

50 376
1970
29

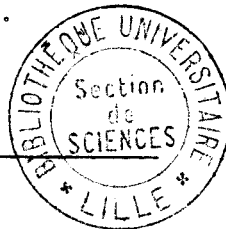
FACULTE DES SCIENCES DE LILLE

50376
1970
29

THESE DE TROISIEME CYCLE
(Biologie Animale)

Bernard L E G R A N D

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA CONTRACTION CHEZ LE SPIROSTOME (SPIROSTOMUM
AMBIGUUM, CILIE SPIROTRICHE).



Présentée en Février 1970
devant la Commission d'examen

Jury d'examen

M. M. FURCHON

Président

M. E. VIVIER

Examineurs

M. P. GUILBAULT

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA
CONTRACTION CHEZ LE SPIROSTOME

SOMMAIRE

Introduction

I) PROBLEMES POSES PAR LA CONTRACTION

I) - MATERIEL :

II) - POSITION DES PROBLEMES :

1) - Observation du mouvement

2) - Mise au point d'une anesthésie

a) Historique

b) Mode opératoire

c) Résultats

3) - Problème de la fixation

III) - DISCUSSION DES PROBLEMES :

1) - Relations anesthésie - contraction

a) Remarques

b) Discussion

2) - Relations fixation - contraction

II) RECHERCHES RELATIVES A LA PHYSIOLOGIE DE LA CONTRACTION

1) - ROLE DE L'ATP ET DES SELS :

- 1) Rôle de l'ATP
- 2) Solution de CaCl_2
- 3) Solution de MgCl_2
- 4) Action d'autres sels
- 5) Conclusion

II - ASSOCIATION DE L'ATP AVEC UN SEL :

- 1) ATP + CaCl_2
- 2) ATP + MgCl_2
- 3) ATP + un autre sel (BaCl_2 , SO_4Mn ou KCl)
- 4) Conclusion

III - EQUILIBRE BIOLOGIQUE

- 1) ATP + CaCl_2 + MgCl_2
- 2) ATP + CaCl_2 + MgCl_2 + KCl
- 3) Inhibiteur et activateur de la contraction
- 4) Récapitulation

III) OBSERVATIONS SUR LES PROBLEMES ULTRASTRUCTURAUX DE LA CONTRACTION

I) - ULTRASTRUCTURE PERIPHERIQUE DU SPIROSTOME :

- 1) Techniques
- 2) Spirostome contracté
- 3) Spirostome en extension
- 4) Discussion
 - a) fibres et myonèmes
 - b) Endoplasme
 - c) Conclusion

De nombreux Ciliés sont contractiles, et, à la moindre perturbation du milieu, sous l'influence d'une excitation physique ou chimique, l'animal se rétracte brusquement. Peut-on faire une analogie complète avec les mouvements des Métazoaires : excitation nerveuse, transmission synaptique nerf-muscle, réaction musculaire ? Le problème s'est tout de suite trouvé posé.

Différentes fibres ont été décrites chez certains Ciliés et en particulier chez le Spirostome. Comme un type fibrillaire a été retrouvé dans la majorité des Ciliés contractiles, par analogie, on lui a attribué, un rôle important dans la contraction. Ce rôle a été prouvé, semble-t-il, pour certains Périptriches (notamment sur des Vorticelles), mais ne l'a pas été, à notre connaissance sur le Spirostome. Aussi nous avons entrepris cette démonstration. Après avoir interprété l'action de l'ATP et de différents sels sur des animaux vivants, nous nous sommes attachés à éliminer "l'entourage organique" des fibres étudiées, tout en conservant leur intégrité. A ce moment-là, nous avons pu tester les effets de la solution de contraction, en toute objectivité. Nous avons repris, alors, les données ultrastructurales des auteurs précédents sur les myonèmes. Mais, en plus de ces auteurs, nous avons comparé nos résultats à ceux obtenus sur des Spirostomes fixés en extension. La mise au point d'une technique d'anesthésie s'est donc révélée nécessaire.

A ce sujet, les protocoles indiqués par la bibliographie se sont révélés insuffisants pour le but que nous recherchions. Il a donc fallu adapter une méthode pour le Spirostome, en fonction de tous les résultats désirés. Celle-ci se serait de toute manière montrée nécessaire pour l'étude cytologique, car elle conserve l'intégrité topographique des structures. Elle a amené aussi une pierre supplémentaire dans l'édifice des discussions au sujet de relais nerveux éventuels.

Ceci nous a fait envisager le processus de contraction des myonèmes en le plaçant dans une réalité métabolique : à savoir une topographie ultrastructurale calquée sur un ensemble fonctionnel (ou vice versa), question qui n'a jamais été abordée chez le Spirostome. Cela reposera alors le problème de la contraction elle-même : en existe-t-il un seul type ou plusieurs types, que l'on s'adresse à un Protozoaire ou à un Métazoaire ?

I/ - PROBLEMES DE LA CONTRACTION

La contraction des Ciliés Hétérotriches, et en particulier du Spirostome entraîne certaines perturbations dans la répartition des organites cellulaires et il devient malaisé de localiser ces constituants avec précision, surtout lorsque cette contraction s'effectue suivant un mouvement spirale (réaction décrite déjà en 1899 par JENNINGS). Une étude cytologique, et, comme nous y serons amenés, cytochimique correcte devrait donc faire intervenir, au préalable, une anesthésie.

Il était donc logique de faire appel à un anesthésique. Toutefois, les techniques d'anesthésie, mises au point pour certains Ciliés par des auteurs antérieurs, nous ont montré, après vérification sur le Spirostome, certaines imperfections. Aussi il nous a fallu adapter une nouvelle méthode qui nous a obligé à reposer le problème des relais neuro-moteurs, sans toutefois permettre de le résoudre. Mais cette anesthésie a surtout permis (comme nous le verrons à la fin de ce mémoire) d'éclairer d'un jour nouveau les données ultrastructurales de la contraction chez les Protozoaires.

Un problème en amenant un autre, celui de la fixation s'est en effet trouvé posé : la fixation d'un animal anesthésié est plus difficile que celle d'un individu contracté. Quelle différence y a-t-il entre ces deux états, quels sont les moyens de la combler ? Ayant peu de données connues, seuls les tâtonnements nous ont permis de solutionner (de façon approximative) cette difficulté.

I - MATERIEL

Nos recherches ont été effectuées sur un Cilié Spirotriche Hétérotriche Heterotrichina (classification révisée, d'après le comité de Taxonomie des Protozoologistes, 1964) : le Spirostome : Spirostomum ambiguum Erhb.

D'aspect filiforme, il peut atteindre 3 mm, (Pl I, fig a). Très contractile, il peut réduire sa taille de la moitié à trois quarts. (Pl I, fig b), ce qui amène notamment une réduction de volume de la vacuole pulsatile. Sa rétraction amène d'importants bouleversements (Pl I, fig c et d).

Comme sa position systématique l'indique, l'implantation des cils se fait suivant ^{une} spire (Pl I, fig g). Comme l'indiqueront ultérieurement les photographies ultrastructurales, ces cils sont situés dans des sillons ectoplasmiques. Pour être complet avec la description de morphologie externe, signalons la présence d'un péristome, qui débute dans le tiers postérieur (du côté de la vacuole pulsatile) et se termine dans la région tout à fait antérieure (Pl I, fig e et f).

Déjà BISHOP (1927) divisait son cytoplasme en deux parties : ectoplasme et endoplasme. Dans celui-ci, en plus des vacuoles digestives, on y trouve un macronoyau plurilobé (environ 18 lobes) et de multiples micronuclei. A la limite des deux, se situent les myonèmes.

Les individus constituant nos cultures proviennent d'une mare des environs de Lille. Ils ont été élevés, d'abord sur le milieu de SPECHT (1935), puis, pour des raisons de commodités, sur le milieu de laitue (technique analogue à celle de VIVIER pour les Paramécies, 1960, inspirée de celle de SONNEBORN), en tubes à essais. L'apport alimentaire se fait avec la bactérie Klebsiella aerogenes. Nous avons observé, avec le Spirostome, le même phénomène que celui décrit par VIVIER (1960) et étudié par ESTEVE (1968) sur la formation d'un "anneau de Paramécies", en relation avec l'apport alimentaire.

Pour éviter toutes fluctuations physiologiques, les prélèvements ont été effectués toujours au même moment, 3 ou 4 jours après le repiquage, avec un apport bactérien constant et déterminé. C'est sur de telles bases que nous avons commencé notre expérimentation.

II/ - POSITION DES PROBLEMES

1°) Observation du mouvement :

Sous l'action d'un fixateur, l'animal se rétracte brusquement, de façon irréversible.

Sous l'influence de certains sels (que nous verrons en seconde partie) ou d'une perturbation physique (vibration ou contact d'un objet), une contraction réversible a lieu. JENNINGS (1899) décrivait la même réaction, que le stimulus soit appliqué à la partie antérieure

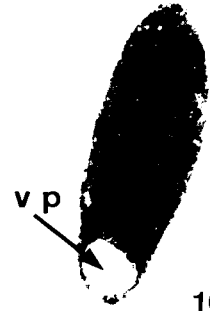
LEGENDES DE LA PLANCHE I

- Fig a : Spirostome fixé après anesthésie. Carmin acétique non différencié. Au niveau de la vacuole pulsatile (vp) quelques lobes du noyau (n) sont visibles.
- Fig b : Spirostome contracté. Carmin acétique non différencié. la vacuole pulsatile (v.p) est plus petite.
- Fig c : Spirostome anesthésié. Imprégnation argentique. Les différents lobes du noyau (n) apparaissent nettement. Grossissement : X 600.
- Fig d : Spirostome contracté. Imprégnation argentique. Le péristome (p) et le macronoyau (n) ont subi aussi les perturbations de la contraction. Grossissement : X 380.
- Fig e : Spirostome anesthésié. Imprégnation argentique. Début du péristome. Grossissement : X 1 200.
- Fig f : Spirostome anesthésié. Imprégnation argentique. Partie terminale du péristome, dans la région antérieure de l'animal. Grossissement : X 1 200.
- Fig g : Spirostome anesthésié. Imprégnation argentique. Implantation des cils. Grossissement : X 1 200.



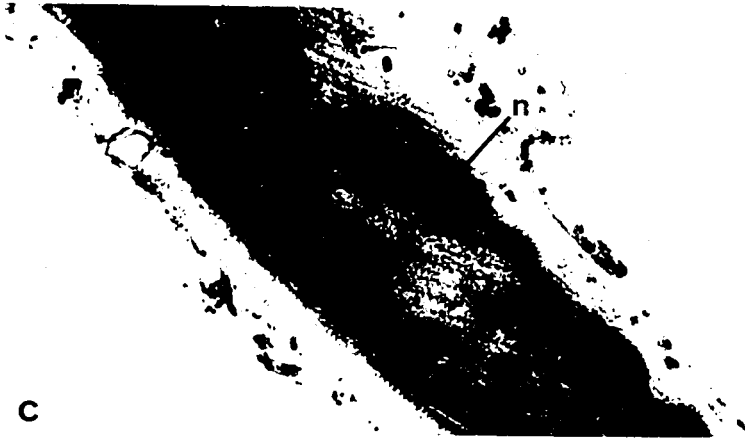
100 μ

a

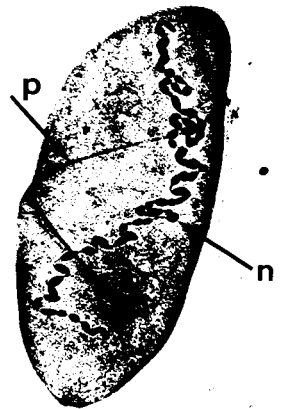


100 μ

b



c



d



e



f



g



(par rapport au sens du déplacement) à l'extrémité postérieure (du côté de la vacuole pulsatile), qu'il soit diffus ou localisé. Il a tendance à fuir la source de l'excitation. Quand la contraction a eu lieu, l'animal nage un peu en arrière, tout en se rallongeant. Il oscille de gauche à droite, et repart en nageant normalement.

Selon CLARK (1945), un fragment de Spirostome, immédiatement après la section en deux, ne se comporte pas comme un animal entier. Chaque portion réagit au stimulus, selon la position qu'elle occupait initialement. Puis, la régulation aidant, les réponses du fragment deviennent conformes à celles d'un animal entier. Ceci peut mieux se comprendre, d'après les enregistrements microcinématographiques et par excitations électriques de JONES, JAHN et FONSECA (1966). Ces auteurs constatent que l'extrémité (antérieure ou postérieure) située du côté du stimulus commence à se contracter et devient ainsi plus opaque. Pendant que le Spirostome se raccourcit, l'autre extrémité devient aussi plus sombre. Ils en concluent que la contraction commence à chaque extrémité, avec une légère avance pour l'extrémité qui se trouve du côté de l'excitation.

Nous avons aussi remarqué que le Spirostome ne peut pas rester contracté. Durant une vibration continue, il se contracte, se détend, se raccourcit... En postulant l'existence des fibres contractiles, il n'y aurait pas de "tétanisation" possible, ce qui confirme les expériences de stimulations électriques de KINOSITA (1938).

Dans le but de trouver le mécanisme de ce mouvement, il s'est révélé nécessaire de pouvoir comparer, en cytologie, des individus contractés et des individus en extension. Seule une anesthésie permettait de solutionner ce problème.

2°) - Mise au point d'une anesthésie :

a) Historique

En vue d'inhiber la contraction des Ciliés, plusieurs méthodes ont été essayées.

En versant rapidement le fixateur sur un grand nombre de Spirostomes, il est possible de récupérer quelques individus non contractés. De même l'action d'un fixateur dilué (nos essais ont été effectués avec la glutaraldéhyde) permet de récolter quelques individus moyennement

contractés, qui seront d'ailleurs mal fixés. L'imperfection de ces "méthodes" apparaît évidente.

La bibliographie nous a révélé de très nombreuses techniques, fondées sur l'action de certains sels ou de narcotiques. Ainsi, l'iodure de potassium, expérimenté par TARTAR (1957) sur Stentor coerules, entraîne sur le Spirostome une conservation assez médiocre de la longueur des animaux. D'autre part, le lavage avant la fixation ne pouvant être très rigoureux (s'il est trop poussé, l'action de l'anesthésique a tendance à s'estomper) il peut se former un précipité avec le fixateur. De même les sels de magnésium (selon WICHTERMANN, 1953) se sont révélés d'un emploi très imparfait. L'étude de cytonarcotisation de DE PUYTORAC, ANDRIVON et SERRE (1963) avec les sels de nickel, complétant des données antérieures (notamment THOMAS, 1935 et BOVEE, 1958) n'a pas trouvé d'application sur le Spirostome. Avec le sulfate de nickel, une immobilité pratiquement absolue a été obtenue, mais la contraction s'est produite lors de la fixation, même après une anesthésie de 1 heure, dans une solution à 0,5 p 100 (temps et concentration maximales). La narcotisation à l'aide du chloroforme de TCHAHOTINE (1921) s'est montrée très aléatoire, ainsi que le procédé à l'éther de DE BEAUCHAMP (1904) sur des Vorticelles. En plus, le peu d'individus manipulé ne s'est pas révélé exploitable. La méthode par le chlorhydrate de cocaïne (GPEBECKI et KUZNICKI sur Paramecium, 1961) est d'une réalisation délicate chez le Spirostome, car celui-ci a tendance à éclater très vite, dès que la dose est un peu trop forte. La technique à la gélatine de BOGGS (1965), difficile à mener, a donné des longueurs valables, mais sur un très petit nombre d'individus, tout au moins dans nos essais.

Certes nous n'avons pas épuisé toutes les méthodes d'anesthésie et nous ne sommes peut-être pas allés jusqu'à la pleine exploitation des techniques essayées. Mais il est apparu que la méthode que nous avons mise au point donne de meilleurs résultats quant à la conservation de la longueur des animaux, traités en grand nombre (LEGRAND, 1968).

b) - Mode opératoire

En effet, la technique à l'aide du chlorétone (alcool trichlorobutylique tertiaire) inspirée de COLE et RICHMOND (1925) et VOLKONSKI (1933) a donné de bons résultats.

En versant, dans une salière contenant les Spirostomes, quelques gouttes (7 à 12 selon la quantité initiale de milieu) de chlorétone (à 0,3 p 100 dans l'eau distillée ou dans le milieu de culture), celui-ci se trouve tout de suite dilué. Toutefois l'impact de la goutte peut amener la contraction de quelques individus. Toutes les 10 ou 15 minutes, la dose d'anesthésique versée est diminuée, pour arriver, au bout d'une heure à 1 ou 2 gouttes de chlorétone. Il faut agiter légèrement à chaque fois. Si une dose se révèle être trop forte, il est possible de rediluer le milieu (avec un liquide isotonique). La réversibilité de cette anesthésie permet, éventuellement, de récupérer les animaux. Progressivement, des tests nous montrent une perte de la "sensibilité mécanique" : si l'on touche le Spirostome, il ne se contracte pas. Par contre, si le fixateur est versé, il y a contraction. Il faut donc attendre la perte de la "sensibilité chimique". A ce moment-là, les Spirostomes tapissent le fond de la salière, ou sont disposés verticalement, la vacuole pulsatile vers le bas. Le Spirostome donne alors l'impression d'être devenu quelque chose d'inerte et qu'il est soumis, de ce fait, aux lois de la pesanteur.

En retirant le milieu, on peut alors verser le fixateur. L'anesthésie est terminée et nous pouvons examiner les résultats qu'elle a donnés.

c) - Résultats

Nous avons procédé à des mesures de longueur de Spirostomes issus d'un même tube. A partir de ces données, nous avons établi les moyennes calculées à partir d'unités arbitraires, avec un micromètre oculaire (1 U, A = 10,6 μ).

- 100 non anesthésiés et fixés.. : M = 27,33
- 100 anesthésiés et fixés..... : M = 72,40
- 100 vivants (dans méthocel)... : M = 101,20

En se référant au graphique (fig 1), on peut dire que, globalement, l'anesthésie amène une contraction d'un quart de la longueur d'un individu vivant, la non anesthésie, une contraction des trois quarts.

