

SOMMAIRE

INTRODUCTION	p. 1
PREMIERE PARTIE	p. 2
CHAPITRE I - LES VARIETES	p. 3
THEORIE	p. 4
LES VARIETES DIVISEES EN CLASSES	
1°/ Classe Dt	p. 6
Tableau 1 (Variété Dt)	p. 7
2°/ Classe Gr	p. 11
Tableau 2 (Variété Gr)	p. 13
Tableau 3 (Changement de type sexuel)	p. 14
- Changement de type sexuel de Gr 4 et Gr 17	p. 15
3°/ Classe Cf	p. 19
Tableau 4 (Variété Cf)	p. 19
4°/ Classe Ar	p. 21
Tableau 5 (Variété Ar)	p. 22
- Induction du selfing dans un clone de 1. multivacu- mulentia	p. 23
5°/ Classe La	p. 25
6°/ Classe Ph	p. 26
7°/ Classes Sy et Va	p. 27
LES VARIETES DE VARIETES DIFFERENTES	p. 28
Tableau 6 des variétés comme sont espérées	p. 31
CONCLUSIONS SUR LES VARIETES RECOULEES ET CLONES DE VIVIER	p. 32
REMARQUES - CONCLUSIONS	p. 34
BIBLIOGRAPHIE	p. 35

I N T R O D U C T I O N

L'observation de la conjugaison chez les paramécies est très ancienne. Leeuwenhoek la signale à la fin du XVII^e siècle.

MULLER (1786) BALBIANI (1858) EUTSCHLI (1876) entreprennent son étude et considèrent qu'il s'agit d'un processus sexuel mais en dégageant des interprétations que les travaux ultérieurs montrent erronées.

MAUPAS en 1889, le premier, donne une description et une signification exactes de la conjugaison. Il observe que celle-ci ne survient jamais chez les descendants d'un même individu et préconise la fécondation croisée comme l'une des conditions nécessaires à la conjugaison.

Cette technique de la fécondation croisée a permis aux américains SONNEBORN (1937) et JENNINGS (1938) de découvrir les "mating types" ou types sexuels : des paramécies sauvages, récoltées dans la nature, sont isolées et mises en culture. Les lignées obtenues sont mélangées deux à deux selon toutes les combinaisons possibles. Le mélange de certaines lignées est toujours suivi de conjugaison. Les deux lignées qui conjuguent sont dites de type sexuel opposé.

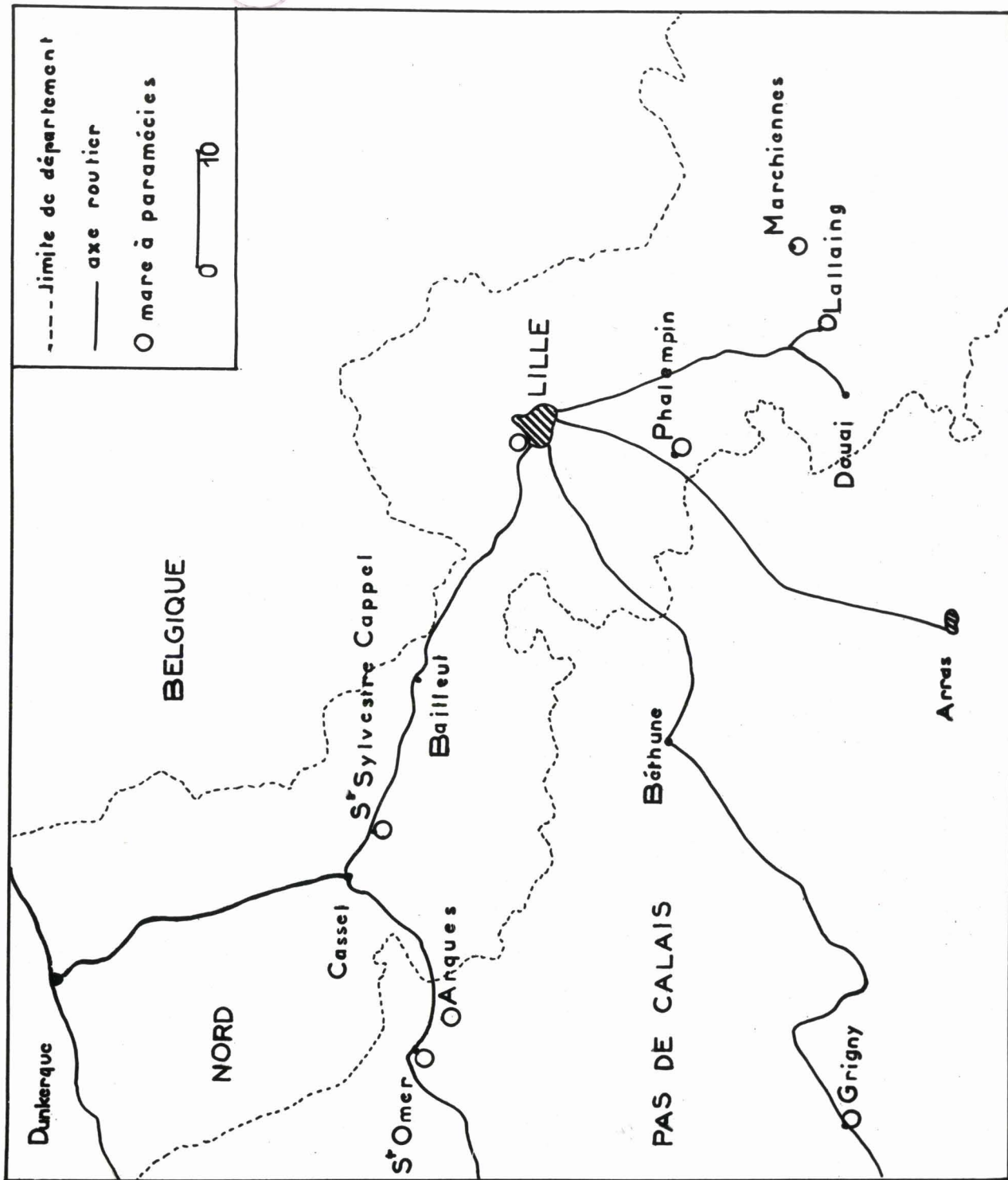
Une même espèce de paramécie comprend plusieurs variétés renfermant chacune un certain nombre de types sexuels. Chez *Paramecium caudatum* et *Paramecium aurelia* le nombre de types sexuels est binaire, il est multiple chez *Paramecium bursaria* et *Paramecium multimicronucleatum*.

Depuis 1959 GILMAN (U.S.A.) établit les différentes variétés de *Paramecium caudatum* à partir d'individus récoltés en Amérique, Europe et Japon. Il a défini une vingtaine de variétés renfermant chacune deux types sexuels. En France, VIVIER (1956) a récolté des paramécies dans la région de Clermont-Ferrand, a mis en évidence quatre variétés dont deux correspondent à des variétés américaines.

