapodes). Chez ces procaryotes un cycle intravacuolaire de développement marqué par la succession de différentes formes a été décrit<sup>3</sup> et au cours d'une étude comparative, Devauchelle et al.<sup>4</sup> ont mis en évidence l'analogie récemment confirmée<sup>5</sup> du cycle des *Rickettsiella* avec celui des *Chlamydia* ainsi que celle des diverses formes qui se succèdent (forme dense: corps élémentaires, forme de multiplication: corps initial ou corps réticulé, forme intermédiaire: corps intermédiaire).

Chez les Chlamydiales en général, de même que chez les *Rickettsiella*, le début d'un nouveau cycle infectieux qui se caractérise par la transformation du corps élémentaire en corps initial n'est pas connu avec précision. Ce fait est probablement dû à la très faible durée de cette phase et au petit nombre de cellules contaminées en début d'infection. Dans cette note, nous décrivons cette phase du passage du corps élémentaire en corps initial marquée en particulier par des modifications du système membranaire. Pour ce travail nous avons choisi d'étudier au microscope électronique *Rickettsiella armadillidi*<sup>6</sup> au cours de l'infection du tissu interstitiel de son hôte, l'isopode *Armadillidium vulgare* Latreille.

**Matériel et méthodes.** L'isopode *Armadillidium vulgare* élevé à 20 °C et à 65% d'humidité relative est nourri de feuilles de marronniers en décomposition ainsi que de rondelles de carottes et de laitues<sup>7</sup>.

Les infections sont faites au moyen d'un microinoculateur en injectant dans la cavité générale des isopodes une suspension riche en corps élémentaires de rickettsies. Pour

obtenir ces dernières, les tissus d'animaux préalablement infectés sont prélevés aseptiquement et dispersés dans une solution physiologique. Le tissu interstitiel des oniscoïdes infectés est prélevé 3, 5, 7, 9, 11 et 18 jours après la contamination et fixé dans le glutaraldéhyde à 2% en tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,4) additionné de 0,015% de chlorure de calcium. Cette dernière substance, dont l'adjonction est préconisée pour la fixation des procaryotes<sup>8</sup> est favorable en particulier à la préservation des lipides membranaires<sup>9</sup>. La post-fixation est effectuée dans du tetroxyde d'osmium à 1% dans le même tampon. L'inclusion est faite en épón. Les coupes ultrafines sont contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

**Résultats.** Le corps initial (figure 3) mesure environ 1 µm de long et plus de 300 nm de large. Cette cellule rickettsienne est limitée par une enveloppe dont la structure est composée de 7 feuillets (4 denses et 3 clairs) nommés f1 à f7 de l'extérieur vers l'intérieur<sup>5</sup>. Ces feuillets sont, dans leur ensemble, aisés à distinguer chez les corps initiaux. La paroi est constituée par une membrane externe trilamellaire (feuillets f1 à f3) suivie d'une couche interne formée par le feuillet f4 dont la densité aux électrons est très faible et dont l'épaisseur est assez irrégulière. La membrane plasmique est trilamellaire (feuillets f5 à f7).

Le corps élémentaire infectieux est ovoïde et de petite taille (figure 1). Il mesure en moyenne 475 nm de long et 175 nm de diamètre. Il se caractérise par son contenu très dense aux électrons et par son système membranaire condensé dont l'épaisseur totale est de 22 nm et qui est composé par l'alternance de 3 feuillets denses opaques d'inégale épaisseur, et de 2 feuillets clairs. Le feuillet dense médian, le plus épais, correspond en fait à la juxtaposition des 3 feuillets f3, f4 et f5. En effet, le feuillet f4 présente ici une forte densité aux électrons, liée en particulier à une accumulation de polyosides qui se produit lors de la transformation du corps initial en corps élémentaire, en fin de développe-

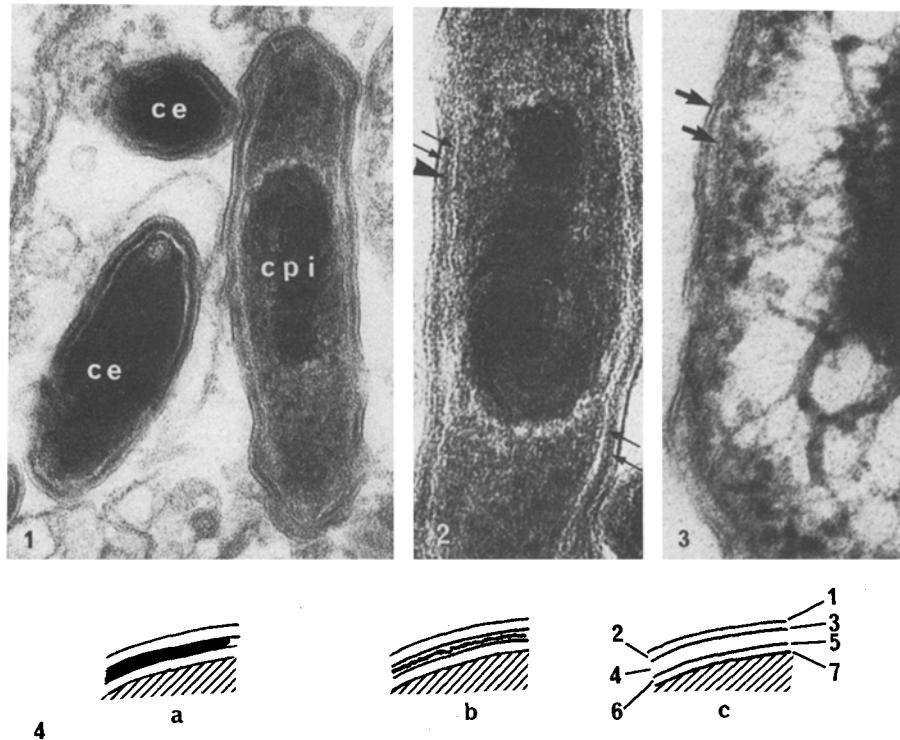


Fig. 1. Les 2 stades successifs de début d'infection: corps élémentaire dense (ce) et corps préinitial (cpi).  $\times 72,000$ .