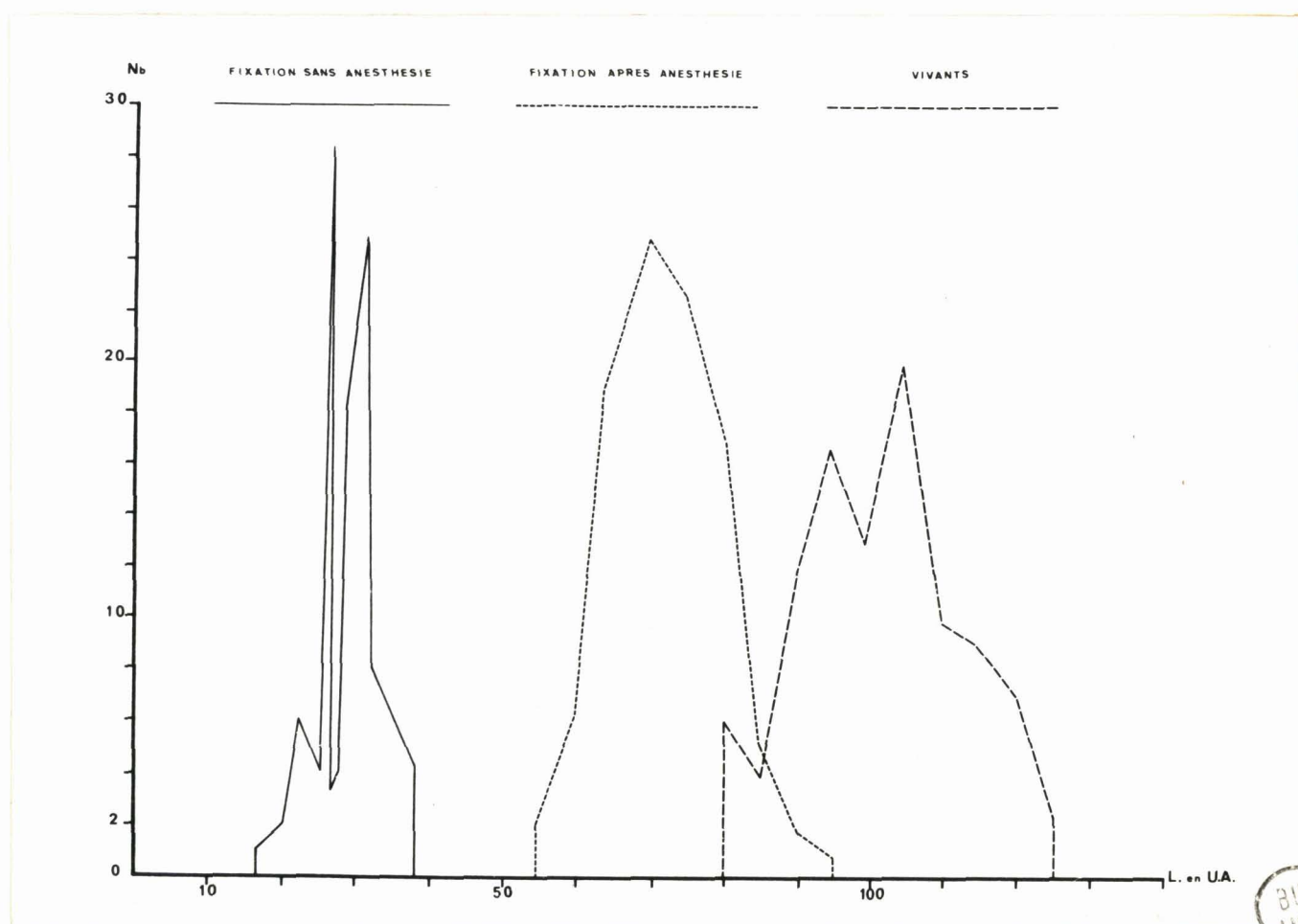


Fig 1 : Série expérimentale moyenne, en portant en abscisse la longueur des individus (en U.A) et en ordonnée le nombre d'individus. La première courbe renseigne sur la longueur des animaux contractés lors de la fixation, la seconde sur la longueur des animaux fixés après anesthésie. Ces deux courbes sont comparées à celle tracée d'après la longueur des animaux vivants.

Avec ces mêmes données, nous avons procédé à des mesures de surfaces de projection du Spirostome (car ce critère doit nous servir pour des expériences ultérieures), avec un papier millimétré.

- Surface moyenne d'une photographie de Spirostome vivant : 9 (en U. A.)
- Surface d'une photographie (au même grossissement) d'un Spirostome anesthésié : 7
- Pour un Spirostome contracté : 3

Disons simplement ici que ce critère est satisfaisant, compte tenu du phénomène géométrique de la contraction (augmentation du diamètre moyen de l'animal). Ces notions seront reprises dans la seconde partie.

Les mesures de volumes, particulièrement intéressantes ici, seront examinées dans une autre série expérimentale et discutées dans la dernière partie de ce mémoire.

Ces résultats amènent certaines remarques :

- Les mesures sur des animaux vivants sont assez difficiles à effectuer de façon précise, les Spirostomes étant très mobiles, même dans le méthocel. Celui-ci peut d'ailleurs amener quelques légères modifications.
- Toute fixation semble amener une légère rétraction du matériel biologique.
- Enfin, il est possible de faire un tri. En effet, les chiffres tiennent compte de toutes les mesures effectuées. Cependant nous pouvons négliger les Spirostomes imparfaitement fixés en pleine extension et conserver les animaux les plus longs, ce qui constitue encore un nombre d'individus satisfaisant.

Cette technique au point, les images des coupes cytologiques que nous observâmes indiquèrent une très mauvaise fixation. Il nous a fallu alors résoudre cette nouvelle question, en tenant compte du but recherché : fixation topographique ou fixation cytochimique. Toutefois, il a été difficile de savoir qu'elle était celle qui se rapprochait le plus de la réalité. Nous avons été obligés, pour cela, de nous aider de microphotographies ultrastructurales.

3°) Problème de la fixation

En effet, cette possibilité, pour le Spirostome, de se contracter très brutalement doit être en relation avec la fluidité et le peu de densité du cytoplasme, ce qui semble justifier la difficulté de la fixation.

Dans des conditions dites normales, le Spirostome se fixe très mal, quel que soit le fixateur utilisé et quel que soit le temps de fixation (parfois de $\frac{1}{4}$ d'heure à 24 heures). A température du laboratoire, le fixateur de Helly (avec ou sans formol) montre de larges déchirures dans le cytoplasme. (Pl II, fig a). D'autres fixateurs : le Bouin, le Bouin-Hollande, le Duboscq-Brasil, le formol 10 p 100, le formol 4 p 100 tamponné, l'alcool acétique, le Flemming, la glutaraldéhyde, ont donné des résultats variables, mais médiocres.

Pour nos besoins cytochimiques, nous avons surtout travaillé la fixation au Helly sans formol. A température ordinaire (18° C environ) la fixation est très mauvaise (Pl II, fig a). A froid (5° C) le réticule de l'endoplasme est plus ténu mais la Fig b de la pl II montre quand même de nombreuses petites ruptures. A 50° C ce réticule n'apparaît plus, mais de gros grains s'observent dans le cytoplasme (Pl II, fig c). Il semble que nous ayons ici un artéfact car, en microscopie électronique, ces grains ne correspondent à aucune structure. Aussi nous avons adopté une température de fixation d'environ 35° C. Bien que l'endoplasme apparaisse encore légèrement réticulé (Pl II, fig d), les formations granulaires n'apparaissent plus (Pl II, fig e).

Ces expériences ont été effectuées sur des animaux anesthésiés. Par contre, une fixation au Helly, à température ordinaire, sur des Spirostomes contractés (Pl II, fig f), amène une topographie différente de celle réalisée sur un animal en extension (Pl II, fig a).

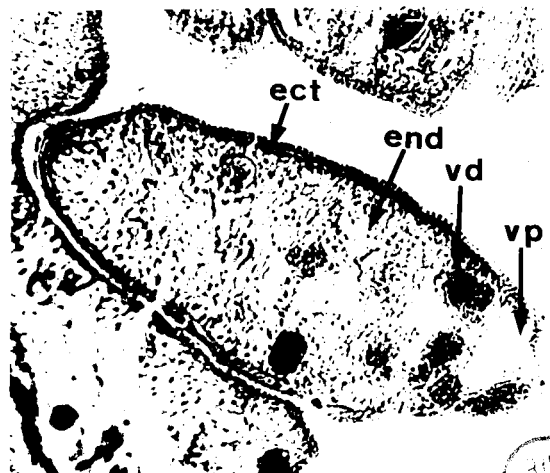
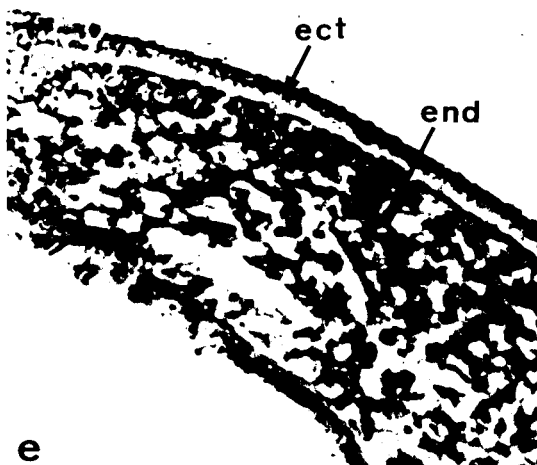
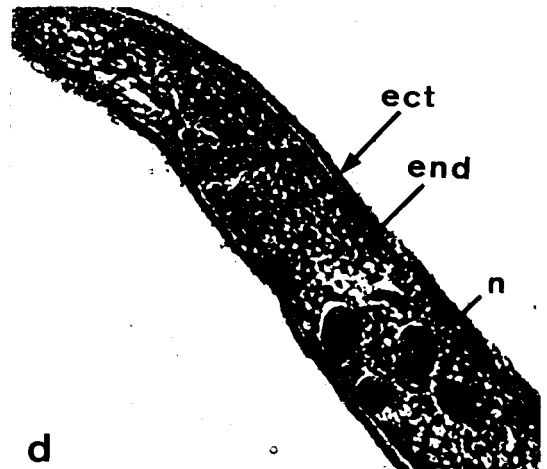
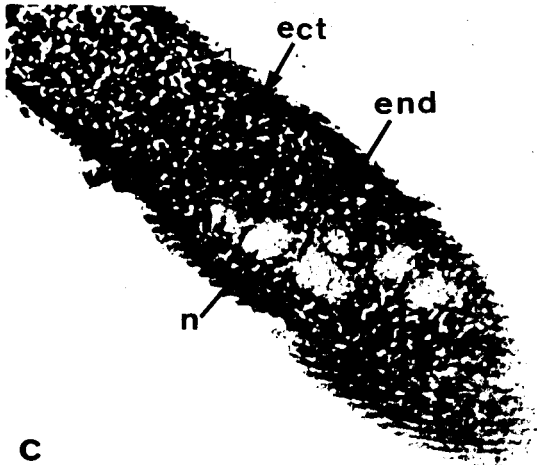
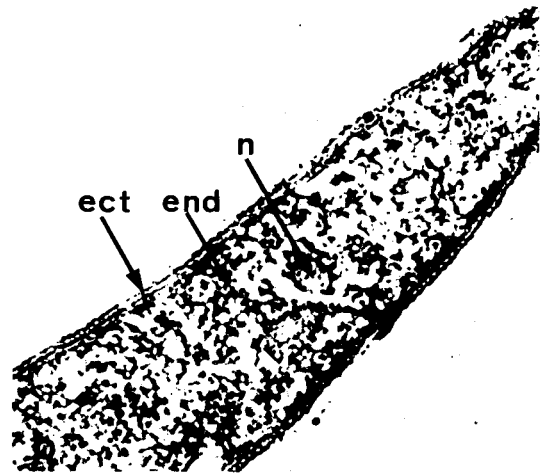
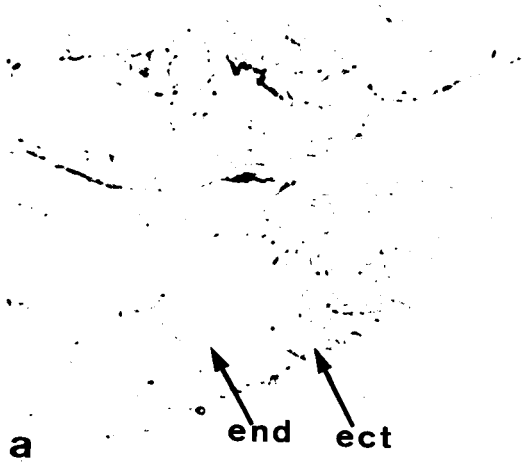
Donc l'anesthésie, la fixation, leurs interactions possibles avec la contraction doivent maintenant être discutées.

LEGENDES DE LA Pl II

- Fig a : Fixation au Helly à 18° C. Du fait de la mauvaise fixation, la coloration n'est pas très intense. Réaction à l'A. P. S. (acide periodique schiff). X 520.
- Fig b : Fixation au Helly à 5° C. L'endoplasme apparaît très délavé. Réaction A P S. X 520.
- Fig c : Fixation au Helly à 50° C. L'endoplasme est bourré de granules. Réaction A P S. X 520.
- Fig d : Fixation au Helly à 35° C. L'endoplasme, légèrement réticulé, s'est toutefois un peu rétracté. Réaction A P S. X 520.
- Fig e : Idem X 1300. On remarque des lacunes dans l'endoplasme (zones claires). Réaction A P S.
- Fig f : Spirostome non anesthésié et fixé au Helly. En plus de l'aspect réticulé du cytoplasme, on constate une concentration de vacuoles digestives vers la vacuole pulsatile. Réaction A P S X 520.

Abréviations utilisées : ect = ectoplasme ; end = endoplasme ; n = noyau ;
vd = vacuole digestive ; vp = vacuole pulsatile.





APR 1966

III/ - DISCUSSION DES PROBLEMES

1) Relations anesthésie-contraction :

a) Remarques

L'anesthésie se révèle être moins délicate à mener sur des animaux prélevés au fond du tube (ou tout au moins après la dislocation de l'anneau typique) que sur des animaux prélevés quelques heures après l'apport alimentaire bactérien. Cela peut s'expliquer, soit par un "tonus hyper-réactif" des fibres contractiles, soit par une "hypersensibilité" de l'organisme cellulaire fraîchement nourri.

Il nous a semblé aussi voir un rejet accéléré des vacuoles digestives (colorées accidentellement en rouge par des Bactéries ou des Algues ?) De toute façon, en cours d'anesthésie, nous avons pu observer un regroupement des vacuoles digestives du côté de la vésicule pulsatile. Cette migration peut aussi s'expliquer par un trouble du métabolisme, ou plutôt comme un phénomène consécutif aux différentes contractions (rappelons qu'il faut agiter légèrement le milieu de culture après l'impact de la goutte de chlorétone, ce qui amène une contraction temporaire de tous les individus). Il faudrait plutôt pencher vers cette seconde hypothèse, car, sur des animaux fixés sans anesthésie, nous obtenons aussi une prédominance de vacuoles digestives du côté de la vésicule pulsatile (Pl II, fig f).

Enfin, nous avons noté, en cours d'anesthésie, une perte de la "sensibilité mécanique", puis de la "sensibilité chimique". Cela correspond à des degrés différents de la même sensibilité. Il faut entendre par là que le Spirostome ne réagit plus à une excitation donnée, ce qui ne signifie peut-être pas que, de façon intime, il n'y ait pas sensible, mais qu'il est incapable d'y répondre. Il faudrait donc parler de la perte de la réactivité, plutôt que de la sensibilité.

b) Discussion

Il serait intéressant de connaître le mode d'action de l'anesthésique. Mais nous ne pouvons ici qu'émettre certaines suggestions

En microscopie électronique, de nombreux auteurs, parmi lesquels RANDALI (1956), YAGIU et SHIGENAKA (1963), FINLEY, BROWN et DANIEL (1964), GRAIN (1968) ont décrit un certain nombre de systèmes fibrillaires, parmi lesquels se trouveraient des fibres contractiles, ce qui sera démontré plus loin. Toutefois, ces descriptions ont été effectuées sur des Spirostomes contractés. Tout cela sera discuté dans la dernière partie de cet exposé.

L'action des myonèmes ne se manifeste pas. Cela nous pouvons l'affirmer, puisque l'animal ne se contracte pas. Ce que nous ne pouvons pas affirmer, c'est s'il s'agit d'une action directe ou indirecte de l'anesthésique sur les fibres contractiles. Si l'on se réfère au sens étymologique de ce mot anesthésique, on trouve : perte de la sensation ; ce qui implique une perte des fonctions où interviennent les éléments nerveux en cause. NICLOUX (1933) trouve que le système nerveux renferme beaucoup plus d'anesthésique que le muscle. Mais ces expériences ont été effectuées sur des vertébrés. Le problème devient encore plus complexe quand on s'adresse à des animaux inférieurs, où les fonctions sont plus difficilement rattachables à un organe bien précis.

TARTAR (1961) nie les concepts de "neurophanes" de NERESHEIMER (1903) ou de "neuroïds" décrits par DIERKS (1926) sur le Stentor (autre Cilié contractile). Il les impute à des artéfacts de fixation ou même d'observations. Toutefois, en testant le curare et la strychnine cet auteur a réussi à couper des Spirostomes et des Stentors, sans contraction. Cependant les cils battent toujours. MAYER (1961) arrive à faire contracter des Spirostomes en faisant agir de l'adrénaline, de la scopolamine, de la novocaïne. Nous-même (LEGRAND, 1968) avons obtenu des fixations en extension avec le chlorétone. Agissant (comme le chloral) comme hypnotique sur des Vertébrés, il est logique de localiser son action au niveau

d'éléments nerveux. Mais doit-on franchir le fossé qui sépare les Protozoaires des êtres plus organisés ? L'expérimentation est encore insuffisante pour conclure et le problème demeure encore entier : y-a-t-il ou n'y a-t-il pas de relais neuro-moteur ? JAHN et BOVEE (1967), analysant toutes ces données, ne peuvent tirer de conclusions quant à une "physiologie nerveuse".

Les relations éléments nerveux - éléments contractiles ne sont pas évidentes et doivent encore faire l'objet de recherches. Toutefois les liens entre le pouvoir de contraction et l'état du cytoplasme peuvent être précisés.

2°) - Relations fixation-contraction :

L'observation sur un animal vivant nous donne une impression d'homogénéité cytoplasmique. Or, l'observation cytologique des coupes nous montre l'endoplasme très fortement réticulé (BISHOP, 1927 ; FINLEY, 1951 ; RANDALL, 1956).

Le fixateur doit avoir une influence très sensible sur la coagulation des protéines endoplasmiques. Aussi, en jouant à la fois sur la qualité du fixateur et sur la température de la fixation, on doit trouver une coagulation optimum de l'endoplasme. Celle-ci, trop labile à température ordinaire, amène de larges déchirures. Une coagulation trop dure (à 55° C) amène au contraire la formation de grains aberrants.

En microscopie photonique, que ce soit sur des animaux non anesthésiés et fixés ou sur des animaux tués en extension, nous observons toujours un réticule. Toutefois la fixation d'un Spirostome non anesthésié est plus facile que celle d'un animal anesthésié. Le réticule de l'endoplasme est en effet plus tassé et donc la coagulation protéique est plus dense. Au contraire, sur un Spirostome en extension, le cytoplasme, beaucoup plus lâche, donne un coagulum plus fragile.

L'anesthésique ne gêne donc pas la fixation et n'est pas responsable de la formation d'un réticule. Seule la conservation en extension du Spirostome rend cette opération plus délicate, du fait même de la densité du cytoplasme. Nous confirmerons cette solution par la

microscopie électronique. FINLEY (1951) envisage fortement l'hypothèse d'un artéfact, sous l'action d'un fixateur liquide. La microscopie électronique semble confirmer cette hypothèse, car nos recherches ne montrent pas de membrane réticulaire, mais simplement des amas de cytoplasme entourés de "vide". Mais nous devons terminer ce paragraphe en posant un nouveau problème : ce réticule existe t-il sur le Spirostome vivant ? Cette question doit en effet se poser, car, nous l'avons déjà vu, la contraction amène une forte réduction de volume de l'animal. Si cette diminution de volume se fait par perte d'eau, à quel état se trouve celle-ci dans la cellule ? sous forme dispersée ou dans les trous du réticule ? En ce dernier cas seulement, cette "maille cytoplasmique" serait justifiée. Or il y a un système de vacuole pulsatile qui semble mal cadrer avec cette dernière hypothèse, car il est très développé.

Contentons nous ici de poser le problème. Il sera délicat à résoudre, car l'examen d'un Spirostome vivant ne peut être précis et l'expérimentation semble limitée.

La méthode d'anesthésie par le chlorétone, facile à mener, donne des résultats très satisfaisants pour une bonne conservation de la longueur du Spirostome et, en plus, sur un nombre important d'individus.

Elle a permis aussi d'aborder le problème des éléments neuro-moteurs. Seules des expérimentations rigoureuses et des recherches ultrastructurales très poussées pourront apporter une réponse.

Avant de reprendre la polémique des éléments sensitifs, il nous faut d'abord démontrer l'existence réelle des fibres appelées jusqu'ici, chez le Spirostome, fibres contractiles. Quels sont les stimuli intra ou extra cellulaires qui sont responsables de la contraction. Ce type de contraction est-il particulier ou son étude physiologique permet-elle de le placer dans le processus général ?

II - PROBLEMES RELATIFS A LA PHYSIOLOGIE
DE LA CONTRACTION

Nous savons, par les descriptions des auteurs précédents, qu'il existerait, chez le Spirostome, une formation contractile, ou prétendue telle, appelée myonème.