Il était intéressant de rechercher les variétés de *P. Caudatum* du Nord de la France et de les comparer aux variétés mises en évidence par VIVIER et par GILMAN.

TERMINOLOGIE

- Souche : ensemble des individus prélevés dans une mare. La souche est désignée par les deux premières lettres du lieu d'origine.
- Clone : Population constituée par la descendance d'un individu isolé à partir d'une souche. Dans un clone tous les individus se reproduisent par scissiparité. Dénomination : les deux lettres de la souche suivies d'un numéro d'ordre.
- Variété : Ensemble des individus pouvant conjuguer entre eux lorsqu'ils sont placés dans les conditions optimales de la conjugaison.
Dénomination : les deux lettres de la souche.
- Type Sexuel : Mating type
A l'intérieur d'une variété, les individus d'un clone qui conjuguent avec les individus d'une autre clone.
Dénomination : un chiffre romain.
- Selfing : Conjugaison intraclonale.
Conjugaison qui survient entre les individus d'un même clone.
- Caryonide : Unité de culture constituée par l'un des quatre individus issus de la deuxième division d'un exconjugant - Tous les descendants d'un caryonide ont la même constitution nucléaire.
- Autogamie : Réorganisation nucléaire identique à celle qui survient lors de la conjugaison mais qui a lieu ici chez un individu isolé.
- Hémixie : Désorganisation en boules du macronoyau qui peut prendre différents aspects :
- division en gros fragments
 - extrusion de quelques balles de chromatine
 - désorganisation totale en nombreux fragments.



M A T E R I E L - L I E U X D E R E C O L T E

Les paramécies ont été récoltées en octobre, novembre et décembre 1961 dans des mares situées dans un rayon de 70 km autour de Lille, dans les départements du Nord et du Pas-de-Calais.

Les mares susceptibles de contenir des paramécies ont une eau stagnante mais claire où se décomposent des feuilles mortes. Les mares recouvertes de lentilles d'eau sont à écarter de même que celles qui contiennent de nombreux crustacés, prédateurs de ciliés.

L'eau est recueillie à l'aide de bocaux et de piluliers sur le bord et en surface de la mare. On ajoute dans chaque flacon des brindilles et des feuilles mortes provenant du lieu de récolte. Plus d'une cinquantaine de mares furent prospectées mais seulement huit d'entre elles contenaient des paramécies (carte).

Les paramécies prélevées constituent huit souches dénommées suivant leur origine :

Dt : prélevées dans les fossés du bois de la Delfle - Lille - (Nord)
Gr : Grigny (forêt d'Hesdin - Pas-de-Calais)
Of : Nationale 42 entre Cassel et St Omer (Pas-de-Calais) près de St Omer.
Ar : Arques (Pas-de-Calais)
La : Lallaing (près de Douai) (Pas-de-Calais)
Sy : St Sylvestre Cappel (entre Cassel et Bailleul - Nord)
Ph : Forêt de Phalempin (Nord)
Ma : Maichiennes (Bois) - (Nord)

TECHNIQUES

Milieu de Culture :

Les paramécies sont cultivées dans des tubes à essais sur un milieu spécial constitué d'une partie d'eau de terre et d'une partie d'eau de blé. Elles sont nourries quotidiennement par une solution riche en bactéries.

Le milieu d'eau de terre a la composition suivante :

- eau de terre : 1 partie
- liquide de Benecke : 1 partie
- eau distillée : 4 parties

L'eau de terre est obtenue après ébullition pendant deux heures de deux poignées de terre et de deux litres d'eau distillée. La terre provient des bords d'une mare qui contenait des paramécies. Le mélange est filtré et stérilisé une première fois pendant vingt minutes à 110°.

Le liquide de Benecke est une solution dans un litre d'eau distillée de :

- 0,20 g. de nitrate d'ammonium
- 0,10 g. de chlorure de calcium
- 0,10 g. de phosphate bipotassique
- 0,10 g. de sulfate de magnésium

Il est stérilisé vingt minutes à 110°.

L'eau de blé : est obtenue après stérilisation dans des tubes à essais de 10 cm³ d'eau distillée et d'un grain de blé. Le milieu où se développent les bactéries utilisées pour la nourriture des paramécies est une infusion de blé préparée en ajoutant une soixantaine de grains de blé à 250 cm³ d'eau distillée. Il est stérilisé dix minutes à 110°. On enseme cette infusion de blé stérile avec des bactéries, *Aérobacter aerogenes*, repiquées tous les deux ou trois jours sur tubes à "gélose inclinée".

On laisse les bactéries se développer pendant vingt quatre heures. ON corrige le pH par addition de carbonate de calcium pour obtenir un pH compris entre 6 et 7. Lorsque cette valeur de pH est atteinte, la suspension bactérienne est transvasée dans un flacon stérile afin d'éliminer les grains de blé. Elle peut alors servir à nourrir les paramécies pendant une durée de trois jours après vérification quotidienne du pH.

Milieu de culture pour la conservation des clones :

On repique les paramécies dans un tube à essais contenant un grain de blé et de l'eau distillée. On ajoute une pipette de milieu d'eau de terre et une pipette de suspension bactérienne. Dans un tel milieu, les paramécies se divisent peu mais peuvent être conservées plusieurs mois.

Techniques expérimentales :

Tout le matériel est en verre, stérilisé avant l'emploi et n'est jamais mis au contact de produits chimiques. Après utilisation, il est lavé à l'eau courante puis à l'eau distillée. Les paramécies et la suspension bactérienne sont prélevées à l'aide de pipettes effilées, de différents calibres, stérilisées à l'eau bouillante après chaque utilisation de façon à ne pas mélanger les paramécies de clones différents et aussi pour ne pas ajouter des bactéries étrangères.

Lorsque les tubes où se multiplient les paramécies sont trop pleins, on enlève une partie du liquide et on nettoie les parois du tube au moyen d'une pipette spéciale lavée à l'eau bouillante au sortir de chaque tube.

Techniques cytologiques :

Dans quelques cas, il a été fait des examens cytologiques concernant le noyau. Pour une étude rapide portant sur un grand nombre d'individus, le vert de méthyle acétique à 1 % a été employé. Pour une étude plus précise, les paramécies étaient fixées au bain ordinaire puis colorées : soit au glycéralun à 2 % - eosine sur frottis à la gélose, soit au feulgen in toto, suivi de frottis à la gélose.

ETUDE DES DIVERSES SOUCHES

1°/ Souche Dt (Bois de la Beille)

L'eau a été prélevée en différents endroits du fossé de la citadelle dans trois flacons F1, F2, F3.

A l'aide d'une pipette on en prélève une certaine quantité que l'on examine dans une salière, à la loupe binoculaire.