Fig. 2. Corps préinitial. Les flèches indiquent la délamination des feuillets 3, 4 et 5.  $\times 121,000$ .

Fig. 3. Corps initial. Les flèches indiquent les membranes internes (cytoplasmique) et externes (paroi).  $\times 121,000$ .

Fig. 4. Schéma de l'évolution de l'enveloppe au cours de la transformation du corps élémentaire (a) en corps initial (c) en passant par le stade de corps préinitial (b).

ment du germe<sup>5</sup>. Des méthodes de fixation et d'inclusion particulières ayant pour but d'éclaircir le feuillet f4 des corps élémentaires sont parfois utilisées pour faire apparaître artificiellement les feuillets f3 et f5<sup>5</sup>. Cependant, pour pouvoir suivre l'éclaircissement naturel de ce feuillet au cours de la transformation du corps élémentaire en corps initial, il est nécessaire d'utiliser la technique précisée au paragraphe 'matériel et méthodes' qui conserve la densité du feuillet f4 du corps élémentaire. Sur coupes ultrafines, l'absence de rickettsies à quelque stade que ce soit pendant la première semaine semble indiquer que leur pénétration dans les cellules de l'hôte se fait avec un certain retard après l'inoculation. Nous n'avons ainsi retrouvé de corps élémentaires intracellulaires qu'à partir de la 2e semaine. Au cours de cette 2e semaine, nous avons observé la transformation des corps élémentaires en corps initiaux. Il semble, plus précisément que cette transformation s'effectue au 11e jour suivant l'infection.

La croissance du corps élémentaire se fait d'abord dans le sens longitudinal, son diamètre variant peu. Cet allongement va de pair avec une modification du contenu interne. La zone sous-jacente à l'enveloppe s'éclaircit. Les ribosomes s'y distinguent de plus en plus nettement, et leur nombre semble s'accroître. La zone centrale dense, aux contours d'abord nets, devient peu à peu fibrillaire (figure 1).

La couche interne de la paroi (feuillet f4) perd progressivement sa densité aux électrons et subsiste sous la forme d'un dépôt résiduel opaque disparaissant peu à peu (figures 2 et 4). La structure trilamellaire des membranes interne et externe apparaît à nouveau distinctement au fur et à mesure de l'éclaircissement du feuillet f4. La constitution caractéristique du corps initial se dégage ainsi progressivement au cours de cette transformation.

**Discussion et conclusion.** La lenteur relative du développement de *Rickettsiella armadillidii* a favorisé l'analyse sur coupes ultrafines de l'évolution du corps élémentaire en corps initial. En effet, le cycle de cette rickettsie se déroule

sur environ 4–5 semaines, et, l'animal parasité ne meurt qu'au bout de 2 mois en moyenne<sup>10</sup>.

La présente étude permet de mettre en évidence un stade de transition entre le corps élémentaire et le corps initial. Nous proposons de nommer 'corps préinitial' ce stade de développement. Il se caractérise par rapport au corps élémentaire par une longueur plus grande, le diamètre restant sensiblement constant, par un cytoplasme moins dense aux électrons, par une paroi dont la couche interne (feuillet f4) plus claire contient un dépôt résiduel dense aux électrons, qui disparaît dans le corps initial. La transformation principale subie par l'enveloppe du corps élémentaire se situe au niveau de la couche interne de la paroi (feuillet f4) dont la perte progressive de densité aux électrons résulte vraisemblablement d'une baisse de la teneur en polyosides. L'accroissement du volume du corps élémentaire s'accompagne de la visualisation du nucléoïde et de son évolution vers une structure fibrillaire, ainsi que de l'apparition des ribosomes qui se répartissent à la périphérie du germe. Ces données ultrastructurales caractérisant le passage du corps élémentaire en corps initial établies sur une *Rickettsiella* de Crustacés semblent pouvoir être évaluées, d'après les études comparées en cours, aussi pour les cycles chlamydien en général.

- 1 Adresse actuelle: Institut de Biologie CNRZA, Université d'Oran (Es Senia), Algérie.
- 2 J. Storz et L.A. Page, Int. J. syst. Bact. 21, 332 (1971).
- 3 G. Devauchelle, G. Meynadier et C. Vago, J. Ultrastr. Res. 38, 134 (1972).
- 4 G. Devauchelle, C. Vago et G. Meynadier, C.r. Acad. Sci. 272, 2972 (1971).
- 5 C. Louis, A. Yousfi, C. Vago et G. Nicolas, Annales Microbiol. Inst. Pasteur 128b, 177 (1977).
- 6 C. Vago, G. Meynadier, P. Juchault, J.J. Legrand, A. Amar-gier et J.L. Duthoit, C.r. Acad. Sci. 271, 2061 (1970).
- 7 P. Juchault, Thèse Doct. Es-Sciences, Poitiers (1966).
- 8 A. Ryter et E. Kellenberger, Z. Naturforsch. 13b, 597 (1958).
- 9 C.D. Mitchell, J. Cell Biol. 40, 869 (1969).
- 10 A. Yousfi, Thèse Doct. 3e cycle, Montpellier (1976).