Si cette structure est réellement contractile, elle doit régir aux stimulants ou inhibiteurs chimiques du processus de contraction en général. C'est pourquoi nous avons expérimenté l'ATP et les différents sels susceptibles d'influencer ce phénomène. Ensuite, nous avons fait agir ces éléments en association et nous avons pu démontrer qu'il existait un véritable équilibre biologique et chimique de cette contraction. Cet équilibre est fonction de la qualité des sels, mais aussi de leurs concentrations et des pH qu'ils déterminent. Cette balance est nécessaire au bon fonctionnement de l'ensemble.

Ces manipulations sur des Spirostomes vivants, en saignée, ont eu pour but, aussi, de déterminer quelle était la meilleure solution de contraction agissant sur les fibres qualifiées de contractiles. Mais il restait à démontrer que cette action avait bien lieu au niveau des myonèmes.

I) - ROLE DE L'ATP ET DES SELS :

La contraction musculaire est une réaction énergétique. L'intervention de l'ATP (acide adénosine triphosphate) est donc nécessaire. Celle-ci a d'ailleurs fait l'objet de nombreuses recherches et, notamment ZIMMERMAN (1962) a mis en évidence la pénétration de l'ATP dans une Amibe. On connaît également le rôle important joué par le calcium et le magnésium.

Le mode opératoire a été le même pour toutes les expériences : les Spirostomes sont placés dans une saignée, avec toujours la même quantité

de liquide. Les solutions versées, à des concentrations variées, sont ajustées à des pH différents par de l'HCL à 0,1 N ou NaOH à la même molarité. Dès que l'on introduit une solution quelconque, il y a toujours, au départ, une contraction due à l'excitation physique du jet de liquide de la pipette. Dans nos interprétations, nous n'en tenons pas compte.

Il faut rappeler ici que l'on n'observe pas de contraction continue longue, mais des contractions-détentes. Le comptage des réactions constitue une moyenne, calculée à partir d'une dizaine de Spirostomes. Ces chiffres ne sont donc pas absolus, car l'on peut, parfois, enregistrer des différences entre les individus. Les graphiques représentent les schémas simplifiés des réactions du Cilié. Nous avons volontairement limité la durée de nos expériences à 15 mn.

1°) Rôle de l'ATP :

Nous allons faire référence au tableau I, aux planches III, IV et à la Figure 2.

La première colonne du tableau I, rend compte de la contraction mortelle du Spirostome correspondant à la solution d'ATP, sans ajustage de pH. Ces réactions ne sont pas significatives de la molécule, mais de l'acidité du milieu ; en effet, de l'eau additionnée d'HCL (à pH = 3,5) amène les mêmes résultats. Aux pH acides l'action de l'ATP est peu nette et ne commence réellement qu'à pH = 6,8, pour être vraiment nette à pH = 7. Avant ce pH neutre, les contractions-détentes étaient rares (annoté simplement "rares" dans le tableau). Cependant ces contractions sont léthales (cf. quelques phases de ces réactions sur la planche III). A pH = 8, nous retrouvons des contractions mortelles dues cette fois-ci à l'ATP seul car, l'eau, au même pH, n'a aucune action.

La plus forte molarité, amène un plus grand nombre de contractions-détentes, mais entraîne une mort plus précoce (pl IV).

TABLEAU I : A T P EN SOLUTION AQUEUSE

pH \ %	3,5	5,5	6,5	6,8	7	8
0,01 M	Contraction : immédiate	En 15 sec 2 ou 3 contr-dét	En 15 sec 2 ou 3 contr-dét	En 1 mn 6 ou 7 contr-dét	En 1 mn 30. 12 à 15 contr-dét	Contraction : immédiate
		rares	rares	rares	ralen- tissement	
	30 sec : mort	15 mn Sp.	15 mn Sp	15 mn Sp	5 mn <u>mort</u>	45 sec.
	contracté : ($\frac{1}{2}$ longueur)	à peu près : normaux	à peu près : normaux	à peu près : normaux		<u>Mort</u>
0,005 M	Contraction : immédiate	En 30 sec 5 ou 6 contr-dét	En 15 sec 2 ou 3 contr-dét	En 30 sec 6 ou 7 contr-dét	En 1 mn. 10 à 15 contr-dét	En 20 sec. 3 ou 4 contr-dét
		rares	rares	rares	déforma- tions	déforma- tions
	1 mn : mort	15 mn Sp	15 mn Sp	15 mn Sp	10 mn <u>mort</u>	3 mn <u>mort</u>
	contracté : ($\frac{1}{2}$ longueur)	normaux	normaux	normaux	à peu près	
0,001 M	Contraction : immédiate	En 30 sec 5 ou 6 contr-dét	En 10 sec 1 ou 2 contr-dét	En 10 sec 3 ou 4 contr-dét	En 40 sec 8 à 10 contr-dét	En 30 sec 3 ou 4 contr-dét
		rares	rares	rares	rares	déformation :
	1 mn 30 sec : <u>mort</u>	15 mn Sp	15 mn Sp	15 mn Sp	15 mn Sp	10 mn
	contracté : ($\frac{1}{2}$ longueur)	normaux	normaux	normaux	à peu près : normaux	<u>mort</u>



LEGENDES DE LA PLANCHE III

Il s'agit de quelques phases enregistrées lors de l'étude de l'action de l'ATP à 0,005 M et pH = 7, sur le Spirostome vivant.

Fig a : Spirostome vivant.

Fig b : Spirostome contracté.

Fig c : Spirostome relâché après une contraction

Fig d : Spirostome mort, environ 10 mn après le début de l'expérience.

L'échelle indiquée en bas et à droite de chaque photographie représente environ 100 μ .

a



I

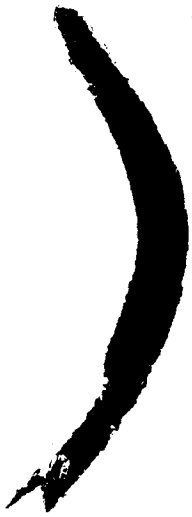
b



I



c



I

d



I



LEGENDES DE LA PLANCHE IV

Il s'agit de la représentation graphique schématisée des contractions-détentes du Spirostome, en présence de concentrations variables d'ATP, à pH 7.

Graph I : ATP à 0,01 M. Après quelques contractions-détentes, la mort intervient au bout de 5 mn (schématisée par un point sur le graphique).

Graph II : ATP à 0,005 M. Les contractions-détentes sont moins importantes, mais la mort intervient plus tard.

Graph III : ATP à 0,001 M. Les quelques contractions-détentes enregistrées n'entraînent plus la mort de l'animal, tout au moins pendant la durée de l'expérience.

Comme pour les autres graphiques, la durée de l'expérience (en minutes) est portée en abscisse, la longueur de l'animal (en points de repère : $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$, Long. totale) est en ordonnée.



PI. IV — ATP = variable

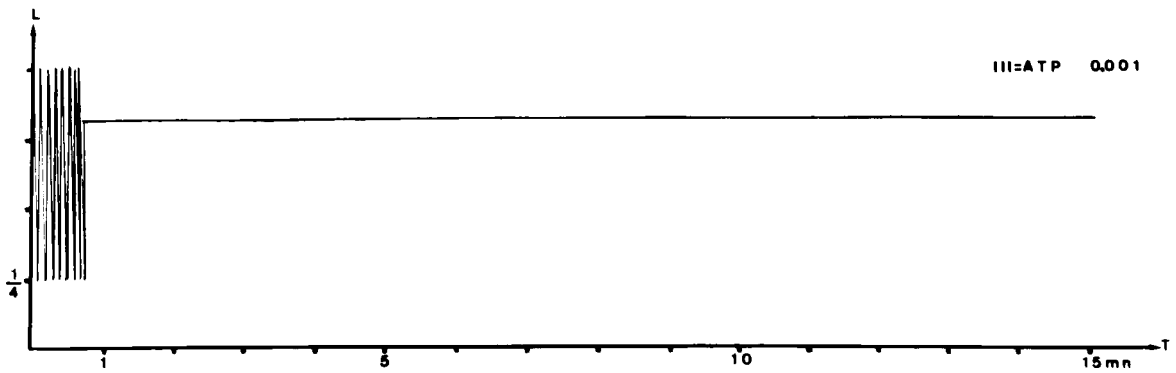
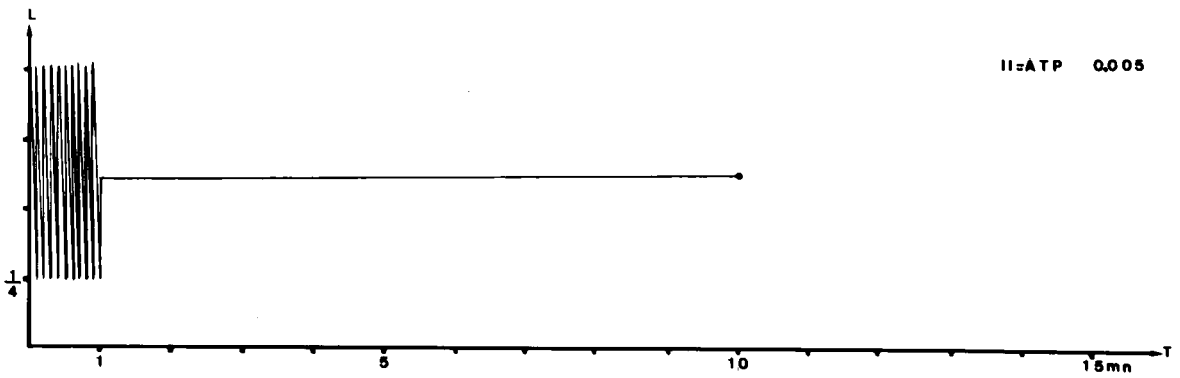
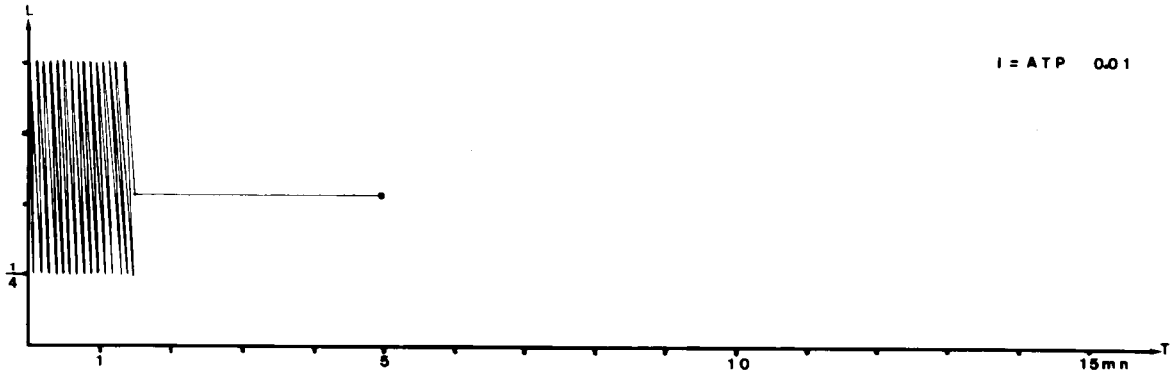


Fig 2 — ATP fonction du pH

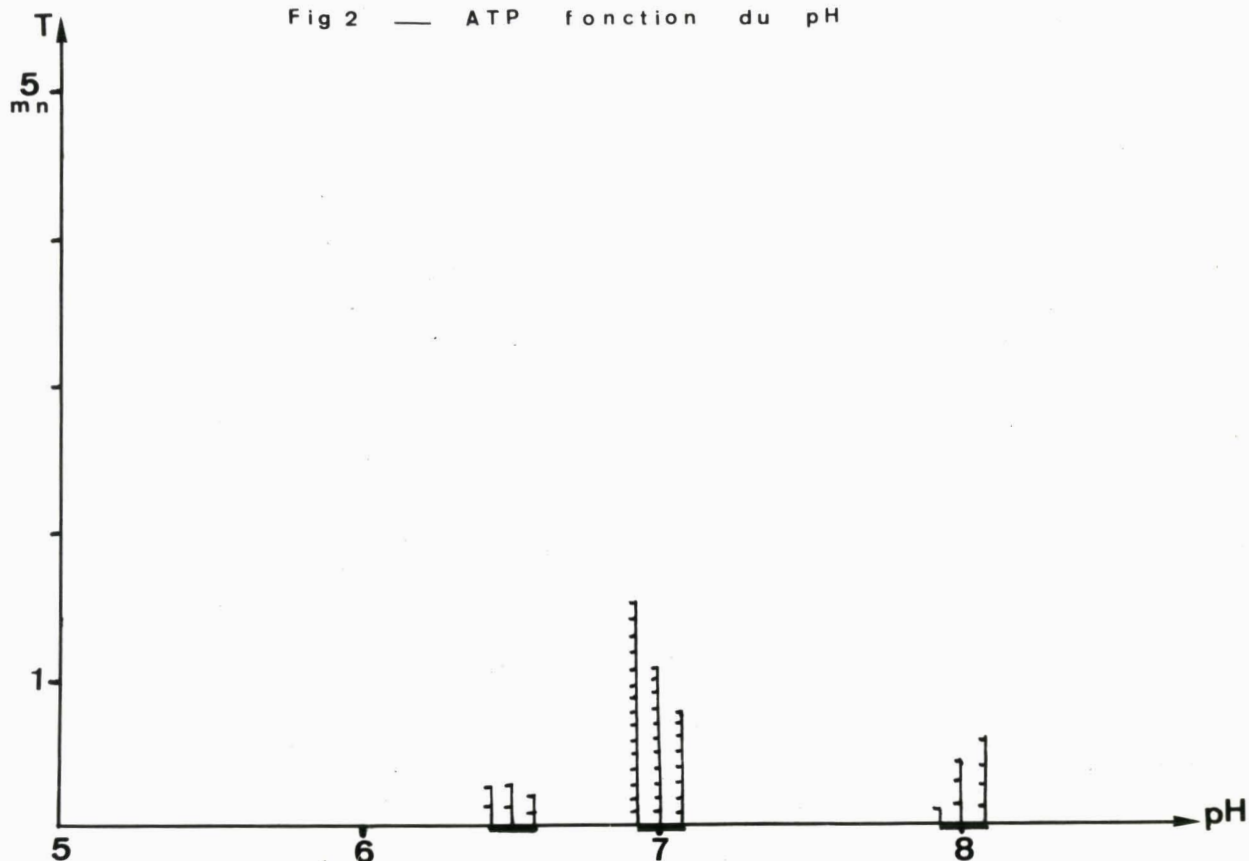


Fig 2 : Durée des contractions-détentes en fonction du pH. La répétition des petites barres représente la densité des contr-détentes. Le premier trait représente la solution à 0,01 d'ATP, le deuxième la molarité 0,005 M et enfin 0,001 M d'ATP pour le dernier tracé.

Le pH semble avoir une grande importance. A priori, sa latitude est très faible. Les réactions dues à l'ATP, comme le montre la Fig 2, ne commencent qu'après $\text{pH} = 6,8$ et se terminent à $\text{pH} = 7,2$.

En conclusion, l'ATP seul en solution, provoque indiscutablement des contractions-détentes, à $\text{pH} 7$. Mais elles sont toutes mortelles. Donc, du point de vue biologique, il ne peut intervenir seul. Mais avant de l'associer à certains sels, il est logique d'étudier l'action de ces sels, seuls afin de cerner les possibilités d'association. Nous allons commencer par tester le chlorure de calcium.

2°) - Solutions de chlorure de calcium :

Le tableau II ne tient plus compte que des 3 pH suivants : 6, 7 et 8, avec des solutions de CaCl_2 allant de 0,3 M à 0,003 M.

A de fortes concentrations (0,3 M ou 0,15 M) les contractions ou contractions-détentes sont toutes mortelles, quelque soit le pH. Les Spirostomes meurent à moitié contractés. Comme le montre le tableau II, la durée des réactions diminue avec l'augmentation de pH, alors que la mort intervient plus tôt. On peut cependant noter que la latitude de pH est plus importante que celle offerte à l'action de l'ATP.

Cependant, comme le montrent les graphiques de la pl. V, l'intervention de la mort est directement liée à la molarité de la solution.

A la concentration de 0,075 M, les réactions de contraction ne sont plus préjudiciables à la vie de l'animal, même après 30 mn d'expérience, sauf peut-être pour le pH basique, ce qui rejoint notre affirmation du début de ce paragraphe.

Aux molarités de 0,03 ou 0,003, aucun phénomène particulier n'est enregistré, même après 1 heure d'expérience.

En conclusion, on peut dire que le CaCl_2 en solution, à certaines concentrations, peut provoquer des contractions-détentes, qui sont pratiquement toutes mortelles. Le pH doit être moins rigoureux que celui de l'ATP, ce qui semble justifier l'extrême spécificité d'action de celui-ci. Testons maintenant les mêmes molarités de MgCl_2 (chlorure de magnésium).

TABLEAU II : CaCl₂ EN SOLUTION AQUEUSE

%	pH :		
	6	7	8
0,3 M	en 50 sec contraction	en 30 sec contraction	en 20 sec. contraction
	léger relâchement	léger relâchement	léger relâchement
0,15 M	en 1 mn 10 : <u>mort contracté</u> ($\frac{1}{2}$ longueur)	en 1 mn <u>mort contracté</u> ($\frac{1}{2}$ longueur)	en 50 sec. <u>mort contracté</u> ($\frac{1}{2}$ longueur)
	en 12 mn 30 contr-dét	en 7 mn 20 contr-dét	en 6 mn 10 contr-dét
0,075 M	en 15 mn <u>mort contracté</u> ($\frac{1}{2}$ longueur)	en 8 mn <u>mort contracté</u> ($\frac{1}{2}$ longueur)	en 7 mn <u>mort contracté</u> ($\frac{1}{2}$ longueur)
	en 20 mn q. q. contr-dét	en 20 Mn q. q. contr-dét	en 15 mn q. q. contr-dét.
0,03 M	en 30 mn sp. normaux	en 30 mn sp. normaux	en 30 mn sp. contractés.
	/	/	/
0,003 M	/	/	/



LEGENDES DE LA PL V.

Il s'agit de l'étude des réactions du Spirostome vivant, à différentes concentrations de CaCl_2 , à $\text{pH} = 7$.

Graph I : CaCl_2 à 0,3 M. La réaction est rapidement mortelle.