Lorsqu'une paramécie est repérée, on la capture à l'aide d'une pipette et on la dépose dans une concavité d'une plaque à neuf concavités remplie d'eau stérile. On lave la paramécie successivement dans trois concavités remplies d'eau stérile afin d'éliminer les autres ciliés et débris qui l'accompagnaient. Ensuite, la paramécie est transportée dans la concavité n° 1 d'une autre plaque, sur un milieu d'eau de terre renfermant très peu de suspension bactérienne (trois gouttes pour 10 cm³ d'eau de terre).

De la même manière, une deuxième paramécie est transportée dans la concavité n° 2...

A partir du flacon F1 nous avons isolé 10 paramécies

"	"	"	flacon F2	"	"	"	7	"
"	"	"	flacon F3	"	"	"	2	"

Soit 19 paramécies isolées pour la souche Dt.

Vingt quatre heures après l'isolement, 17 paramécies se sont divisées et deux sont mortes.

On laisse les paramécies se multiplier dans les concavités jusqu'à l'obtention d'une population supérieure à vingt individus, puis on les repique dans des tubes à essais stériles. Des 17 paramécies isolées, 13 s'étaient divisées et 6 étaient mortes sans se diviser ou après une seule division. Cinq jours après l'isolement, le nombre de paramécies par concavité est compris entre vingt et cinquante. On procède alors au repiquage : on prélève avec une pipette toutes les paramécies d'une concavité, on les dépose au fond d'un tube à essais, on ajoute 1 cm³ d'eau de terre, 1 cm³ d'eau de blé et deux gouttes de suspension bactérienne, on rebouche le tube avec du coton, on étiquette Dt d'après la souche 1, 2, 3, d'après la succession de mises en tubes. Les tubes sont placés dans une étuve à 24° et ne sont sortis qu'au moment des diverses opérations de nourriture, de nettoyage et d'expérimentation qui se font à la température ambiante du laboratoire.

On alimente chaque jour les clones avec trois gouttes de suspension bactérienne. On observe l'accroissement régulier de la population et on augmente progressivement la quantité de nourriture journalière jusqu'à la valeur d'une pipette.

Un mois après l'isolement, la population est extrêmement dense dans les clones 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11 et 13, très faible ou disparue dans les clones 6, 8, 12 qui sont alors éliminés.

Les clones restants présentent à partir de cette date la formation caractéristique de "l'anneau". Cet anneau blanc est constitué par le rassemblement de presque toutes les paramecies du clone à la partie supérieure du liquide. Il apparaît environ deux heures après l'apport de nourriture et se dissocie au bout d'un temps plus ou moins long, suivant l'âge du clone, les conditions de lumière, de température, de pH, de nourriture et d'autres facteurs non connus.

Quand l'anneau persiste pendant une durée voisine de vingt quatre heures, le clone est dans les conditions satisfaisantes pour le test de son type sexuel.

Donnée en évidence des types sexuels de la souche Pt :

On mélange deux à deux de toutes les manières possibles les 13 clones obtenus et on dresse le tableau correspondant (tableau 1).

Les mélanges sont effectués dans des plaques à concavités. On prélève avec une pipette réservée à cet usage une certaine quantité de paramecies au niveau de l'anneau. On dépose le contenu de la pipette dans une concavité, on ajoute des paramecies prélevées de la même façon dans un autre clone.

Les plaques à concavités permettent de faire neuf mélanges.
Exemple : mélange des clones 1, 2, 3, avec les clones 4, 5, 7 -

	1	2	3
4			
5			
7			

On observe aussitôt sous bino.

Dans certaines concavités, des paramecies s'accrochent en paquets plus ou moins importants : c'est la réaction d'agglomération ; dans les autres concavités, les paramecies nagent isolément.

On place les plaques en milieu humide, à l'étuve à 24°. Une heure après, on observe à nouveau les plaques. Dans les concavités où l'agglomération s'était produite, les anas se sont dissociés en couples de paramecies : c'est la réaction de conjugaison.

On reporte les résultats dans le tableau des mélanges :

- le signe + correspond aux conjugaisons
- le signe - aux mélanges non suivis de réaction.

On déduit de chaque conjugaison que les deux clones mélangés sont de type sexuel opposé.

Le tableau 1 montre que :

- le clone 1 a conjugué avec les clones 3, 4 et 13. Les clones 3, 4 et 13 sont donc du même type sexuel, opposé à celui de 1.
- le clone 2 conjugué également avec 3, 4 et 13, il appartient donc au même type sexuel que le clone 1.

Ce est ainsi en évidence deux types sexuels I et II :

- I comprennent les clones 3, 4, 13
- II " les clones 1, 2, 5, 7, 9, 10

TABIEAU I

- VARIÉTÉ 14 -



	1	2	3	4	5	7	9	10	11	13
1										
2	-									
3	X	X								
4	X	X	-							
5	-	-	X	X						
7	-	-	X	X	-					
9	-	-	X	X	-	-				
10	-	-	X	X	-	-	-			
11	-	-	-	-	-	?	?	?		
13	X	X	-	-	X	X	X	X	-	

Type Sexual I : clones 3, 4, 13

Type Sexual II : clones 1, 2, 5, 7, 9, 10

- les clones 6, 8, 12 sorts n'ont pas été représentés.

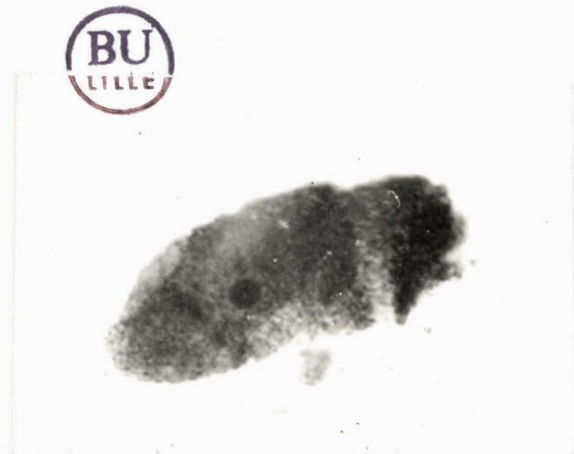
(Le part et d'autre de la diagonale, les allèles sont les mêmes).