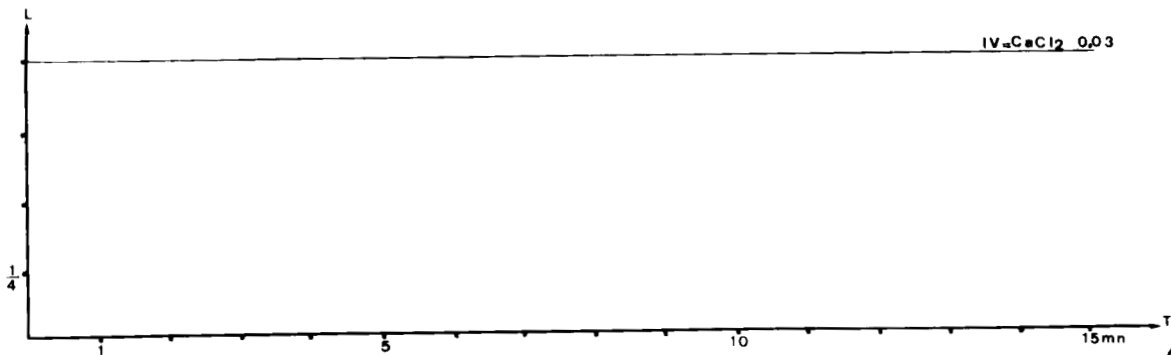
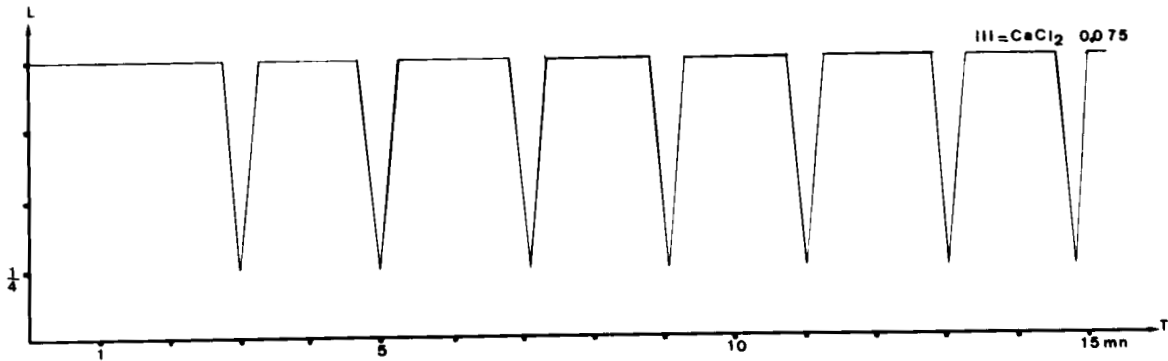
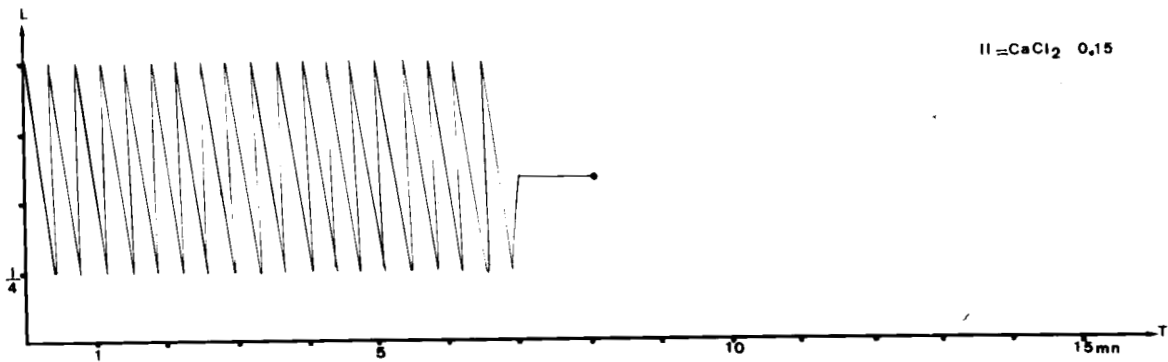
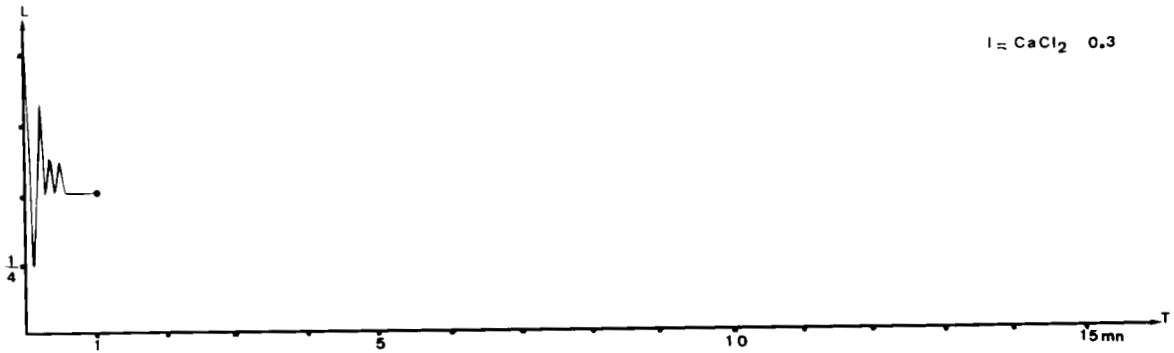
Graph II : CaCl_2 à 0,15 M. Après des contractions-détentes régulières, la mort intervient en général au bout de 8 mn.

Graph III : CaCl_2 à 0,075 M. Les contractions-détentes sont assez peu nombreuses (de l'ordre d'une dizaine), mais, en général, ne sont plus mortelles. (tout au moins à la fin de l'expérience).

Graph IV : Que ce soit aux concentrations de CaCl_2 de 0,03 M ou 0,003 M, on n'observe aucune réaction.



Pl. V — $\text{CaCl}_2 = \text{variable}$



3°) Solutions de chlorure de magnésium

Comme l'indique le tableau III, toutes les réactions provoquées par les solutions de $MgCl_2$ sont mortelles. La durée des contractions-détentes, pour une même molarité, diminue avec l'augmentation de pH. Il en est de même pour la durée de vie. Nous avons donc ici un phénomène comparable à celui décrit précédemment pour le calcium.

Si l'on examine le tableau III, on voit nettement que, à un pH déterminé, la durée de vie de l'animal diminue avec l'augmentation de la molarité de la solution. Toutefois, à des concentrations de 0,03 M ou moins, on n'observe plus rien. Les schémas des réactions ressembleraient à ceux de $CaCl_2$.

Toutefois, l'action du $MgCl_2$ semble être plus "dure" que celle du $CaCl_2$, car les animaux meurent plus rapidement, même à la concentration de 0,075 M, ce qui n'était pas le cas pour les solutions de $CaCl_2$. Par contre, ils meurent à peu près relaxés. Il serait possible d'obtenir, avec une solution de $MgCl_2$ comprise entre 0,075 M et 0,03 M, une sorte d'anesthésie.

Tout comme précédemment, la tolérance de pH est plus grande que pour l'ATP.

On doit se demander si ce sont les seuls sels à pouvoir provoquer des contractions chez le Spirostome. Aussi nous allons essayer d'autres sels. Mais tout sel en solution doit s'ioniser. Donc le $CaCl_2$ devient $Ca^{++} 2 Cl^-$ et le $MgCl_2$ donne Mg^{++} et $2 Cl^-$. On peut donc se demander si c'est le cation ou l'anion qui provoque ces réactions de contractions. C'est cette interrogation qui a motivé le choix des sels suivants : le chlorure de baryum ($BaCl_2 = Ba^{++} 2 Cl^-$), le sulfate de manganèse ($Mn SO_4 = Mn^{++} SO_4^{--}$) et le chlorure de potassium ($KCl = K^+ Cl^-$).

TABLEAU III : SOLUTIONS DE $MgCl_2$

pH	6	7	8
0,3 M	en 1 mn : contraction en 4 mn : <u>mort</u>	en 1 mn : contraction en 3 mn : <u>mort</u>	en 45 sec : contraction en 2 mn : <u>mort</u>
0,25 M	en 5 mn : 25 contr-dét. en 8 mn : <u>mort</u>	en 5 mn : 15 contr-dét. en 7 mn : <u>mort</u>	en 3 mn : 15 contr-dét. en 4 mn : <u>mort</u>
0,075 M	en 12 mn : q. q. contr-dét déformations en 20 mn : <u>mort</u>	en 10 mn : q. q. contr-dét. déformations en 16 mn : <u>mort</u>	en 7 mn : q. q. contr-dét déformations en 10 mn : <u>mort</u>
0,03 M	/	/	/
0,003 M	/	/	/



4°) - Actions du chlorure de baryum, du sulfate de manganèse et du chlorure de potassium.

Le choix des sels s'est trouvé motivé par les valences des ions : CaCl_2 remplacé par BaCl_2 , MnSO_4 amène des ions nouveaux, et enfin les ions monovalents de KCl .

Comme le montre le tableau IV, les expériences ont été effectuées à $\text{pH} = 7$, afin d'en diminuer le nombre. Le BaCl_2 , seul, présente une certaine toxicité. Il semble y avoir une certaine analogie avec CaCl_2 , car, après quelques contractions-détentes, la mort intervient, tout au moins pour les concentrations de 0,15 et 0,075 M. Pour les autres molarités utilisées, seule une certaine immobilité se fait sentir. Toutefois les réactions n'ont pas l'ampleur de celles obtenues par le Ca.

Le MnSO_4 ne présente rien de particulier. Il n'a pratiquement aucune action.

Nous avons déjà eu l'occasion de citer l'action anesthésique du sulfate de nickel. Le KCl , à des molarités assez élevées, semble avoir le même effet relaxant. Paradoxalement, c'est à de plus faibles concentrations qu'il fait preuve d'une légère toxicité, et l'on note alors quelques contractions-détentes.

Il semble alors que ce soit surtout les cations des sels qui semblent importants, puisque des anions identiques, associés à des cations différents, ont des actions différentes. Certains sels, comme CaCl_2 semblent stimuler les contractions, tandis que d'autres, comme KCl , semblent accentuer les relâchements. Mais avant d'étudier ces équilibres complexes, voyons tout d'abord les associations d'ATP avec ces différents sels, car il ne faut pas oublier que beaucoup de contractions-détentes enregistrées jusqu'ici étaient mortelles.

TABLEAU IV - ACTIONS DU BaCl₂, MnSO₄, KCl à pH = 7.

sels %	BaCl ₂	MnSO ₄	KCl
0,15 M	en 10 sec. 6 contr-dét. immobiles après 10 sec	certaine immobilité	en 15 sec : contraction relâchement.
	en 4 mn <u>Mort contracté</u>	en 15 mn : Sp normaux, légère immobi- lité	en 15 mn : Sp normaux parfaite- ment immobiles.
0,075 M	en 40 sec. 3 contr-dét. immobiles après 40 sec. en 6 mn : <u>Mort contracté</u>	/	en 20 sec : contraction relâchement en 15 mn : Sp normaux parfaite- ment immobiles.
0,03 M	immobiles après 1 mn en 15 mn : certains sont <u>morts</u> , autres immobiles	/	en 30 sec : contraction relâchement. en 15 mn : Sp. Nor- maux peu mobiles
0,003 M	immobiles après 4 mn en 15 mn : Sp nor- maux, immobiles.	/	en 30 sec : contr- dét. déformations en 15 mn : Sp vivants: déformés
0,0003 M	Ralentissement des mouvements. en 15 mn : Sp. nor- maux, mvts ralentis.	/	en 30 sec : contr- dét. déformations en 15 mn : Sp vivants: déformés.

5°) - Conclusion :

L'ATP a lui seul est capable de provoquer des contractions. L'intensité de ces réactions est fonction de la molarité et du pH de la solution. A forte concentration (0,01 M) les contractions peuvent commencer à pH = 6,8. A plus faible, elles ne sont nettes qu'à pH = 7. Le fait que l'ATP, dans certaines conditions, provoque des contractions tenterait à prouver, déjà, que nous ayons à faire à un système contractile. Ce n'en est quand même que la première base, car il entraîne la mort de l'animal. Aussi il va falloir essayer de modifier son action. Avant de lui adjoindre des sels, nous avons voulu tester ceux-ci.

Le calcium semble moins toxique (on pénètre moins vite) que le magnésium, car la mort est plus longue à venir avec le CaCl_2 qu'avec le MgCl_2 . Après un certain temps de latence au départ, succèdent des contractions-détentes de grande amplitude, puis des secousses plus faibles, et la mort. Presque toutes ces réactions sont léthales.

Le choix des autres sels, comme nous l'avons vu, a eu pour but de trouver leur valeur dans le processus de contraction, mais aussi de déterminer les valeurs qualitatives des ions. Nous avons pu ainsi établir que c'étaient surtout les cations (Ca^{++} , Mg^{++} , et éventuellement Ba^{++} et K^+) qui intervenaient. Les anions seuls (Cl^- , SO_4^{--}) ne doivent avoir que peu d'influence.

Essayons donc maintenant d'associer ces éléments à l'ATP. Ces relations doivent exister, puisque nos premiers résultats confirment déjà les affirmations de JAHN et BOVEE (1967) : le CaCl_2 stimule la contraction et a pour antagoniste KCl. Nous allons donc associer maintenant l'ATP avec chacun des sels étudiés précédemment.

II) - ASSOCIATION DE L'ATP AVEC UN SEL :

Il nous faut partir sur des concentrations d'ATP de 0,01 M ou 0,005 M, car celle à 0,001 M donne des réactions beaucoup plus faibles. Nous sommes toujours à la recherche de la meilleure solution de contraction, ce qui justifie encore quelques tâtonnements.

Comme nous mélangeons plusieurs sels, il nous est apparu nécessaire d'y adjoindre un tampon. Il s'agit du tampon tris-maléate de Gomori, à pH = 7,2 et à 0,01 M. Ce tampon seul n'a aucune influence sur le Spirostome. Le mode opératoire est toujours le même.

Nous allons donc étudier les réactions du Spirostome, dues à l'association d'un des sels étudiés précédemment (en commençant par les concentrations les plus basses) avec l'ATP.

1°) - Association de l'ATP avec le chlorure de calcium :

Comme le montre le tableau V, les réactions sont extrêmement nettes. Pour la concentration (finale) d'ATP à 0,005 M (demi-tableau du haut), et pour une molarité de CaCl_2 à 0,003 M, on n'enregistre des réactions qu'à pH = 7. Ces contractions-détentes, très nombreuses au début, deviennent ensuite rares et, en fin d'expérience, les Spirostomes sont normaux. A des pH différents ou à une solution à 0,03 M de CaCl_2 , on n'observe rien.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec une solution d'ATP à 0,01 M, (partie basse du tableau). Les réactions, sont encore plus nettes à pH 7, avec la concentration de CaCl_2 la plus faible ; autrement, les contractions-détentes sont plus rares. On n'observe toujours rien, avec 0,03 M de CaCl_2 .

La Fig 3 montre de façon indiscutable l'importance du pH. Les petites barres représentent toujours la densité des réactions. On voit que la durée des contractions détentes est à peu près la même pour les 2 valeurs de l'ATP, seul le nombre de ces réactions est plus important pour la plus forte molarité d'ATP.

3115

TABLEAU V., ASSOCIATION DE ATP AVEC CaCl_2 (+ tampon 0,01 M).			pH
			%
ATP à 0,005. M TAMPON A 0,01 M VARIATIONS DE CaCl_2			
1 contr-dét.	Rien.	Rien	6
20 contr-dét en 4 mn.	Rares	Rien	7
1 contr-dét	Rien.	Rien	8
ATP à 0,01 M TAMPON à 0,01 M VARIATIONS DE CaCl_2			
2 contr-dét en 5 sec.	rare	rare	
35 contr-dét en 4 mn	rare	rare	
2 contr-dét en 15 mn : Sp normaux	rare	rare	
2 contr-dét en 15 mn : Sp normaux	rare	rare	
2 contr-dét en 15 mn : Sp normaux	rare	rare	
CaCl_2 0,005 M			
CaCl_2 0,03 M			

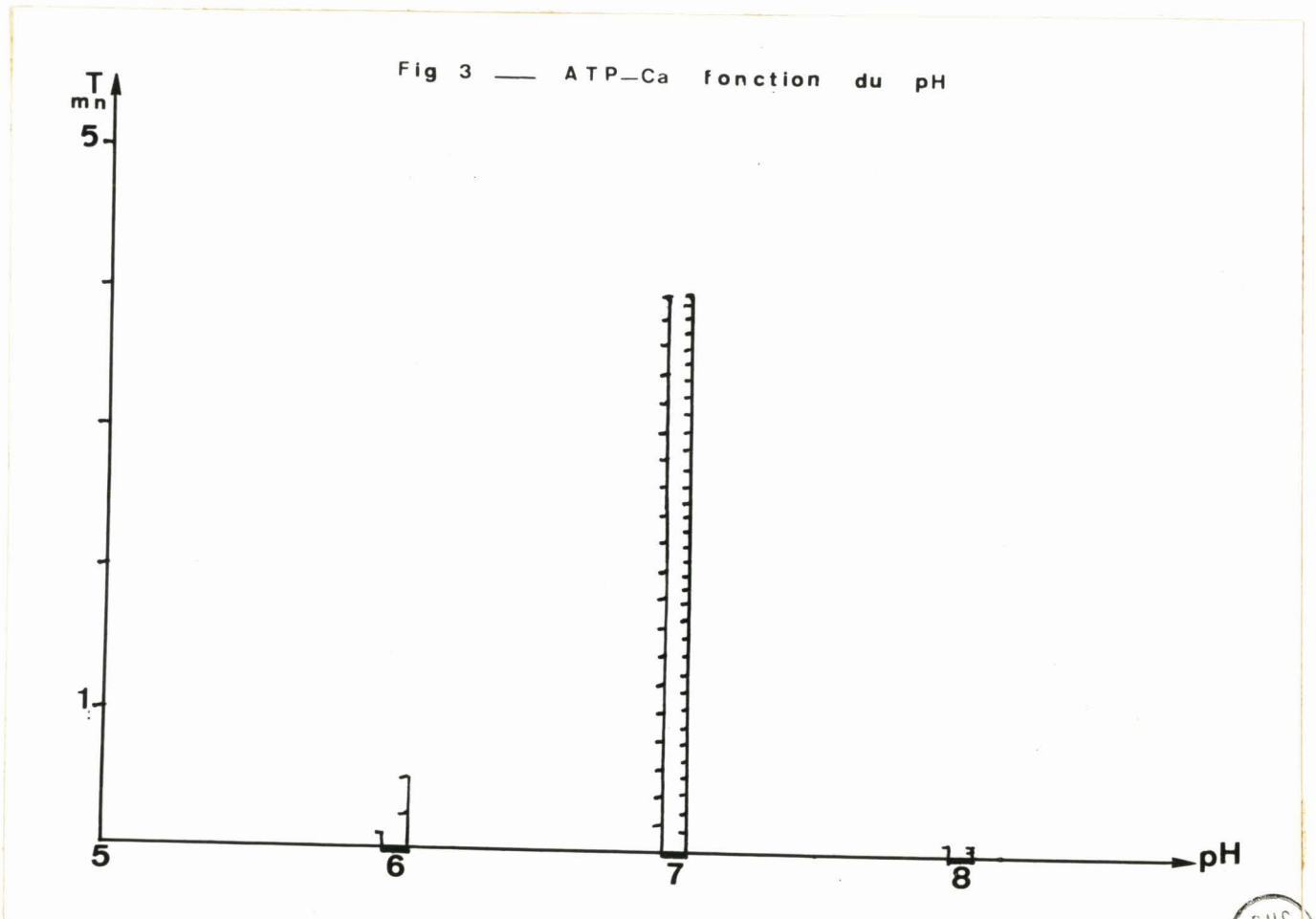


Fig 3 : Durée des contractions-détentes de la solution ATP 0,005 M + CaCl_2 0,003 M (1er trait) et de la solution ATP 0,01 M + CaCl_2 0,003 M (2nd tracé).

Plusieurs éléments apparaissent déjà ici. Tout d'abord les contractions ne sont plus mortelles. C'est un premier point très important, car cela prouve que nous sommes sur la bonne voie.

Les réactions se font typiquement à $\text{pH} = 7$, et à ce pH uniquement. Cela confirme l'importance du pH, déjà pressentie lors de l'étude de l'ATP.

Ces premiers résultats mettent aussi l'accent sur l'importance de la molarité du sel, ce qui fait que nous nous sommes arrêtés à la concentration de CaCl_2 de 0,03 M, sans expérimenter les autres. Nous reviendrons sur ce problème.

Remplaçons maintenant le CaCl_2 par le MgCl_2 .

2°) - Association de l'ATP avec le chlorure de magnésium :

La disposition du tableau VI est comparable à celle du tableau précédent.

Seules les concentrations de $MgCl_2$ de 0,003 M présentent un intérêt, car les autres ne donnent rien. Les contractions-détentes, rapides au début, deviennent ensuite rares. A l'association ATP 0,01 M, avec $MgCl_2$ 0,003 M, les réactions sont moins nettes et une certaine toxicité se fait sentir, ce qui explique probablement que les résultats soient moins bons qu'avec une concentration d'ATP inférieure (ce qui n'était pas le cas pour le calcium). Nous avons déjà remarqué (conclusion du 1er paragraphe) que le magnésium semblait être plus toxique que le calcium. Toutefois, ici, la toxicité provient de la présence simultanée des 2 éléments (ATP et $MgCl_2$).

L'importance du pH reste primordiale et celui-ci se situe toujours au voisinage de 7;

Voyons maintenant l'influence des autres sels.

3°) - Association de l'ATP avec un autre sel : (chlorure de baryum, sulfate de manganèse ou chlorure de potassium) :

Le tableau VII rend compte des expériences qui ont toutes été effectuées à pH = 7.

Les associations de l'ATP avec $Mn SO_4$ ne montrent aucune réaction, celles avec $BaCl_2$ ne semblent pas présenter grand intérêt. Certes, elles manifestent quelques contractions détentes, mais sont relativement minimes et peuvent être négligées.

Par contre la coexistence ATP - KCl est intéressante par ses réactions : les quelques contractions-détentes sont mortelles, en un temps très court. Il faut rappeler que le KCl seul aux mêmes concentrations, n'était pas mortel. Il se produit donc là un certain phénomène. Mais la solution ATP - KCl ne présente pas d'intérêt. Connaissant le rôle "relaxant" de KCl, il faudra le reprendre dans des associations plus complexes.

TABLEAU VI : ASSOCIATION DE L'ATP AVEC $MgCl_2$ (+ tampon 0,1 M).

%	pH :		
	6	7	8
	ATP à 0,005 M,	tampon 0,01 M	Variations de $MgCl_2$
$MgCl_2$ 0,005 M	1 contr-dét. rien en 15 mn Sp : normaux	20 contr-dét en 1mn30 rares en 15 mn : Sp normaux	3 contr-dét rares en 15 mn : Sp normaux
$MgCl_2$ 0,03 ² M	/	/	/
	ATP à 0,01 M	tampon 0,01 M	Variations de $MgCl_2$
$MgCl_2$ 0,00 ² M	5 contr-dét en 20 sec. rares en 15 mn : Sp normaux	10 contr-dét en 1 mn 30 rares en 15 mn : Sp immo- biles	6 contr-dét en 1 mn rares en 15 mn { déformations certains sont morts.
$Mg Cl_2$ 0,03 ² M	/	/	/



TABLEAU VII ATP à 0,005 M + TAMÉTON TRIS A 0,01 M + un sel, à pH = 7

sels : %	BaCl ₂	Mn SO ₄	KCl
0,015 M	légères déformations en 15 mn : Sp normaux	/	Contraction de quelques secondes relâchement Déformations en 4 mn : <u>Mort</u> contracté
0,003 M	2 ou 3 contr-dét. légère immobilité en 15 mn : Sp à peu près normaux	/	quelques contr-dét relâchement déformations en 5 mn : <u>Mort</u> contracté
0,0003 M	3 ou 4 contr-dét après 4 mn : déformations en 15 mn : Sp à peu près normaux	/	quelques contr-dét relâchement déformations en 5 mn : <u>Mort</u> contracté



4°) Conclusion :

Les contractions consécutives aux solutions d'ATP (0,01 M ou 0,005 M) ne sont plus mortelles en présence de CaCl_2 ou MgCl_2 . Ces 2 sels semblent donc être biologiquement nécessaires à la contraction, et ont des actions assez comparables. Les autres sels essayés n'ont guère montré d'influences, sauf KCl, qui a, au contraire, hâté les contractions mortelles. Dans nos expériences futures, c'est surtout la solution d'ATP à 0,005 M qui retiendra notre attention, car celle à 0,01 amène des troubles en présence de MgCl_2 .

Dorénavant, nos expérimentations se feront toutes à pH = 7, puisqu'à des pH différents, les réactions peuvent être négligées.

La pression osmotique de la solution de contraction est primordiale. Pour s'en convaincre, il suffit de remplacer le tampon tris-maléate 0,01 M, par la solution à 0,1 M. Si on l'ajoute à ATP 0,005 M + MgCl_2 ou CaCl_2 à 0,003 M, il ne se passe rien. Or le tampon lui-même n'intervient pas dans la réaction, si ce n'est par sa pression osmotique. Il serait d'ailleurs plus logique de parler de force ionique, car les sels, en solution aqueuse ont tendance à s'ioniser. Ce qui fait que si l'on augmente la concentration d'un sel, aucune réaction ne se produit (c'est le cas pour la concentration de Ca Cl_2 ou Mg Cl_2 de 0,03 M, au lieu de 0,003 M). Nous reparlerons de cette force ionique dans le prochain chapitre.

A ce stade, nous avons déjà les solutions de contraction possibles suivantes :

- tampon tris 0,01 M + ATP 0,01 M + Ca Cl_2 0,003 M. pH = 7
- tampon tris 0,01 M + ATP 0,005 M + Mg Cl_2 0,003 M. pH = 7

Mais ne peut-on pas obtenir de meilleurs résultats encore, en associant ces deux sels et, ensuite, en y ajoutant du KCl, qui jouerait un rôle antagoniste. Les interactions de ces différents éléments doivent être très importantes.

III) - EQUILIBRE BIOLOGIQUE

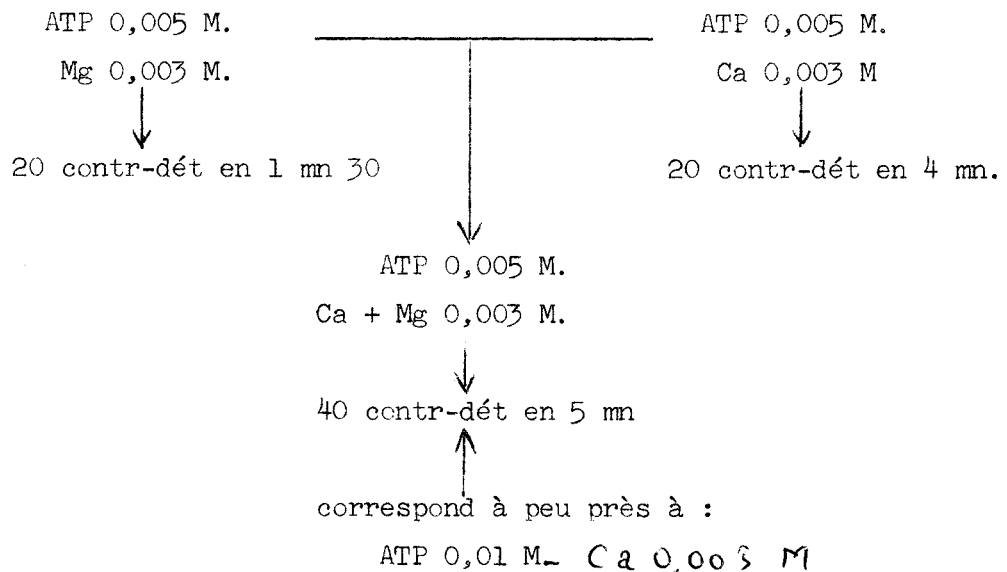
Le mode opératoire est toujours le même. Nous testons maintenant les associations de tous les sels étudiés précédemment, avec l'ATP. Dans un dernier temps, nous essaierons de voir si l'ATP reste toujours l'élément actif de cette contraction. Pour cela nous utiliserons des inhibiteurs et des activateurs spécifiques de cette molécule. Nous arriverons ainsi à déterminer un véritable équilibre biologique, où chaque élément aura son importance.

1°) - Association de l'ATP avec le chlorure de calcium et le chlorure de magnésium.

Le tableau VIII nous fait voir l'importance de la pression osmotique, ou plus exactement de la force ionique, puisqu'il s'agit d'une solution de sels. Dans n'importe quelle solution, si un sel est à une molarité de 0,03, il bloque la réaction du Spirostome.

Par contre, la coexistence de Ca et Mg, à des proportions égales de 0,003 M ou 0,0015 M, accentue nettement les contractions, comme le montre la pl VI.

La simultanité de ces deux ions semble avoir les mêmes conséquences qu'une augmentation de la concentration en ATP.



Le KCl peut-il encore améliorer ces résultats ?

TABLEAU VIII - ASSOCIATION (ATP 0,005 M ; TAMPON TRIS 0,01 M ; pH = 7)
% variables Ca et Mg

Ca et Mg à Concentrations identiques

Ca 0,03 M

Mg 0,03 M.

Ca 0,003 M

Mg 0,003 M

Ca 0,0015 M

Mg 0,0015 M

Ca 0,0003 M

Mg 0,0003 M

40 contr-dét. en 5 mn
rares
en 15 mn : Sp normaux.

30 contr-dét en 5 mn
rares
en 15 mn : Sp normaux

15 contr-dét en 2 mn
rares
en 15 mn : Sp. normaux

Ca et Mg à des concentrations différentes

Mg 0,03 M

Ca 0,003 M.

Mg 0,03 M

Ca 0,0015 M.

Ca 0,03 M

Mg 0,003 M

Ca 0,03 M.

Mg 0,0015 M



LEGENDES DE LA PL. VI

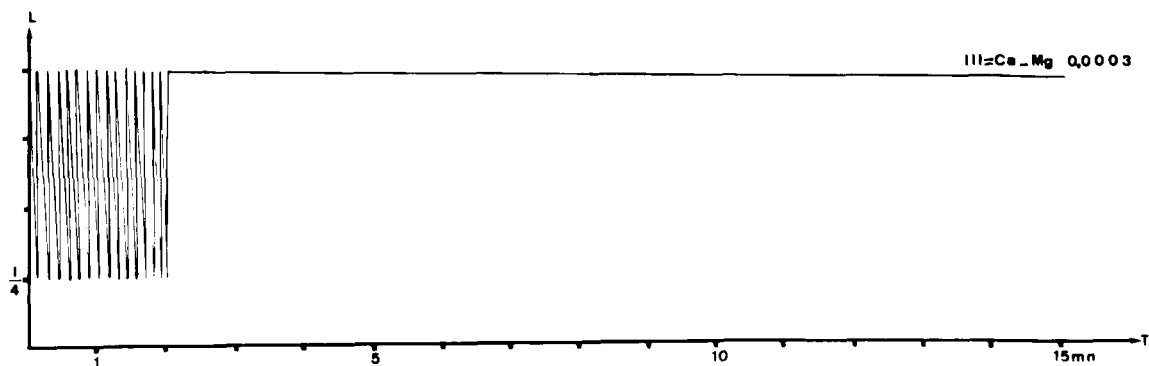
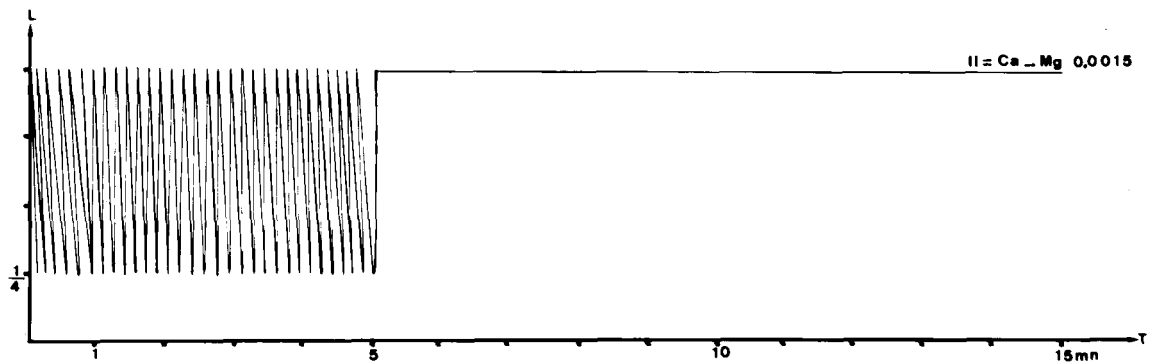
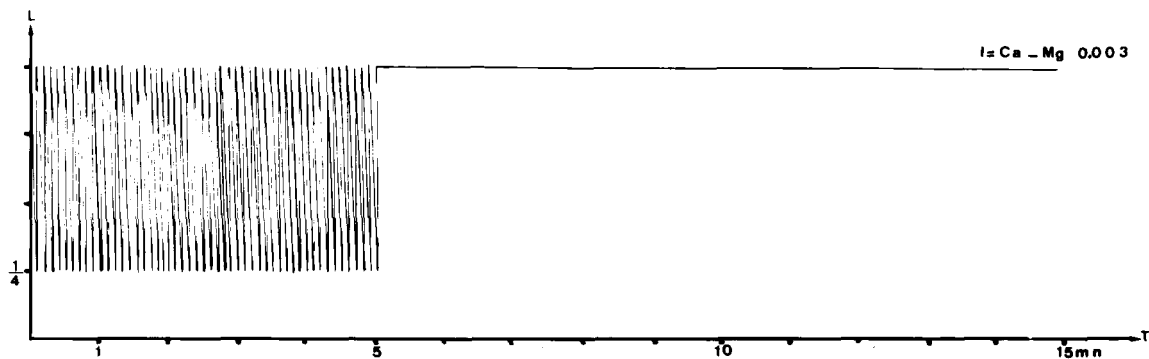
Il s'agit de l'association équimolaire de CaCl_2 et MgCl_2 à une solution d'ATP à 0,005 M et de tampon tris à 0,01 M, à $\text{pH} = 7$.

Graph I : CaCl_2 et MgCl_2 à 0,003 M chacun, associés à ATP 0,005 M :
une quarantaine de contractions-détentes en 5 mn.

Graph. II : CaCl_2 et MgCl_2 à 0,0015 M chacun, associés à ATP 0,005 M :
une trentaine de contractions détentes en 5 mn.

Graph. III : CaCl_2 et MgCl_2 à 0,0003 M chacun, associés à ATP à 0,005 M ;
une quinzaine de contractions-détentes en moins de 2 mn.

Pl. VI - ATP = 0.005 - Ca - Mg = variables



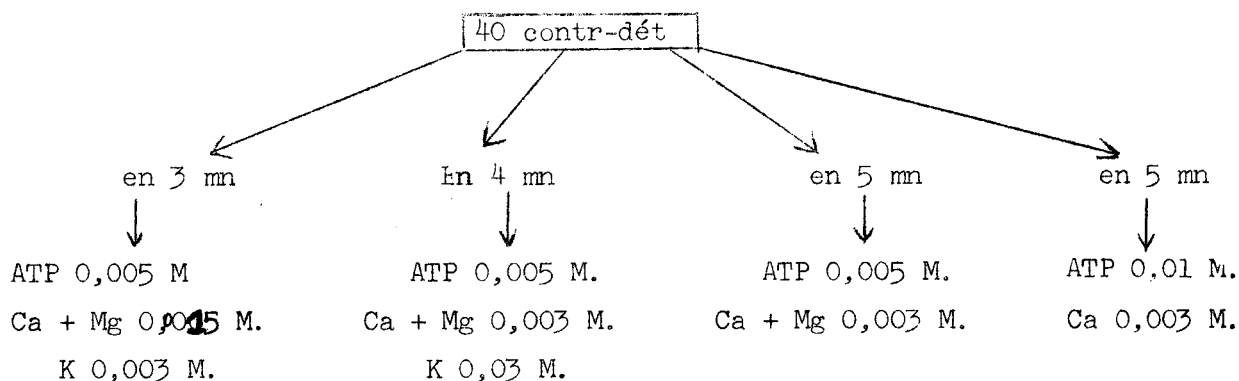
2°) Association de l'ATP avec le chlorure de calcium, le chlorure de magnésium et le chlorure de potassium

Comme prévu (tableau IX) l'addition de KCl a des effets très nets, surtout sur l'association Ca - Mg 0,0015 M. Elle est peut-être plus négligeable avec Ca - Mg 0,003 M. Nous pensons en effet que 40 Contractions-détentes doivent constituer une sorte de plafond, qu'il doit être difficile de dépasser.

Comme le montre la pl. VII, il existe aussi une concentration optimum de KCl. Elle est de 0,003 M pour l'équilibre Ca - Mg 0,0015 M et 0,03 M. pour Ca - Mg 0,003 M. Le phénomène est toujours le même : après des contractions-détentes très nombreuses, elles deviennent rares, et, ensuite, nulles (quelques phases sont reproduites sur la pl. VIII).

JAHN et BOVEE (1967) mettent l'accent sur l'importance de l'antagonisme entre CaCl_2 et KCl. Ceci est confirmé par nos expériences KCl n'influence pas le nombre de réactions, mais leur rapidité. Ces mêmes auteurs admettent que seuls les cations interviennent et parlent d'antagonisme entre les ions Li^+ , K^+ , Na^+ et les cations bivalents Ca^{++} , Si^{++} , Mg^{++} . Ceci est en plein accord avec nos résultats.

On peut se demander si l'ATP reste l'élément toujours actif de cette association.



Pour démontrer le bien fondé de cette affirmation, il faut enlever l'ATP ou l'inhiber. Ainsi, une solution identique à la solution de contraction, mais sans ATP, n'a donné aucune réaction. Les expériences d'inhibitions et d'excitations spécifiques de l'ATP vont confirmer ces résultats.

TABLEAU IX - ASSOCIATION ATP 0,005 M, tampon 0,01 M, pH = 7

Ca + Mg à 0,0015 M ou 0,003 M, % variables de KCl

% KCl.	sol initiale	ATP - tampon	ATP - tampon
		Ca + Mg à 0,0015 M.	Ca + Mg à 0,003 M.
0,03 M		5 contr-dét en 30 sec. rares en 15 mn : Sp à peu près normaux.	40 contr-dét en 4 mn. rares en 15 mn : Sp à peu près normaux.
0,015 M		30 contr-dét en 3 mn. rares en 15 mn : Sp normaux	plus d'influence idem tableau précédent (40 contr-dét en 5 mn).
0,003 M		40 contr-dét en 3 mn rares en 15 mn : Sp normaux	plus d'influence idem tableau précédent (40 contr-dét en 5 mn).
0,0003 M		30 contr-dét en 4 mn rares en 15 mn : Sp normaux.	plus d'influence idem tableau précédent (40 contr-dét en 5 mn)



LEGENDES DE LA PL VII

Il s'agit de l'adjonction de concentrations variables de KCl à une solution initiale comprenant, outre le tampon tris 0,01 M, de l'ATP à 0,005 M, du CaCl_2 et du MgCl_2 à 0,0015 M, toujours à pH = 7.

Graph I : + KCl à 0,03 M. Peu de réactions. Ceci étant certainement en liaison avec une force ionique trop forte.