ANOMALIES NUCLEAIRES DU CLONE Dt 11



x 350

Hémixie
(Bouin - glychemalun)

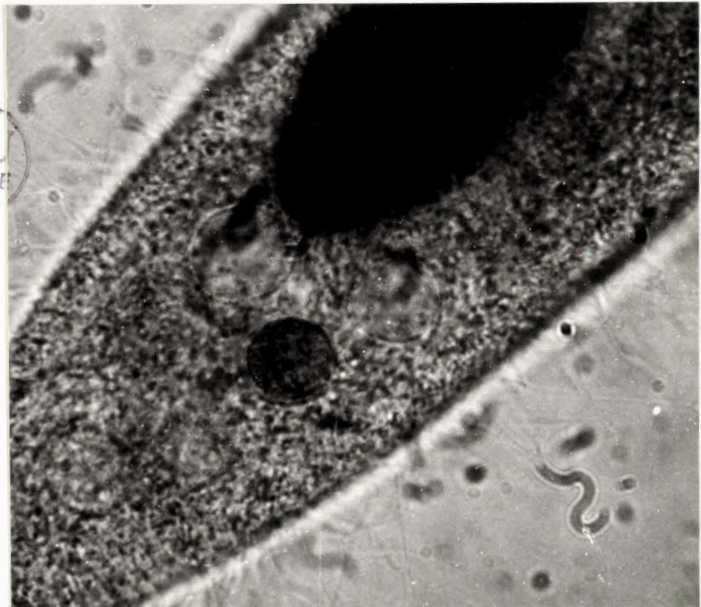


x 860

Macronoyau : Granule feulgen +
(Bouin - feulgen)



x 400



x 1150

Hypertrophie du micronoyau
(Bouin - Feulgen)

Ces deux types sexuels constituent la variété que nous appellerons Variété Bt.

Résultats :

Les tubes à essais contenant les différents clones sont examinés régulièrement. Trois semaines après l'apparition d'un anneau persistant, les clones 7, 9, 10 présentent du selfing ; par contre, les clones du type sexuel opposé et les clones 1, 2, 5 du même type sexuel n'en présentent pas.

Etude du Clone 11 :

Le type sexuel du clone 11 n'a pu être établi. Ce clone a conjugué avec les clones 7, 9, 10 mais pas avec les clones 1, 2, 5 du même type sexuel. Comme les clones 7, 9, 10 présentent des couples selfing, on ne peut affirmer si les couples observés après le mélange proviennent d'une conjugaison interclonale ou intraclonale. La coloration par le rouge neutre à 2 mg. % des paramécies de l'un des clones, effectuée vingt minutes avant le mélange, n'a pas apporté de précisions : Lorsque les couples se forment, les paramécies de l'autre clone ajouté ont également pris la coloration.

Une étude cytologique de ce clone a été entreprise. La coloration au glycocalum montre de nombreux cas d'hémixie. La forme d'hémixie la plus fréquemment observée est la division du macronoyau en deux ou trois gros fragments. L'autre forme, plus rare, correspond à l'extrusion de deux ou trois petits fragments sphériques de la taille du micronoyau.

Chez la plupart des individus, le micronoyau est de grande taille et situé très loin du macronoyau alors que chez un individu normal il est souvent placé dans une concavité du macronoyau.

Une coloration au feulgen a confirmé les observations ci-dessus et montré en outre la présence dans le macronoyau d'un ou deux granules chromatiques très réfringents, pouvant atteindre un diamètre de 7μ . Les granules sont quelquefois entourés d'un halo plus clair.

Ces constatations cytologiques : hémixie fréquente, granules feulgen + , seraient-elles une des causes de la non réactivité du clone 11 ?

Il n'est pas possible, pour l'instant, de préciser le sens de ces anomalies nucléaires.

2°/ Souche Gr (Grigny)

36 paramécies sont isolées - 12 meurent. Les autres se multiplient et sont repiquées en tubes, huit jours après et constituent 24 clones.

La formation d'un anneau durable est observé un mois après le repiquage en tubes et les premières conjugaisons sont obtenus après six semaines de culture.

Tous les mélanges possibles n'ont pas été effectués en raison de leur nombre trop élevé. Il suffit de savoir qu'un clone a conjugué avec plusieurs autres pour être certain de son type sexuel.

A partir de la souche Gr nous avons mis en évidence deux types sexuels constituant la variété Gr (Tableau 2) :

- le type sexuel III comprend les clones 1, 10, 11, 12, 13, 19, 21, 24
- " " " IV " les clones 2, 3, 5, 6, 7, 9, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 23.

Les clones 4 et 17 ont montré successivement les deux types sexuels. Ils ont été étudiés plus en détail.

Le clone 8 n'a jamais conjugué avec aucun autre, bien qu'il présente apparemment les conditions favorables à la conjugaison : population abondante, formation de l'anneau... Des mélanges ont été effectués régulièrement pendant quatre mois sans résultat. Une coloration au glycohemalun a montré quelques cas d'hémixie, et l'hétérogénéité du macronoyau, une coloration au feulgen, la présence de granules chromatiques dans le macronoyau déjà observés dans le clone Dt 11. Mais dans le cas du clone 8, le micronoyau est de taille normale et situé au voisinage du macronoyau.

Dans les deux types sexuels de la variété Gr nous n'avons jamais observé de selfing dans les clones obtenus à partir des paramécies isolées dans la nature. Mais après une série de repiquages sur milieu à grain de blé, le selfing apparaît dans quelques clones du type III mais jamais dans ceux du type IV.

Le clone 8 n'a pas donné de réaction.

Les clones 4 et 17 n'ont pas été représentés.

Les cases vides correspondent aux mélanges non effectués.

Type sexuel III : clones 1, 10, 11, 12, 13, 19, 21, 24.

Type sexuel IV : clones 2, 3, 5, 6, 7, 9, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 23.

TABLEAU 2

- VARIÉTÉ Gr -



- 13 -

	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	19	20	21	22	23	24
1	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
2	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
3	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
5	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
6	X	-	-	-	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
7	X	-	-	-	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
8	-	-	-	-	-	-	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
9	:	-	-	-	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
10	:	X	X	X	X	X	-	X	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
11	-	X	:	X	X	X	-	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
12	-	:	X	X	X	X	-	X	-	-	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
13	:	X	X	X	:	X	-	X	-	-	-	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
14	X	-	-	-	-	-	-	-	X	:	X	X	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
15	:	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	-	:	:	:	:	:	:	:	:	:
16	X	:	-	-	-	-	-	:	X	X	X	X	-	-	:	:	:	:	:	:	:	:
18	X	-	-	-	-	-	-	:	X	X	X	:	-	-	-	:	:	:	:	:	:	:
19	:	X	X	X	X	X	-	X	-	-	-	-	X	X	X	X	:	:	:	:	:	:
20	:	-	-	-	-	-	-	:	X	X	X	:	-	-	-	:	:	:	:	:	:	:
21	-	X	X	X	X	:	:	:	:	:	:	:	X	X	X	X	-	X	:	:	:	:
22	:	-	-	-	-	-	-	-	X	:	X	:	-	-	-	-	-	X	:	:	:	:
23	X	-	-	-	-	-	-	-	X	:	X	:	-	-	-	-	-	X	-	:	:	:
24	-	X	X	:	X	:	-	X	:	:	:	-	X	:	X	X	:	X	-	:	:	:

GRANDS-DEUX DE TOUTES SEXUALITES DE Gr 4 ET Gr 17CLOVES 4CLOVES 17

	4 Origine	4 (a)	4 (b)	17 orig.	17 (a)	17 (b)	17 (c)
Type Sexual							
Date							
30.12.61	IV						
12. 1.62	III			IV			
22. 1.62				III			
26. 1.62	IV			IV			
26. 1.62				III			
2. 2.62				IV			
17. 2.62	III	isolement		III	isolement		
24. 3.62	IV	IV	IV		IV	IV	IV
5. 4.62	III	"	"		"	"	"
10. 4.62		"	"	IV			
21. 4.62				III	"	"	"
7. 5.62	III	"	"	IV			



Changement de type sexuel dans les clones 4 et 17 de la variété Or :

Dans les clones 4 et 17 de la variété Or nous avons constaté un changement de type sexuel pendant la reproduction végétative et ce changement réversible a été observé un certain nombre de fois pendant une période de quatre mois (tableau 3).

SHIMAZAKI (1960) a étudié le changement de type sexuel pendant la reproduction végétative dans le clone 401a de *P. caudatus* appartenant à la variété 1^{re}.

Ses observations confirment certains de nos résultats mais nous avons aussi constaté quelques divergences.

La principale différence réside dans l'origine de ces clones particuliers :

- Le clone 401a d'SHIMAZAKI provient de l'un des quatre carpogones issus ^{du croisement} des deux types sexuels XIII et XIV de la variété 1^{re}.

Dans ce croisement, l'instabilité du type sexuel est synchrone et les huit carpogones sont du type XIV. La parénchyme à l'origine du 401a est donc du type XIV. En outre, le clone XIV fait du selfing de même que le clone 401a.

- Nos clones Or 4 et Or 17 ont été obtenus à partir de parénchymes isolées dans la nature.

L'identification de leur type sexuel était faite par croisement avec les clones 6 et 24 appartenant respectivement aux types sexuels IV et III de la variété Or.

Les clones 6 et 24 n'ont jamais présenté de selfing au cours de cette étude du changement de type sexuel.

Lors du premier mélange avec les clones 6 et 24, les clones Or 4 et Or 17 se montrèrent appartenir au type IV.

Le deuxième mélange effectué douze jours après pour le clone 4, vingt jours après pour le clone 17, montre le changement de type sexuel dans les deux clones de IV en III.

L'instabilité des clones 4 et 17 apparaît très tôt : après un mois de culture ; elle était plus tardive : trois mois pour le clone d'SHIMAZAKI.

On admet généralement que le selfing provient d'un changement de type sexuel d'un petit nombre d'individus à l'intérieur d'une clone. Comme aucun selfing n'est jamais constaté au moment du changement de type sexuel, on peut penser que le changement survient simultanément pour tous les individus des clones Or 4 et Or 17.

A partir des clones Gr 4 et Gr 17, alors qu'ils venaient de changer leur type sexuel de IV en III, nous avons isolé et mis en culture un certain nombre de paramecées. Nous avons obtenu deux clones Gr 4 (a) et Gr 4 (b) à partir de Gr 4 et trois clones Gr 17 (a), Gr 17 (b), Gr 17 (c) à partir de Gr 17.

Le test des types sexuels et l'observation concernant l'apparition du selfing, effectués régulièrement, ont montré que les clones obtenus étaient stables et appartenaient au type IV. Nous n'avons jamais observé de changement de type sexuel dans nos clones répiqués. Le selfing n'est pas apparu de même qu'il n'apparaissait pas dans les autres clones de la variété Gr appartenant au même type sexuel IV.

SHIMAZAKI avait observé les mêmes faits : "Tous les individus du clone 401a changent leur type sexuel de XIV en XIII. Cependant, si un seul ou plusieurs individus sont isolés et cultivés dans un nouveau milieu, le type sexuel fait retour au 1er type XIV".

Connaissant le type sexuel des paramecées variées (type IV), nous pouvons établir le type sexuel des clones originels Gr 4 et Gr 17, déjà installés au moment du premier test :

Gr 4 et Gr 17 appartenaient au type IV.

Pour connaître les causes du changement de type sexuel, il était nécessaire de savoir s'il ne se produisait pas de l'autogamie antérieurement au changement de type sexuel. En effet, les individus issus des deux premières divisions après l'autogamie peuvent être du type sexuel opposé à celui de l'individu autogame dont ils proviennent.

Un certain nombre de paramecées était prélevé et coloré au vert de méthyle au moment des selfings effectués pour le test du type sexuel. Nous n'avons jamais observé d'individus réorganisant leurs noyaux au moment du changement de type sexuel. Cette observation correspond à celle d'SHIMAZAKI : "Le fait qu'aucun individu faisant de la réorganisation nucléaire ne fut trouvé immédiatement après le prélèvement d'échantillons semble être suffisant pour prouver que le changement de type sexuel n'est pas dû à l'apparition préalable d'autogamie".

SHIMAZAKI explique le changement de type sexuel par une modification qui survient dans le taux de division lorsqu'on augmente ou diminue la quantité de nourriture quotidienne : une nourriture abondante qui détermine un taux de division élevé favorise le maintien d'un type sexuel ; un taux de division faible favorise le type opposé. Si les conditions de culture sont maintenues, on peut stabiliser le type sexuel après son changement.

Nous n'avons pu vérifier cette explication du changement de type sexuel, faute d'une méthode permettant de modifier à volonté le taux de division des paramecées.

Cependant, nous avons observé plusieurs fois du selfing dans les clones Gr 4 et Gr 17, pendant la période consécutive à deux ou trois jours de jeûne : une modification dans la nourriture aurait déterminée le changement de type sexuel d'une partie des individus du clone à la suite de la diminution du taux de division.

Discussion :

La principale différence avec les observations d'Okada et al. concerne l'origine des clones Gr 4 et Gr 17.

Si l'hérédité du type sexuel, dans la variété Gr, est caryonidale, on pourrait penser que les paramécies à l'origine des clones sont, soit des exconjugantes, soit les descendants issus de la division de ces dernières.

Les clones Gr 4 et Gr 17 renfermeraient alors chacun les deux types sexuels. Il y aurait prédominance tantôt de l'un, tantôt de l'autre, suivant les conditions de nourriture et il ne s'agirait pas d'un changement de type sexuel.

Une étude de l'hérédité des types sexuels effectuée ultérieurement pour la variété Gr a montré que, dans cette variété, l'hérédité est clonale; même si les individus à l'origine des clones 4 et 17 sont des exconjugantes ou leurs descendants directs, les paramécies qui en sont issues pour constituer la population de ces clones étaient, au début de la culture, du même type sexuel.

Les observations que nous avons faites concernaient bien un changement de type sexuel de tous les individus des clones Gr 4 et Gr 17.