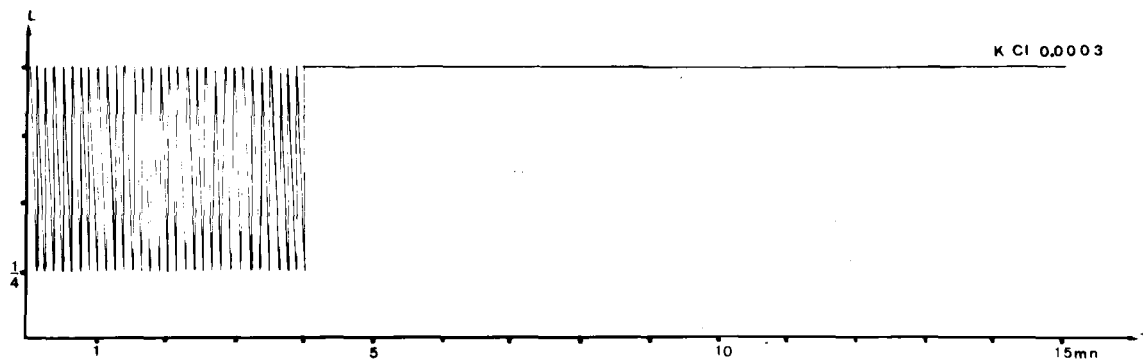
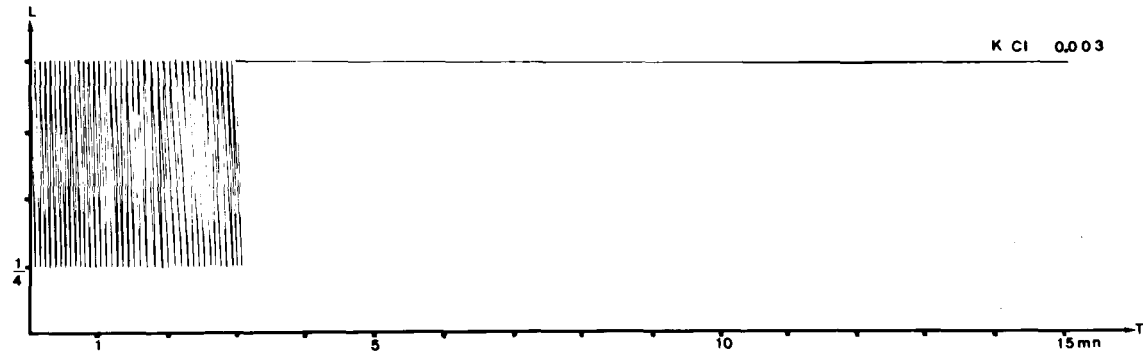
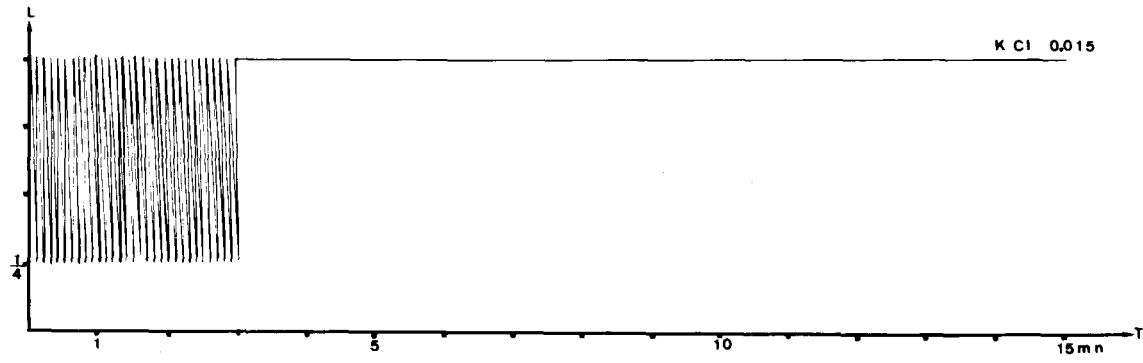
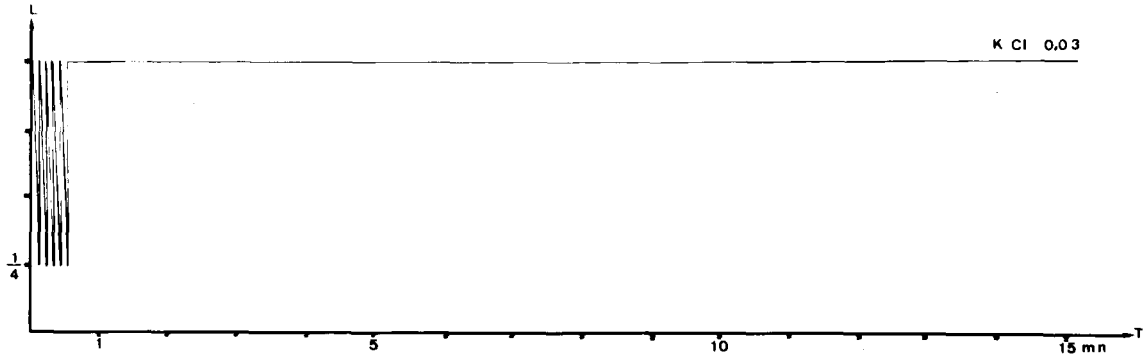
Graph II : + KCl à 0,015 M. Une trentaine de contractions-détentes en 3 mn.

Graph III : + KCl à 0,003 M. Une quarantaine de contractions-détentes en 3 mn.

Graph IV : + KCl à 0,0003 M. Une trentaine de contractions-détentes en 4 mn.



Pl. VII - ATP = 0005 - Ca-Mg = 00015 - K = variable



LEGENDES DE LA PL VIII

Il s'agit de l'étude photographique d'une réaction sur deux du Spirostome vivant réagissant à la solution suivante : tampon tris 0,01 M - ATP 0,005 M - CaCl_2 et MgCl_2 0,0015 M - KCl 0,003 M.

La rapidité des réactions (40 en 3 mm) ne nous a pas permis de les prendre toutes. C'est pourquoi, nous avons été obligés de prendre une contraction-détente sur deux. Ce qui fait donc une vingtaine de réactions, représentées ici. Les dernières contractions sont moins importantes que les premières, comme le montre cette sorte de film.





3°) Rôle des inhibiteurs et activateurs d'ATP :

KATZ (1962) interprète l'action de l'ATP comme empêchant la polymérisation de l'actine, surtout en présence de Ca^{++} , bloquant la réactivité des groupes - SH, qui provoquent la polymérisation et la contraction de l'actomyosine. Cela confirme l'hypothèse de SZENT-GYORGYI (1933) qui assure que l'actomyosine sans ATP est rigide.

Sans préjuger de la nature chimique des éléments contractiles du Spirostome, nous avons essayé, comme de nombreux auteurs, des poisons des groupements sulfhydriles (certains sels de mercure) comme inhibiteurs de l'ATP. SIMARD-DUQUESNE et COUILLARD (1962) utilisent le PCMB (p - chloromercuribenzoic acid) ou le PCMS (p - chloromercuriphenyl - sulfonic acid) pour les Amibes. ABE (1963) utilise le p - chloromercuribenzoate. Nous avons eu à notre disposition du salyrgan, (salicyl - hydroxymercure - methoxypopyl - amido - orthoacetate), utilisé déjà par KAPPNER (1961), toujours sur des Amibes. La levée de l'inhibition s'est faite par la cystéine.

Les résultats sont exprimés dans le tableau X et la pl. IX. La première case du tableau rappelle simplement les réactions témoins : solution de contraction normale, solution de salyrgan à 0,005 M et pH = 7, et enfin solution de contraction avec cystéine. La seconde partie du tableau rend compte des solutions d'expérimentation. Les Spirostomes reçoivent une solution de salyrgan pendant 2 mn. On ne note aucune réaction (pl. IX, fig a). On retire le liquide et on le remplace par la solution de contraction (Pl IX, fig b), même après 15 mn, il n'y a toujours pas de réactions. Dans une seconde expérience, on se sert toujours du salyrgan pendant 2 mn, sans aucune réaction (pl IX, fig c). Ensuite, on l'enlève et on le remplace par la solution de contraction avec de la cystéine (Pl IX, fig d). On observe alors une contraction irréversible en 2 mn.

Ces expériences, très nettes, recevront leurs conclusions dans le paragraphe suivant.

TABLEAU X - ROLE DES INHIBITEURS ET ACTIVATEURS

solutions-témoin	Réactions
solutions de contraction pH = 7 ATP 0,005 M. Ca + Mg 0,003 M. KCl 0,03 M tampon tris 0,01 M.	40 contr-dét en 4 mn.
solution de salyrgan à 0,005 M pH = 7	en 2 mn pas de réaction.
solution de contraction + cystéine à 0,01 M.	contraction irréversible en 2 mn
solutions d'expérimentation	Réactions.
solution de salyrgan 2 mn puis remplacement par la solution de contraction.	en 15 mn : aucune réaction.
solution de salyrgan 2 mn puis remplacement par la solution de contraction avec la cystéine	Contraction irréversible en 2 mn.



LEGENNES DE LA PL IX

Il s'agit de l'étude du rôle du salyrgan et de la cystéine sur la contraction.

Fig a : Le Spirostome est placé dans une solution à 0,005 M de salyrgan à pH = 7.

On ne note aucune réaction.

Fig b : Le même Spirostome est débarassé de cette solution de salyrgan, qui est remplacée par la solution de contraction.

On ne note aucune réaction.

Fig c : Spirostome placé dans une solution à 0,005 M de salyrgan à pH = 7.

Fig d : Cette solution est retirée, et remplacée par la solution de contraction, renfermant en plus de la cystéine (0,01 M).

On note une contraction irréversible (Le macronoyau est bien visible).

L'échelle dessinée en bas et à droite de chaque photographie représente environ 100 μ .





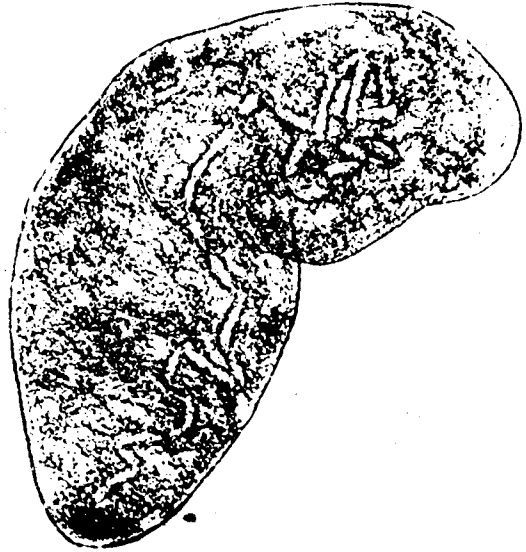
a



b



c



d



4°) Récapitulation

Devant cette longue série de tâtonnements, une récapitulation nous est apparue nécessaire. Nous allons faire référence aux différents graphiques de la pl. X.

La solution d'ATP à 0,005 M. (Fig 1), après quelques contractions-détentes, entraînait la mort du Spirostome au bout de 10 mn. L'adjonction de CaCl_2 à 0,003 M (Fig 2) ou de MgCl_2 à 0,003 M (Fig 3) améliore le nombre de contractions-détentes, mais surtout ne les rend plus mortelles. Le mélange de ces 2 sels, dans les mêmes proportions, avec l'ATP 0,005 M augmente de façon très nette les réactions : 40 contractions-détentes en 5 mn (Fig 4). Si on ajoute du KCl, le nombre de contractions n'est pas influencé, mais la fréquence est plus importante : 40 en 4 mn (Fig 5) et même en 3 mn. Cette solution de contraction, ajoutée après un passage du Spirostome dans le salyrgan ne montre aucune réaction (Fig 6). Tandis que si l'on ajoute de la cystéine (Fig 7) il y a contraction irréversible et même mortelle. Une ATPase de type myosine, a été localisée chez Amoeba proteus par GUINDON et COUILLARD (1964). Par immuno-cytochimie, WAGTENDONK et VLOEDMAN, 1951, ont isolé une protéine à activité adénosine-triphosphatasique chez le genre Paramecium. TS'0, BONNER, EGGMAN et VINOGRAD, 1956, ont trouvé quelque chose d'analogue sur un plasmode de Myxomycète. Rien d'analogue n'a toutefois été décrit chez le Spirostome et nos recherches sont en cours. Toutefois, le fait que les inhibiteurs et activateurs de la contraction des animaux supérieurs agissent sur ce Cilié, peut laisser présager la nature biochimique de l'élément contractile. Nous reviendrons sur ce problème

Les études physiologiques, effectuées sur des Spirostomes vivants, sont soumises à de possibles fluctuations. Aussi toutes ces recherches avaient pour but de mettre au point une solution de contraction.

LEGENDES DE LA PL X

Il s'agit d'une récapitulation, à pH = 7.

Graph I : sol. d'ATP à 0,005 M.

10 contr-dét en 1 mn ; mort en 10 mn.

Graph II : ATP 0,005 M + CaCl₂ 0,003 M.

20 contr-dét en 4 mn.

Graph III : ATP 0,005 M + MgCl₂ 0,003 M.

20 contr-dét en 1 mn 30.

Graph IV : ATP 0,005 M + CaCl₂ 0,003 M + MgCl₂ 0,003 M.

40 contr-dét en 5 mn.

Graph V : ATP 0,005 M + CaCl₂ 0,003 M + MgCl₂ 0,003 M + KCl 0,03 M

40 contr-dét en 4 mn.

Graph VI : Salyrgan 0,005 M + sol. de contraction (celle décrite en V)

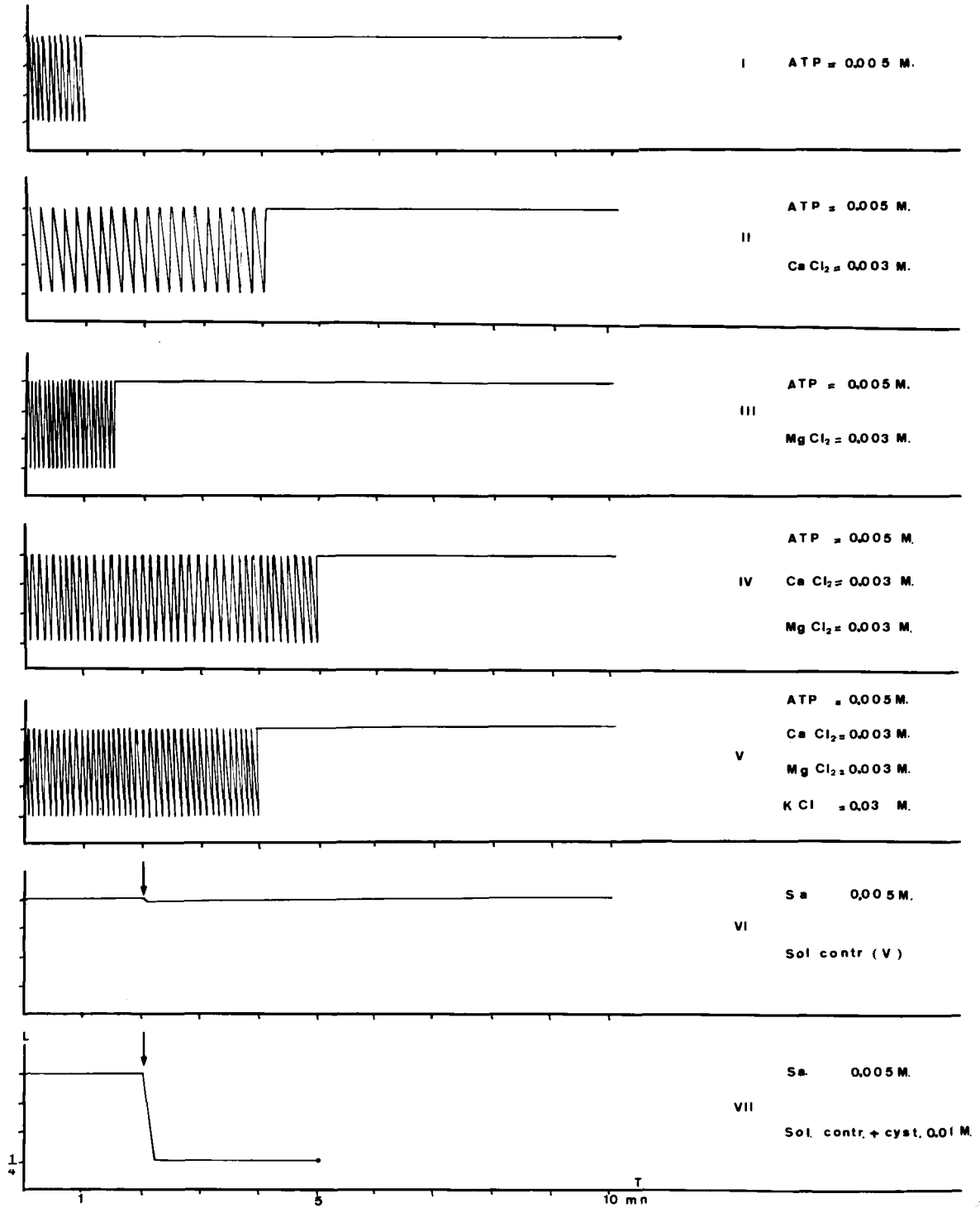
Pas de réactions.

Graph VII : Salyrgan 0,005 M + sol. de contraction avec cystéine

Contraction irréversible.



PI X — Récapitulation



Nous avons vu que, pour avoir les réactions les plus efficaces, il fallait harmoniser l'ensemble ATP - CaCl_2 - MgCl_2 - KCl, en fonction de la force ionique (nous reviendrons sur ce point) et du pH, l'ATP restant l'élément actif de cet équilibre. On peut toutefois se poser la question suivante : pourquoi les contractions sont-elles limitées dans le temps (maximum de 5 mn) ? Si, après ce temps, on place les Spirostomes dans une solution de contraction fraîche, il n'y a plus de réactions : Accoutumance ou seuil ? Une expérimentation plus poussée devrait le préciser.

Jusqu'ici, l'analogie apparaît assez bien avec le processus chimique de la contraction en général. Mais la présence de ces éléments contractiles n'est pas démontrée.

Aussi nous allons maintenant examiner les ultrastructures du Spirostome, de manière à repérer d'éventuels éléments contractiles. Il faudra ensuite démontrer qu'ils le sont effectivement en comparant des animaux contractés et relaxés. De manière à mieux préciser le problème, nous essaierons de détruire ou d'inhiber toutes les structures cellulaires, tout en conservant l'intégrité des fibres prétendues contractiles. Nous pourrons alors tester la solution de contraction mise au point dans ce chapitre. Il faudra alors replacer ces fibres dans le contexte structural et métabolique du Spirostome.

III/ - PROBLEMES ULTRASTRUCTURAUX DE LA CONTRACTION

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'analogie avec le processus chimique de la contraction en général semble être établie. Mais nous ignorons toujours, à priori, la localisation des éléments contractiles.

Aussi, dans un premier temps, il semble logique d'entreprendre l'étude ultrastructurale du Spirostome fixé. Grâce à l'amélioration des techniques de fixation, il nous a été possible de préciser certains points, jusqu'ici non décrits ou diversement décrits. Mais surtout nous avons pu, grâce à la technique d'anesthésie, comparer nos observations à celles de Spirostomes relaxés. Ces descriptions nous ont permis d'avancer l'hypothèse de la présence de fibres contractiles. Mais, toutefois, seules les expériences sur les modèles glycélinés nous ont permis d'étayer cette hypothèse.

L'aspect purement descriptif de nos observations ne permet toutefois pas de comprendre le mécanisme métabolique de la contraction. Nos premiers résultats de cytochimie ou d'enzymologie ultrastructurales (études nécessaires à la compréhension du phénomène), trop fragmentaires pour être discutés et présentés dans ce mémoire, serviront simplement à positionner les problèmes.

I - ULTRASTRUCTURE PERIPHERIQUE DU SPIROSTOME

1°) Techniques

Le Spirostome contracté a subi la double fixation glutaraldéhyde dans le tampon phosphate à pH 7,2 et tétroxyde d'osmium à 2 % dans le même tampon. Après déshydratation par l'alcool éthylique ou l'acétone, les animaux ont été inclus dans l'épon ou l'araldite. Les coupes, effectuées à l'ultramicrotome Porter-Blum, ont été contrastées par le citrate de plomb (selon REYNOLDS, 1963), avec ou sans traitement préalable par l'acétate

d'Uranyle en solution aqueuse à 5 %.

Le Spirostome en extension a été anesthésié par le chloréthane, et a ensuite subi les mêmes manipulations.

Les observations ont été faites au microscope électronique HITACHI H S 7. Nous nous attacherons essentiellement à la description des éléments susceptibles d'intervenir dans la contraction, aussi nous nous bornerons surtout à l'étude de l'ectoplasme et de sa zone de contact avec l'endoplasme, sans nous occuper des inclusions de ce dernier (noyau, vacuoles, inclusions diverses).

2°) Spirostome contracté

Le plan de coupe de la planche XI (Fig. a) met imparfaitement en valeur le découpage à allure sinusoïdale de l'ectoplasme. Il est cependant clairement établi et confirmé par la microscopie électronique par balayage (BOYDE et BARBER, 1969).