TABLEAU 4

- VARIANTE 22 -



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1																
2	X															
3	-	X														
4	X	-	X													
5	-	X	-	X												
6	-	X	X	X	-											
7	X	-	X	-	X	X										
8	X	-	X	-	X	X	-									
9	-	X	-	X	-	-	X	-								
10	-	X	-	X	-	-	X	X	-							
11	X	-	X	-	X	X	-	-	X	X						
12	X	-	X	-	X	X	-	-	X	X	-					
13	-	X	-	X	-	-	X	X	-	-	X	X				
14	-	X	-	X	-	-	X	X	-	-	X	X	-			
15	X	-	X	-	X	X	-	-	X	X	-	-	X	X		

Type sexual V clones : 2 - 4 - 7 - 8 - 11 - 12 - 15

Type sexual VI clones : 1 - 3 - 5 - 6 - 9 - 10 - 13 - 14

5°/ Souche Or (St Louis)

27 paramecies sont isolées - 11 meurent - 16 sont repiquées en tubes.

La croissance est lente dans la plupart des tubes. Les clones 3, 15 et 16 présentent l'anneau deux mois après l'isolement des paramecies. Les autres clones sont repiqués toutes les semaines sur milieu d'eau de terre jusqu'à l'obtention d'une population abondante.

Les mélanges sont effectués quand les clones présentent un anneau persistant plus de quinze heures. La réactivité sexuelle est apparue suivant les clones après deux à trois mois de culture.

Deux types sexuels sont mis en évidence : (tableau 4)

- Type sexuel V : Clones 2 - 4 - 7 - 8 - 11 - 12 - 16
- Type sexuel VI : Clones 1 - 3 - 5 - 6 - 9 - 10 - 13 - 15.

Tous les clones ont conjugué et aucun selfing n'a été observé.

Remarque :

Les paramecies de cette variété sont plus petites que celles des variétés Dt et Or, bien que nourries avec la même quantité de suspension bactérienne. Leur taille est inférieure à 250μ (mesure effectuée sur le vivant) alors que celle des paramecies Dt et Or est voisine de 320μ .

- Variétés de -

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1															
2															
3	X	X													
4	X	X	-												
5	-	-	X	X											
7	X	X	-	-	X										
9	-	-	X	X	-	X									
11	X	X	-	-	X	-	X								
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
13	X	X	-	-	X	-	X	-	-	-					
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	X	X	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-

Type sexuel VII clones 1 - 2 - 5 - 9

Type sexuel VIII clones 3 - 4 - 7 - 11 - 13 - 15.

Les clones 12 et 14 ne conjuguent pas

Les clones 6 - 8 - 10 n'ont pas été représentés.



4°/ Bouche Ar (arome)

Deux prélèvements ont été effectués à quinze jours d'intervalle. Le premier a permis d'isoler 3 parasitoies, le deuxième 18.

5 sont mortes - 15 clones ont été constitués. Un aneau persistant est apparu après un mois de culture de sève que la maturité sexuelle.

Deux types sexuels sont mis en évidence : (Tableau 5)

- le type VII comprend les clones 1 - 2 - 5 - 9
- le type VIII comprend les clones 3 - 4 - 7 - 11 - 13 - 15.

Induction du selfing dans un clone de *Parascacius multimicronucleatus* :

Le clone 8 donne des réactions avec tous les autres clones. Observé régulièrement au bino, il ne montre jamais de couples selfing.

Quand on effectue le mélange du clone 8 et d'un autre clone, il n'y a pas réaction d'agglomération immédiate, mais trois à cinq heures après le mélange, les paramécies semblent rasper sur le fond de la concavité et s'accrochent lentement lorsqu'elles se rencontrent : il se forme des groupes de paramécies ne comprenant jamais plus de quatre individus, puis les couples se constituent.

La conjugaison dure en moyenne 6 à 10 heures à la température de 24°.

Une coloration au fuchsin permet d'observer à l'imagerie la présence de trois micronoyaux de très petite taille (1,5 à 2 μ de diamètre). Le clone 8 est un clone de *P. multimicronucleatus*.

Une coloration au fuchsin de quelques couples obtenus lors du mélange du clone 8 avec les types sexuels VII ou VIII de *P. caudatus* montre que les deux individus qui conjuguent sont des *P. multimicronucleatus*. Il s'agit d'une conjugaison intraclonale de *P. multimicronucleatus* et non de la conjugaison d'une *P. caudatus* de type VII ou VIII et d'une *P. multimicronucleatus*.

Elle est également obtenue par les clones des deux types sexuels des variétés Et, Of, Or et par le filtrat de ces différents clones.

Expériences :

Dans une série de concavités on dispose des paramécies du clone 8.

- Dans la première les paramécies se servent de témoin.
- Dans la deuxième on ajoute le liquide filtré d'un clone de *P. caudatus*.
- Dans la troisième le liquide filtré du clone 8.
- Dans la quatrième le milieu de culture (eau de blé stérile).

Trois heures après, on observe la formation de couples dans la concavité n° 2 où l'on a ajouté le filtrat de *P. caudatus*, mais pas dans les autres.

Ces expériences ont été faites plusieurs fois pendant deux mois et ont toujours donné les mêmes résultats quel que soit le clone de *P. caudatus* utilisé.

A partir du clone 8, quelques paramécies ont été isolées et mises en culture. Nous avons observé du selfing dans deux des quatre clones obtenus.

Pour un de ces clones, nous avons refait l'expérience décrite plus haut ; nous avons observé la formation des couples dans les quatre concavités à raison de :

1 seul couple dans la concavité N° 1	
un très grand nombre dans le	N° 2
4	dans le N° 3
une dizaine	dans le N° 4.

Discussion :

Nous avons constaté que le clone 8 de *P. multimicronucleatus* faisait du selfing dans certaines conditions : addition de filtrat de *P. caudatus* pour le clone obtenu à partir de la paramécie isolée dans la nature, filtrat de *P. caudatus* ou eau de blé pour les clones obtenus après repiquage. Les expériences réalisées sur ces derniers clones ne permettent pas de conclure sur le rôle du filtrat de *P. caudatus*, en raison du nombre de couples obtenus après addition d'eau de blé. Toutefois, ce nombre reste toujours inférieur à celui atteint dans l'expérience faite avec le filtrat de *P. caudatus*. S'il existe une substance dans le liquide de *P. caudatus* capable d'induire le selfing dans le clone de *P. multimicronucleatus*, elle n'est pas spécifique : n'importe quel type ventral de *P. caudatus* permet le selfing.

Remarque :

Il ne semble pas que le contact des paramécies entre elles ait un rôle : les probabilités de rencontre étant plus importantes dans le tube, au niveau de l'anneau que dans la concavité.

Un certain nombre d'exconjugants de *P. multimicronucleatus* a été fixé et coloré au feulgen, d'autres mis en culture ont été fixés et colorés après une, deux et trois divisions.

Cette étude a permis de constater que les phénomènes nucléaires sont les mêmes que lors d'une conjugaison interclonale : tous les individus ont une constitution nucléaire normale (un micronoyau - 3 micronoyaux après la troisième division de l'exconjugant.)

Etude des clones non réactifs de la souche Ar :

Les clones 6 - 10 - 12 - 14 ne conjuguent pas. Une coloration au feulgen a montré que :

- le clone 10 est un clone de *P. multimicronucleatum*
- le clone 6 " " " de *P. aurelia*
- les clones 12 et 14 " de *P. caudatum*.

Nous avons trouvé en abondance, de l'autogamie chez *P. aurelia* et observé de l'hémizie et des granules feulgen + dans le macronoyau des clones 12 et 14 de *P. caudatum*.

5°/ Souche La (Lallaing)

9 paramécies ont été isolées - 7 ont survécu et constitué des clones qui, mélangés de très nombreuses fois, n'ont jamais donné de réaction.

Après coloration au glycohemalum, les clones 1, 2, 6, 7 s'avérèrent appartenir à l'espèce *P. caudatum*.

Ces derniers clones sont, soit du même type sexuel soit des paramécies ayant perdu leur pouvoir de conjuguer.

D'autres prélèvements ont été effectués en avril à l'endroit où furent trouvées les premières paramécies, mais sans résultats.

6°/ Bouche M. (Halepoin)

Les quatre parascies isolées ont donné quatre clones, la population de ces clones est extrêmement dense après trois semaines de culture, mais les parascies sont très petites.

Une coloration au *Lichensolus* montre qu'il s'agit de clones de *P. muris* qui présentent de nombreux cas d'autogamie.

7°/ Bouche St (St Sylvestre Cassel)

Bouche St (Marchiennes)

10 paravaccins ont été isolés à partir d'une mare située en bordure de la nationale Cassel-Baillet, près de St Sylvestre Cassel. Trois seulement ont donné des clones qui se sont développés lentement et sont morts après un mois de culture.

Une coloration au glycémolite avait montré qu'il s'agissait de clones de *S. caudatus*.

Il en a été de même pour les deux autres paravaccins isolés de la mare de (Marchiennes).

MISE EN EVIDENCE DE VARIETES DIFFERENTES

Nous avons mis en évidence deux types sexuels dans chacune des souches Dt, Gr, Of, Ar et nous supposons que les trois clones de la souche La constituent un seul type sexuel.

Ces différents groupes de types sexuels appartiennent-ils à des variétés différentes c'est-à-dire sexuellement séparées ?

Nous mélangeons deux à deux, de toutes les manières possibles, ces neuf types sexuels. Les mêmes mélanges sont effectués plusieurs fois à des dates s'échelonnant sur deux mois. Les mélanges témoins entre les deux types sexuels de chaque variété sont effectués sur la même plaque : les résultats ne peuvent être déduits que si la conjugaison a lieu dans les deux mélanges témoins.

Comparaison de variétés Dt et Gr :

		<u>Croisements</u>				<u>Mélanges Témoins</u>	
		I	II			I	
	Dt						
	Gr					II	Dt
III						III	
IV						IV	Gr

Le signe + indique la conjugaison.

Dans le mélange des types sexuels Dt et Gr aucune conjugaison n'est constatée. Les deux variétés qu'ils constituent sont donc différentes.

Comparaison de la variété Of avec les variétés Gr et Dt :

Nous croisons les types sexuels V et VI de la variété Of avec ceux des variétés Gr et Dt.

		I	II		I		III	IV		III	
	Dt				II	Dt	Gr			IV	Gr
	Of						Of				
V					V		V			V	
VI					VI	Of	VI			VI	Of

Aucune réaction d'agglomération ni de conjugaison n'est constatée. La variété Of est différente des deux variétés Dt et Gr.

Variété Ar :

Nous testons la variété Ar avec les trois autres variétés que nous avons mises en évidence.

		I	II		II		III	IV		IV	
	Dt				I	Dt	Gr			III	Gr
	Ar						Ar				
VII					VII		VII			VII	
VIII					VIII	Ar	VIII			VIII	Ar

		VI	VI		VI	
	Of				V	Of
	Ar					
VII					VII	
VIII					VIII	Ar



Le mélange des types sexuels des variétés Ar et Or est suivi de la réaction d'agglomération puis de la réaction de conjugaison.

Les types sexuels III et VII, IV et VIII sont respectivement opposés et appartiennent à la même variété.

Le croisement de chacun des trois clones de *P. caudatum* de la souche La avec les six types sexuels des trois variétés Dt, Gr, Of, n'a jamais donné de conjugaison. Ces trois clones pourraient constituer l'un des deux types sexuels d'une quatrième variété (soit le type sexuel IX). Pour l'affirmer, il faudrait, à défaut de trouver l'autre type sexuel, savoir si ces clones ont encore leur propriété de conjuguer.

Conclusion :

Nous avons mis en évidence, à partir des *P. caudatum* récoltées, trois variétés sexuellement séparées : les variétés Dt, Gr et Of et peut-être un type sexuel d'une quatrième variété La (Tableau 6).

TABIEAU 6

VARIETES ET TYPES SEXUELS DE PARAMECIUM CAUDATUM
mis en évidence dans le Nord de la France -

		Dt	Gr	Of	La			
Variétés	Types Sexuels	I	II	III	IV	V	VI	IX
	I	-	+					
Dt	II	+	-					
	III			-	+			
Gr	IV			+	-			
	V					-	+	
Of	VI					+	-	
								-
La	IX							



Le signe + indique les mélanges suivis de conjugaison.

Les variétés Gr et Ar sont identiques aussi.

aussi Les types VII et VIII de la variété Ar n'ont pas été figurés dans ce tableau.

COMPARAISON DES VARIÉTÉS TROUVÉES AVEC LES VARIÉTÉS VIVIER (1956)

VIVIER (1956) a mis en évidence quatre variétés dans la région de CLERMONT-FERRAND.

- Variété I (A,B) Lalizolle (Allier)
- Variété II (C,D) Vieq (Allier)
- Variété III (E,F) Clermont-Ferrand (Puy-de-Dôme)
- Variété IV (G,H) Montluçon (Allier)

Nous avons effectué le mélange des trois variétés trouvées dans le Nord de la France avec les variétés II (C,D) et III (E,F) qui ont gardé jusqu'à ce jour leur propriété de conjuguer.

Variété Dt :



	C	D		C		E	F		E
Var.II					Var.III				
Dt			D	Var.II	Dt			F	Var.III
I			I		I			I	
II			II	Dt	II			II	Dt

Le type I conjugué avec F il est donc du même type sexuel que E

Le type II conjugué avec E il est donc du même type sexuel que F

La variété Dt (I,II) est équivalente à la variété III (E,F).

Variété Gr :

	C	D		C		E	F		E
Var.II					Var.III				
Gr			D	Var.II	Gr			F	Var.III
III			III		III			III	
IV			IV	Gr	IV			IV	Gr

III qui conjugue avec D est du type sexuel C

IV qui conjugue avec C est du type sexuel D

et la variété Gr (III,IV) correspond à la variété II (C,D).

Les adlanges de la variété Cf avec les variétés II (C,D) et III (E,F) ne sont jamais suivis de réaction de conjugaison. Ce qui confirme que la variété Cf est différente des variétés Gr et Dt.