Les crêtes ectoplasmiques se découpent en cryptes, servant peut-être de poches à mucus (le Spirostome peut en sécréter). Dans ces saillies, les mitochondries y sont très abondantes. On y trouve aussi des corps denses aux électrons. Des grains sphériques ou ovoïdes, de diamètre de 800 à 3000 Å, d'opacité moyenne après les techniques classiques de fixation et de coloration, sont rencontrés de façon très dense en dessous des mitochondries. A la limite conventionnelle entre l'ectoplasme et l'endoplasme se trouvent les endomyonèmes (terminologie de FINLEY, BROWN et DANIEL, 1964) ou C.F.S. (Contractile Fibrillar System de YAGIÜ et SHIGENAKA, 1963). La planche XI, figure a, indique qu'ils n'ont pas d'aspect de microtubules ; à peine peut-on remarquer une certaine striation. Cependant FINLEY et Coll., 1964 ont obtenu un aspect en "cheveux d'ange", avec une fixation à l'osmium seul. Ce problème sera repris dans la discussion. Avec la double fixation, ces myonèmes apparaissent plus tassés et plus opaques que le cytoplasme lui-même. Ils sont discontinus et ne semblent pas limités par une membrane. Toutefois des vésicules leur sont souvent accolées et présentent, elles, indiscutablement une membrane. On ne trouve aucune inclusion dans les myonèmes, mais on peut en trouver dans les vésicules (Pl. XI, fig. b et c).

Légendes de la Pl. XI

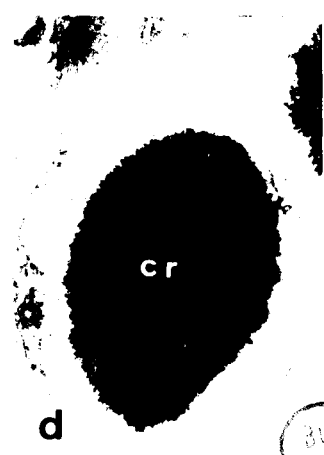
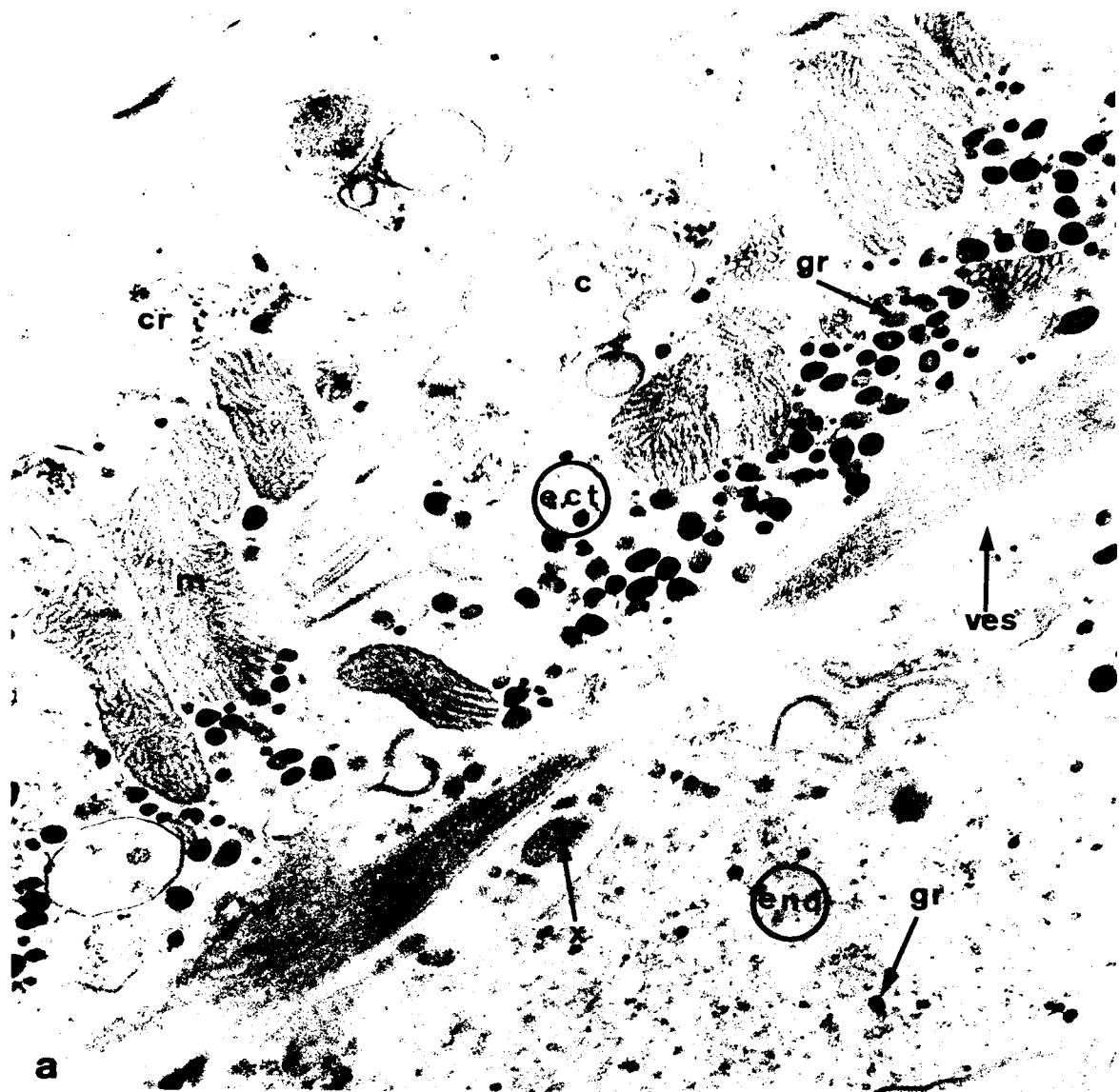
Spirostome contracté

Fig. a - Ultrastructure de la limite ectoplasme (ect)-endoplasme (end). Les crêtes ectoplasmiques sont creusées de cryptes (cr), tandis que les cils (c) partent du fond des sillons. Les mitochondries (m) et les grains (gr) y sont très denses. Les myonèmes (my) peuvent être longés de vésicule (ves). A l'intérieur de ces vésicules se trouvent des structures indéterminées (X).
x 27.000.

Fig. b - représente un corps X entouré d'une vésicule.
x 35.000.

Fig. c - semble indiquer une promiscuité entre ces mêmes corps X et le cytoplasme (flèches).
x 35.000.

Fig. d - structure d'allure cristalline, entourée d'une vésicule et rencontrée dans l'endoplasme. x 35.000.



315
1962

Cette question sera reprise dans la discussion. Ces corps (appelés pour l'instant corps X) apparaissent encerclés dans des vésicules mais comme l'indique la fig. c de la pl. XI, ils ont des points communs avec le cytoplasme. Le système typiquement fibrillaire du Spirostome, comme celui de beaucoup de Ciliés est complexe. La pl. XII va essayer d'en donner une idée rapide. Juste en dessous de la pellicule cytoplasmique (Pl. XII, fig. a) se trouve une rangée de microtubules appelés P.E. (peripheral ectomyonemes) par FINLEY, BROWN et DANIEL (1964), S.P.F. (Sub-pellicular Fibrils) par YAGIU et SHIGENAKA (1963), ce qui peut se traduire par fibrilles sous-pelliculaires. La même figure montre un arrangement de fibres appelées L.E. (lateral ectomyonemes) ou L.F.B. (longitudinal fibrillar bundles) pour ces mêmes auteurs. Le diamètre de ces tubules est d'environ 220 Å. Beaucoup d'auteurs pensent que ces fibres longitudinales forment le cinétodesme. Mais, comme le montrent notamment FAURE-FREMIET, ROUILLER et GAUCHERY (1956), DANIEL et MATTERN (1965), GRAIN (1966, 1968), seul un feuillet est en relation avec les 2 cinétosomes du cil (Pl. XII, fig. b). Donc, seul ce feuillet devrait constituer le véritable cinétodesme (liaisons entre les cils). Notre propos n'est pas de détailler toutes ces notions et nous renvoyons à l'étude synthétique de GRAIN (1969). Au niveau du péristome, on retrouve un autre type de fibres : A.E. (adoral ectomyonemes) pour FINLEY et Coll. (1964) ou F.B. (fibrillar bundles) pour YAGIU et SHIGENAKA (1963). Les fibres issues des cinétosomes des cils de la membranelle se rejoignent et forment des gros némademes (Pl. XII, fig. c) dans l'endoplasme.

L'endoplasme, quant à lui, montre un cytoplasme peu dense. On y trouve des organites à l'état épars (noyau, mitochondries, grains, corpuscules denses...) et des structures à allure cristalline. Ces dernières, qui ont un diamètre de l'ordre du micron, seront étudiées plus loin (Pl. XI, fig. d) : cet endoplasme (nous le verrons nettement sur d'autres microphotographies) montre un réticule. Il est toutefois difficile de préciser s'il possède ou non une membrane limitante.

Il est maintenant intéressant de comparer l'ultrastructure du Spirostome contracté à celle d'un Spirostome fixé en extension.

Légendes de la Pl. XII

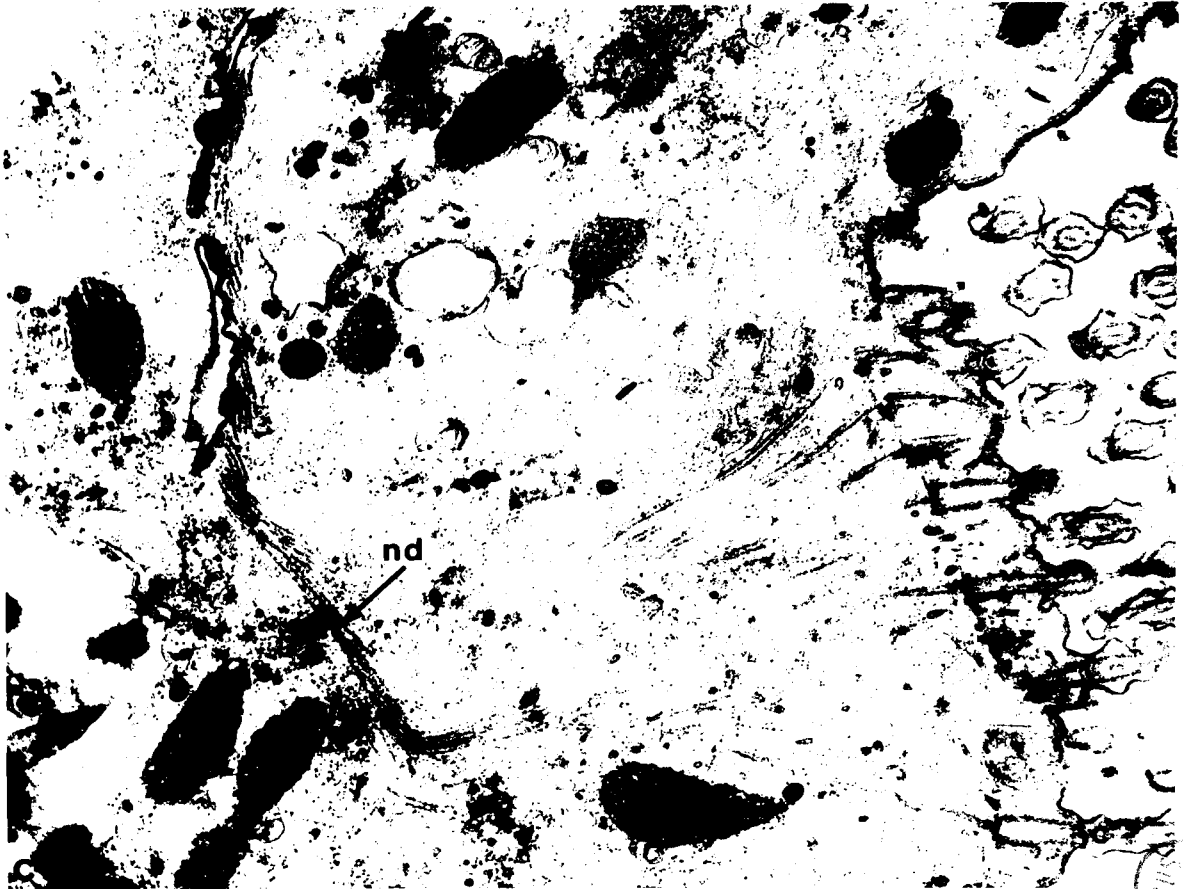
Systeme fibrillaire du Spirostome.

Fig. a - Crête ectoplasmique, montrant les fibres sous pelliculaires (fsp) et les fibres longitudinales (f.l). x 50.000.

Fig. b - Etude de la zone ectoplasmique, au niveau des fibres longitudinales (f.l). Un feuillet (le cinétodesme : cd) est en relation avec l'un des deux cinétosomes (cn). x 45.000.

Fig. c - Région ultrastructurale des membranelles du péristome. Les fibres issues des cinétosomes des cils (c) se rejoignent dans l'endoplasme et forment de gros nématodesmes (nd). x 30.000.





5115
1/11

3°) Spirostome en extension

La planche XIII montre des points de ressemblances et des points de dissemblances avec la planche XI.

Le découpage du cytoplasme apparaît ici nettement (Pl. XIII). Les grains précédemment décrits, épars dans l'endoplasme, sont très denses dans l'ectoplasme. Ils semblent être toutefois moins importants que sur des animaux contractés. Le système fibrillaire n'a subi aucune modification (fibres sous-pelliculaires, longitudinales et adorales).

Par contre, le problème des endomyonèmes se trouve posé. On ne rencontre aucune formation analogue, à la limite endo-ectoplasme. Toutefois, des formations plus denses aux électrons que l'ensemble du cytoplasme, entourées d'une vacuole (Pl. XIII) peuvent être décrites et ressemblent à celles observées sur des animaux contractés (corps X). Des vésicules, plus globuleuses que celles décrites au sujet des animaux contractés, persistent dans cette zone. L'aspect réticulé de l'endoplasme apparaît beaucoup plus important ici. Etant certainement en relation avec le mode de vie de l'animal et la fixation cytologique, il est difficile de dire si une membrane entoure les vacuoles (ce qui peut être le cas) ou si le réticule est en contact direct avec le cytoplasme (ce qui se rencontre aussi). Les structures d'allures cristallines, observées précédemment dans des cysternes du réticulum, apparaissent toujours, mais, semble-t-il, de façon différente. On retrouve encore des cristaux isolés dans une vacuole. Bien souvent, en effet, plusieurs cristaux apparaissent dans une même grande vacuole.

Le fait que nous ayons trouvé des différences importantes entre les animaux contractés et les animaux fixés en extension, semble mettre en lumière le rôle possible joué par certaines structures dans la cellule. C'est ce dont nous allons essayer de discuter maintenant.

4°) Discussion

a) Fibres et myonèmes

On ne peut qu'émettre certaines hypothèses quant au rôle des fibres longitudinales. La majorité des auteurs semble se ranger

Légende de la pl. XIII

Spirostome fixé en extension, après anesthésie.

La séparation entre l'ectoplasme (ect) et l'endoplasme (end) est plus difficile. Les abréviations sont les mêmes que celles utilisées précédemment (f.l : fibres longitudinales ; fsp : fibres sous pelliculaires ; gr : grains ; m : mitochondries).

Les corps X (x) entourés de vésicules (ves) se retrouvent également.

Plusieurs cristaux (cr) peuvent se trouver dans une grande vacuole.

x 35.000.





EMU
FILE

derrière l'idée qu'elles joueraient un rôle dans le maintien de la forme du Cilié et, éventuellement de synchronisation des mouvements ciliaires.

D'autres auteurs leur attribuent un certain rôle dans la contractilité.

Le problème des myonèmes semble beaucoup plus intéressant ici. Ils existent chez d'autres Ciliés contractiles (les M-bands du Stentor ; RANDALL et JACKSON, 1958 ; BANNISTER et TATCHEL, 1968). YAGIU et SHIGENAKA (1961) décrivent des formations ressemblant aux myonèmes et existant chez Condylostoma spatiosum. SCIELLO et TRUJILLO (1959) ont décrit aussi des myofibrilles chez les Vorticelles. DE PUYTORAC (1959) observant le cytosquelette de Metaradiophrya gigas parle de "système trabéculaire profond représentant une armature élastique ou contractile". LOM et CORLISS (1968) en trouvent même chez des Ciliés parasites. D'après NOIROT-TIMOTHEE (1958), les deux couches de fines fibrilles séparant l'endoplasme et l'ectoplasme du genre Isotricha serviraient à expliquer la plasticité du Cilié, qui n'est pas contractile. Blepharisma étudié notamment par KENNEDY (1965), DEMBITZER et HIRSHFIELD (1966) n'est pas contractile non plus. Ces auteurs interprètent alors les structures (à allure de myonèmes) situées à la limite ectoplasme-endoplasme comme contribuant au maintien de la forme spécifique du Cilié. D'autres types fibrillaires, en relation probable avec la contraction, ont été décrits chez des Amibes (NACHMIAS, 1968 ; STOCKEM, WOHLFARTH-BOTTFRMANN et HABEREY, 1969). Chez certains Sporozoaires, VIVIER et SCHREVEL (1964) ont fait le rapprochement entre les fibrilles sous membranaires et la possibilité de contraction de la Grégarine Selenidium.

Comme on peut le voir, de nombreuses formations prétendues contractiles ont été décrites chez de nombreux Protozoaires fixés en contraction. C'est le cas notamment du Spirostome. Mais, sur des animaux fixés en extension, ces myonèmes ne sont plus visibles. Y-a-t-il possibilité d'artéfacts ? Nous ne le pensons pas, car la fixation des Ciliés en extension semble être de même qualité que celle des individus fixés contractés. Dans d'autres essais, la mauvaise fixation des animaux contractés n'influait pas la localisation des myonèmes. Le chlorétone (en temps que corps chimique) peut-il modifier (ou même supprimer) la présence des fibres ? Nous ne le pensons pas non plus, car des Spirostomes, ayant séjourné une

heure dans l'anesthésique, mais s'étant contractés quand même lors de la fixation ont montré des myonèmes. Toutefois l'anesthésique, grâce à son pouvoir relaxant, semble avoir inhibé l'apparition des myonèmes. Si l'on se reporte à la pl. XIII, on remarque que l'aspect du cytoplasme, à la limite pressentie entre l'ectoplasme et l'endoplasme apparaît normal (par comparaison à la pl. XI). Toutefois, des structures dont il reste à déterminer l'origine et la fonction apparaissent envacuolisées, que ce soit sur des Spirostomes contractés (pl. XI) ou anesthésiés (pl. XIII). Leur contact occasionnel avec le cytoplasme pourrait faire penser à des travées cytoplasmiques entourées de vacuoles. Toutefois, leur aspect plus ou moins granulaire pourrait faire penser à des sections transversales de fibres longitudinales (corps X décrits dans les pl. XI et XIII). Cela pose alors le problème de l'orientation des myonèmes dans la cellule : existe-t-il des myonèmes longitudinaux et des myonèmes circulaires ? Ces corps X peuvent-ils constituer une autre forme (d'attente ou de repos) des mêmes myonèmes. Il est inutile d'épiloguer plus longtemps sur ce problème, car nous manquons de données. Au stade actuel de nos recherches, nous pensons plutôt que les myonèmes n'existent pas chez les animaux vivants, ou tout au moins qu'ils ne sont pas visibles.

Cela nous oblige à ébaucher une hypothèse sur l'apparition de ces myonèmes. Des molécules contractiles (?) ou de fines structures contractiles existeraient à l'état diffus dans la zone de limite ectoplasme-endoplasme. Sous l'effet d'un stimulus, il y aurait association de ces éléments (notamment au contact des vésicules) et l'ensemble, amenant la contraction, donnerait les myonèmes. Il faut noter à ce sujet que ces vésicules existent toujours chez le Spirostome en extension, avec des formes plus globuleuses que celles des individus contractés. Deux faits précis viennent quand même étayer cette hypothèse. RANDALL et JACKSON (1958) ont remarqué que les M-bands du Stentor n'étaient visibles que sur des animaux contractés et que leur largeur dépendait du degré de contraction de la cellule. Il existe aussi un système de vacuoles associé à ces fibres. En plus, ces auteurs associent aussi les K-m fibres (fibres kinetodesmales) au processus de contraction, tout au moins dans les contractions mineures, les M-bands

intervenant dans les contractions majeures. SCHAFER-DANNEEL et WEISSENFELS (1969), sur des modèles glycélinés de fibroblastes étudient la capacité de contraction des fibres et notent une différence de densité entre les fibres relâchées et les fibres contractées.