Conclusion :

Des trois variétés mises en évidence à partir des *P. caudatus* du Nord de la France, deux sont identiques à deux variétés trouvées dans la région de Clermont-Ferrand, à savoir :

Variété II = variété Gr	{ Type C = Type III Type D = Type IV
-------------------------	---

Variété III = variété Dt	{ Type E = Type I Type F = Type II
--------------------------	---------------------------------------

La variété Cf constitue une variété différente qu'il serait intéressant de croiser avec les variétés de GILMAN.

DISCUSSION - CONCLUSION

Nous n'avons jamais trouvé plus d'une variété de *P. caudatum* par souche. Dans de nombreuses souches, nous avons obtenu des clones qui n'ont jamais conjugué. Les clones présentaient des anomalies nucléaires.

Nous avons constaté un changement de type sexuel dans deux clones de la variété Gr. Ce fait, rarement mentionné n'a été étudié que par HIMATASHI (1960). Les observations que nous avons faites confirment en partie celles d'HIMATASHI. Elles diffèrent par l'origine des paramecies et l'absence de selfing dans les clones.

Le selfing est apparu fréquemment dans les diverses variétés que nous avons mises en évidence. Nous avons même montré que le liquide de culture de *P. caudatum* favorisait le selfing dans un clone particulier de *P. multimicronucleatum*.

Dans les variétés de *P. caudatum*, le selfing affecte toujours les clones de l'un des deux types sexuels et jamais ceux du type opposé. Il devient plus fréquent après plusieurs repiquages sur milieu eau de terre, eau de blé et dans les clones obtenus après isolement de paramecies du clone origine.

Ces quelques observations montrent la complexité du selfing. De nombreuses études devront être réalisées pour en connaître la signification exacte.

Nous avons mis en évidence trois variétés de *P. caudatum* dans le Nord de la France, comprenant chacune deux types sexuels et nous formulons l'hypothèse de l'existence d'une quatrième variété.

VIVIER a trouvé quatre variétés dans la région de Clermont-Ferrand, GILMAN, vingt deux variétés à partir de paramecies prélevées aux U.S.A., Japon, Europe, Amérique du Sud.

Le nombre de variétés pour l'espèce *P. caudatum* est donc très important, susceptible d'augmenter au cours de recherches ultérieures. Cependant, il ne semble pas qu'il soit illimité : des variétés identiques sont trouvées dans des endroits très éloignés à l'intérieur d'un même pays,

- Variété Dt et Gr du Nord de la France identiques aux variétés II et III de la région de Clermont-Ferrand. -

ou même dans des pays différents : GILMAN a établi des variétés nipponnes et françaises correspondant à des variétés américaines:

Les variétés françaises II et IV sont identiques aux variétés 8 et 9 américaines :

- Variété II (G,D) = Gr (III, IV) = variété 8 (XV, XVI)
- Variété IV (G,H) = Variété 9 (XVII, XVIII).



BIBLIOGRAPHIE

GREEN (T.T.)

- 1940 : Conjugation in *P. bursaria* between animals with different chromosome number and between animals with and without micronuclei. *Proc. Nat. Acad. Sc.* 26, n° 4, p. 243 - 246.
- 1943 : Induction of conjugation in *P. bursaria* among animals of one mating type by fluid from another mating type. *Proc. Nat. Acad. Sc.* 31, n° 12, p. 404 - 410.

DILLER (W.F.)

- 1936 : Nuclear reorganization processes in *P. aurelia* with descriptions of autogamy and "hexixis". *J. Morph.* 59 p. 11 - 67.

GILMAN (L.G.)

- 1941 : Mating types in diverse races of *P. caudatum*. *Biol. Bull*, Vol. LXXX, n° 3, p. 384 - 402.
- 1950 : The position of Japanese varieties of *P. caudatum* with respect to American varieties. *Biol. Bull*, Vol. 99, n° 2, p. 348 - 349.
- 1954 : Occurrence and distribution of mating type varieties in *P. caudatum*. *Jour. Protoz.* Vol. II, supplement, August 1954.
- 1956 : Distribution of the varieties of *P. caudatum*. *Jour. Protoz.* Vol. 3, supplement, August 1956.
- 1958 : European varieties of *P. caudatum*. *Jour. Protoz.* Vol. 5, supplement.

JENNINGS (H.S.)

- 1938 : Sex reactions types and their interrelations in *P. bursaria*. *Proc. Nat. Acad. Sc. Wash.* 24, p. 112 - 120.
- 1939 : Mating types and groups, their interrelation and distribution; mating behavior and self-sterility. *Genetics Monographs*, 24, p. 202 - 233.
- Mating types and their interaction in the ciliate infusoria. *Introduction Amer Nat.* 73 p. 385 - 389.

HIWATASHI (K)

- 1955 : Studies on the conjugation in *P. caudatum*. V- the time of the initiation of nuclear activation. *Sc. Rep. Tohoku Univ.* vol. XXI, n° 3 - 4 p. 199 - 205.
- 1958 : Inheritance of mating types in variety 12 of *P. caudatum*. *Sc. Rep. Tohoku Univ.* Vol. XXIV n° 3 p. 119 - 129.
- 1960 : Analyses of the change of mating type during vegetative reproduction in *P. caudatum*. *Jap. J. Gen.* Vol. 35, n° 6 p. 213 - 221.

KIMBALL (R.F.)

- 1939 : Change of mating type during vegetative reproduction in *P. aurelia*. J exp. Zool., Philad, 81 p. 165 - 179.

MIYAKE (A.)

- 1956 : Artificially induced micronuclear variation in *P. caudatum*. J Inst. Polyt. Osaka. Univ. series D Vol. 7, p. 147 - 161.
- 1957 : Aberrant conjugation induce by chemical agents in amiconucleate *P. caudatum*. J inst. Polyt. Osaka. Univ. Series D, Vol. 8 p. 1 - 10.
- 1959 : Chemically induced mating without mating type difference in *P. caudatum*. Osaka. Univ. Sc. 130 : 1423.
- 1960 : Artificial induction of conjugation by chemical agents in *P. aurelia*, *P. caudatum* and between them. Indiana Univ. and Osaka Univ. J. Protoz 7 (Suppl.) 15.

SONNEBORN (T.M.)

- 1937 : Sex, sex in heritance and sex determination in *P. aurelia*. Proc. Nat. Acad. Sc. Wash 23, p. 378 - 395.
- 1938 : Mating types in *P. aurelia* : diverse conditions for mating in different stocks, occurrence, number and interrelations of the type. Proc. Am. Phil. Soc. Philad, 79, p. 411 - 434.

VIVIER (E)

- 1937 : Determination du sexe parai les descendants d'exconjugants dans la variété II de *P. caudatum* C.R. Acad. Sc. Paris 245, p. 1.567 - 1.569.
- 1960 : Contribution à l'étude de la conjugaison chez *P. caudatum* Ann. Sc. Nat. Zool. 12e série.