Il semble donc (et c'est là un phénomène classique) que la contraction amène une condensation importante des fibres contractiles. Le problème se pose pour le Spirostome de savoir quel est l'état initial du système. Nous pensons pour notre part que, sur l'animal vivant, les fibres sont très ténues (ou même inexistantes) et qu'elles prennent toute leur ampleur lors de la contraction. Les myonèmes décrits jusqu'ici chez le Spirostome ne constitueraient donc pas une réalité anatomique permanente, mais une entité occasionnelle^{et} dynamique. Il semble peu probable que la fixation en extension des individus puisse masquer autrement ces structures. Il faudrait, pour vérifier cette hypothèse, visualiser cytochimiquement (ou par autoradiographie) l'élément chimique actif de la contraction. Toutefois, le problème posé par les "myonèmes" des Ciliés non contractiles (notamment du genre Blepharisma) reste entier. Des structures similaires, dans des Ciliés différents **peuvent-elles** avoir des fonctions différentes (notamment le maintien de la forme) ? De nombreuses expériences sont encore possibles dans ce domaine.

b) L'endoplasme

Nous avons déjà signalé que le Spirostome relâché offrait un endoplasme plus réticulé que le Spirostome contracté. Il n'est guère possible de dire s'il s'agit d'un véritable réticule (dû à une coagulation du cytoplasme, sans membrane) ou de vacuoles (entourées d'une membrane). Ceci est en relation avec la taille de l'animal et l'aspect particulier du cytoplasme de beaucoup de Ciliés contractiles. RANDALL et JACKSON (1958) ont décrit aussi un cytoplasme d'allure spongieuse chez le Stentor. Pour ces auteurs, ces alvéoles renfermeraient de l'eau, qui serait rejetée à l'extérieur lors de la contraction. Ceci rejoint nos études sur la diminution de volume du Spirostome, lors d'une excitation. Pour nos calculs, nous avons

assimilé le Cilié vivant à un cylindre et le Cilié en contraction à un ellipsoïde ; ce sont les figures géométriques qui représentent le mieux les formes correspondantes. Les chiffres obtenus sont les suivants (exprimés en unités arbitraires et calculés d'après les moyennes des longueurs et diamètres d'un lot de 10 Spirostomes) :

- Volume en extension : 7310

- Volume en contraction : 4286

La diminution de volume serait ainsi de l'ordre de 40 % ; même si ce mode de calcul ne fournit qu'un résultat approximatif, la réduction apparaît considérable et pourrait en effet s'expliquer par un déplacement d'eau. Cette interprétation demande cependant à être vérifiée, car cet aspect du cytoplasme peut simplement provenir d'un artéfact de la fixation.

La dernière différence importante réside dans la topographie des cristaux. Il y a un seul cristal dans un saccule du réticulum pour les animaux contractés, il peut en exister plusieurs dans une grande vacuole pour les Spirostomes anesthésiés. Là aussi, s'agit-il d'un artéfact en relation avec l'aspect réticulé du cytoplasme, ou est-ce une réalité biologique ? Ce problème sera repris dans le contexte plus général de la contraction.

c) Conclusion

Nous avons déjà décrit un certain nombre de structures, qui semblent être, de part leur position, en relation avec le processus de contraction : des mitochondries à tubules, des grains, qui, par leur aspect et leur densité pourraient être des produits de réserve, des vésicules, des myonèmes contractés et enfin des cristaux.

Il faudrait maintenant essayer de voir le rôle de ces différents éléments dans le processus métabolique de la contraction, en se fondant sur les modalités de la contraction en général, à savoir : source d'énergie (sous forme d'ATP), source énergétique (sous forme de glycogène), élément contractile (sous forme de fibres), éléments minéraux (calcium, magnésium, phosphore...).

On voit que l'élément-charnière de cet ensemble repose sur les fibres contractiles. Nous venons de voir, grâce aux études ultrastructurales, que les endomyonèmes pourraient effectivement être des structures contractiles. Nous nous souvenons de nos expériences effectuées sur des Spirostomes vivants (rôle de l'ATP, du calcium, du magnésium...), mettant en valeur l'analogie avec le processus de contraction des Métazoaires. Il nous manque toutefois la liaison entre ces deux éléments : action de la solution de contraction sur les myonèmes.

II - CARACTERISATION DE CERTAINS ELEMENTS SUSCEPTIBLES D'ENTRER DANS LE PROCESSUS DE LA CONTRACTION

De par leur position, on peut supposer l'existence de liaisons entre les différentes structures décrites précédemment. Comme ces relations tournent autour du phénomène de contraction, il faut démontrer, si possible de façon indubitable, le caractère contractile des myonèmes, qui doivent constituer le centre de cet hypothétique ensemble fonctionnel. Après, en nous fondant sur les données classiques de la contractilité, nous essaierons de caractériser les autres éléments.

1°) Myonèmes et expériences d'extractions

a) Processus

Certainement le premier à avoir expérimenté cette méthode, SZENT-GYORGYI (1949) a eu l'idée d'extraire les fibres musculaires par la glycérine, à froid. Bien que les fondements biochimiques de cette action semblent peu connus, on peut supposer que la glycérine détruit la matière organique, en préservant les protéines contractiles. Après l'opération, les fibres extraites, appelées "modèles" peuvent encore se contracter en présence d'ATP. Cette méthode a été ensuite améliorée par de nombreux auteurs, notamment HOFFMANN BERLING (1954, 1956), KAMIYA et KURODA (1965) sur les Myxomycètes. Les travaux sur les Protozoaires seront examinés dans

la discussion. Donc, d'un point de départ typiquement musculaire, cette méthode est maintenant appliquée à des cellules non musculaires, renfermant simplement des éléments contractiles.

Pour notre part, nous avons modifié légèrement la solution d'extraction proposée par KAMIYA et KURODA (1965), en mélangeant du tampon tris-HCl à 0,01 M, du KCl à 0,01 M (ou 0,03 M), E.D.T.A. (Ethylenediamine-tetraacétate disodique) à 0,01 M et enfin de la glycérine à 40 % (en concentrations finales). Les Spirostomes anesthésiés (car la non-anesthésie amène déjà une contraction) sont placés dans la solution, d'abord à 0° C, puis à - 10° C pendant une dizaine de jours. Toutefois, le KCl amenant la destruction des mitochondries, il est possible, en augmentant sa concentration, de diminuer son temps d'action.

Au bout de ce temps, les Spirostomes sont lavés dans la solution d'extraction, sans glycérine. Nous avons ensuite testé la solution de contraction mise au point dans le second chapitre, à savoir 0,005 M d'ATP, CaCl₂ et MgCl₂ à 0,003 M chacun, KCl à 0,03 M et le tampon tris à 0,01 M (ce sont toujours des concentrations finales), à pH : 7. La force ionique (F.I.) est, comme nous le verrons, un facteur très important. Elle est d'environ 0,06 pour notre solution. Elle est comparable à celle déterminée pour les Amibes par SIMARD-DUQUESNE et COILLIARD (1962, F.I. : 0,05).

Le mode opératoire a été le suivant : les Spirostomes extraits sont placés entre lame et lamelle. La solution de contraction est placée à une extrémité de la lamelle, et aspirée à l'autre par un papier filtre. Les observations et les photographies ont été faites au microscope à contraste de phase ZEISS, sans condenseur, avec filtre 0,05. Les tirages photographiques (résultant de négatifs pris au flash) ont été uniformément menés.

Afin de pouvoir limiter nos expériences, nous avons déterminé le temps d'action de la solution. Ensuite, nous avons dissocié les facteurs principaux de la solution de contraction.

BUS
VILLE

b) Réactions

Afin de voir si les modèles glycélinés sont encore capables de réagir, nous les avons mis en présence d'un fixateur brutal : l'acide picrique. Cette solution a fait contracter le Spirostome d'environ $1/3$ de sa longueur. Il faut déjà remarquer ici que cette contraction est irréversible et moins importante que sur les Ciliés vivants.

- Influence du temps

De manière à situer les réactions dans le temps, nous avons fait agir la solution de contraction pendant 10 mn. A partir du modèle témoin (Pl. XIV, fig. a) le mélange d'ATP et de sels a fait sentir son action avant 5 mn (Pl. XIV, fig. b). Comme l'indique la fig. c de la pl. XIV, cette réaction est irréversible. Le temps de 10 mn n'apporte aucune modification par rapport à celui de 3 mn.

Il est malaisé de mesurer les longueurs des modèles, car ceux-ci sont plus ou moins contournés. En plus, on peut voir un décollement du cytoplasme restant, par rapport à la membrane ectoplasmique. Toutefois les schémas d, e et f de la pl. XIV indiquent environ une diminution de longueur de $1/5$, par rapport à l'animal initial. Il nous est apparu nécessaire (nous l'avons déjà mentionné dans le 1er chapitre) de mesurer les surfaces de projection de ces Ciliés, car la contraction affecte aussi le diamètre des animaux. Les chiffres obtenus, mesurés sur papier millimétré (ou avec un planimètre) sont significatifs. La surface de projection du Spirostome contracté (1000 unités arbitraires) est environ la moitié de celle du Spirostome-témoin (1900 U.A.), que ce soit après 5 mn ou 10 mn d'action de la solution de contraction. Il ne nous a pas été possible de mesurer les volumes.

Il nous faut donc tenir compte que les réactions consécutives à la solution de contraction se font très tôt (entre 1 mn et 5 mn). Toutes nos expériences seront donc limitées à 5 mn.

Légendes de la pl. XIV

Contraction des Spirostomes extraits en fonction du temps.

Fig. a - Spirostome extrait pendant 10 jours. x 170 environ.

Fig. b - Même Spirostome, après action de la solution de contraction pendant 3 mn.

Remarquer l'accentuation du décollement de l'endoplasme et de la membrane et la plus grande opacité du cytoplasme. x 170.

Fig. c - Même Spirostome, après 10 mn dans la solution de contraction. x 170.

Fig. d - Silhouette du Spirostome témoin sur papier millimétré. L : 105 ; S : 1900.

Fig. e - Schéma équivalent de la fig. b. On observe une perte de longueur d'environ 1/5 et une perte de surface de projection d'environ 1/2.

Fig. f - Projection de la fig. c sur papier millimétré. Pratiquement aucune différence avec la fig. e.





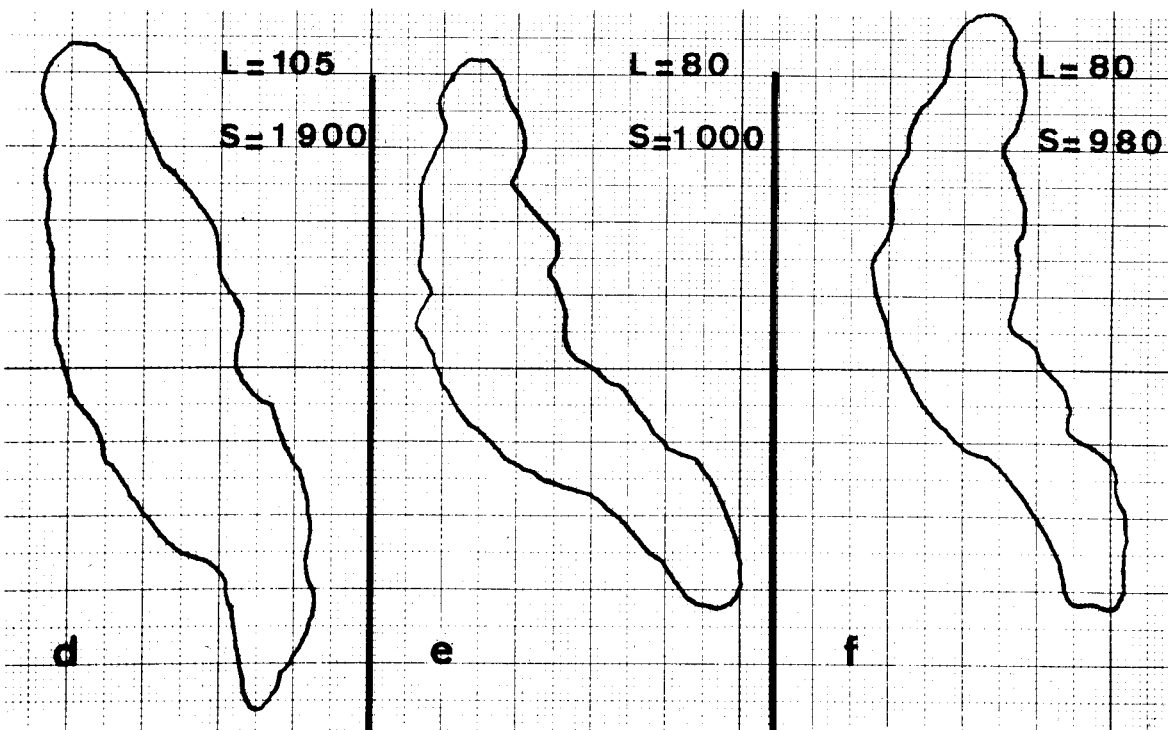
a



b



c



d

e

f



- Rôle de l'ATP

A partir d'un modèle glycérimé (Pl. XV, fig. a), on fait agir, pendant 5 mn la solution de contraction, mais sans ATP (Pl. XV, fig. b). On remarque une opacité légèrement plus importante du cytoplasme, mais peu de décollement de membrane. On retire alors le liquide et on le remplace par la solution de contraction, contenant, cette fois-ci de l'ATP. On observe alors un cytoplasme beaucoup plus sombre et un décollement net de la membrane (Pl. XV, fig. c). Si l'on compare maintenant les schémas d et e (Pl. XV), on remarque que la perte de longueur est quasiment nulle et la perte de surface négligeable, entre le Spirostome témoin et le même animal mis en présence de la solution saline. Par contre les pertes de longueur (environ $1/5$) et de surface (à peu près $1/3$) avec la solution d'ATP (Pl. XV, fig. f) sont significatives. Ces comparaisons montrent bien que l'ATP reste l'agent actif des réactions. Toutefois, ces résultats, comparés à ceux des expériences précédentes amènent déjà certaines remarques.

On a tendance à observer un décollement de la membrane et du reste du cytoplasme. Ce dernier, sous l'action de la contraction, s'assombrit. Comme nous le verrons plus loin, ceci est en relation avec la position des myonèmes. Dans nos mesures de surface, nous avons conservé l'intégrité de la cellule. Il aurait peut-être été aussi logique de ne tenir compte que de la surface du cytoplasme, en éliminant la portion comprise entre celui-ci et sa membrane.

Plus le spécimen de départ est conservé en extension, plus la réaction est nette. Il suffit de comparer les résultats de la pl. XIV (réduction de $1/2$, à partir d'un Spirostome bien conservé en extension) et de la pl. XV (réduction de $1/3$ seulement à partir d'un individu moins bien conservé en extension). Plus le modèle initial est important, plus les diminutions de longueurs ou de surfaces sont sensibles. Ceci montre bien la nécessité de ne pas avoir, dès le départ des animaux déjà contractés.

Essayons de bien préciser le rôle de l'ATP, en testant les agents inhibiteurs et activateurs.

Légendes de la pl. XV

Détermination de l'importance de l'ATP dans la solution de contraction.

Fig. a - Spirostome extrait pendant 10 jours. x 170 environ.

Fig. b - Ce même Spirostome a reçu la solution de contraction sans ATP.
x 170.

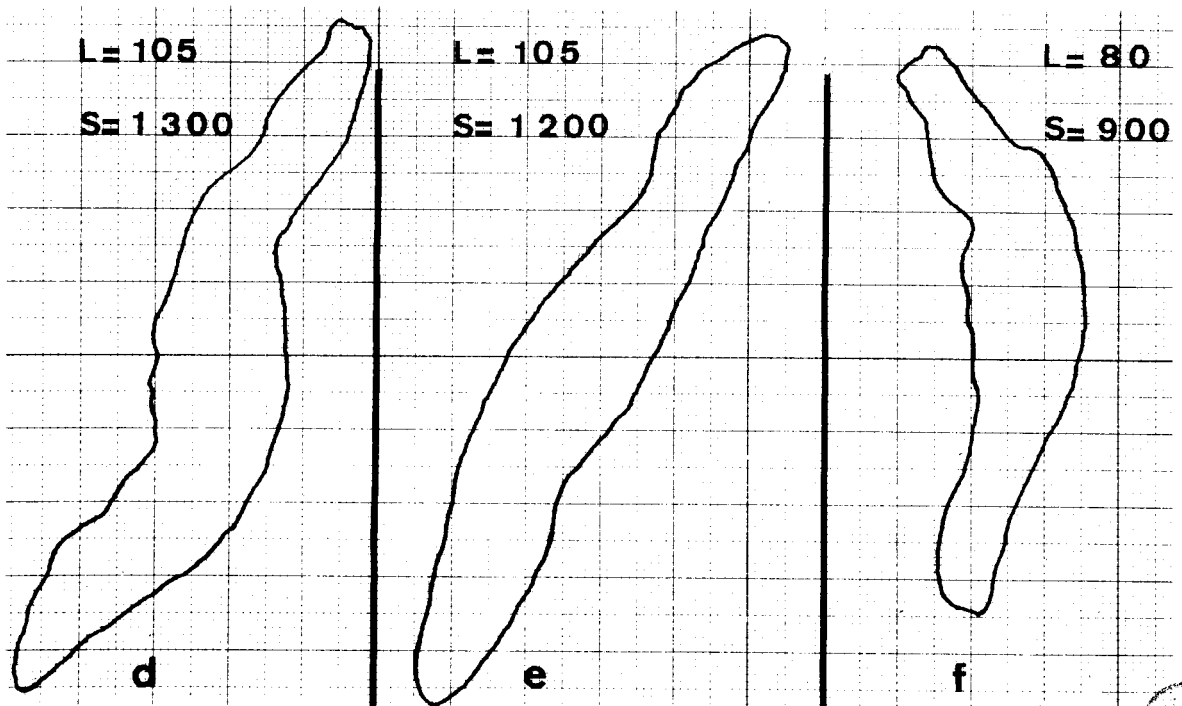
Fig. c - La solution de contraction sans ATP a été remplacée par la solution de contraction avec l'ATP. x 170.

Fig. d - Projection de la fig. a sur papier millimétré; L : 105 - S : 1300.

Fig. e - Equivalent de la fig. b - L : 105 ; S : 1200.

Fig. f - Equivalent de la fig. c. On note une perte de longueur d'environ $\frac{1}{5}$ et une perte de surface d'environ $\frac{1}{3}$, par rapport à l'animal témoin.





- Action des inhibiteurs et activateurs

Le modèle extrait (Pl. XVI, fig. a) a pour caractéristiques : $L = 120$, $S = 1450$; on l'a laissé 2 mn dans une solution de salyrgan à 0,005 M (celui-ci n'amène pratiquement aucune modification). On retire alors l'inhibiteur (en l'aspirant sous la lamelle avec un papier filtre). On le remplace alors par la solution de contraction (5 mn) comme le montre la fig. b de la pl. XVI, ce même Spirostome s'est très peu contracté, puisqu'il a alors comme mesures : $L = 115$, $S = 1400$. Ces différences semblent être négligeables, car elles sont nettement au dessous de 10 % (il faut tenir compte de légères fluctuations possibles entre les 2 pressions osmotiques de ces 2 solutions).

La figure c de la pl. XVI montre un autre Spirostome, toujours dans une solution de salyrgan (à 0,005 M). On retire le milieu et on le remplace par la solution de contraction, mais renfermant, en plus, de la cystéine. Au bout de 5 mn, le modèle est passé de $L = 130$, $S = 2350$, à $L = 100$, $S = 1400$ (Pl. XVI, fig. d). La différence est alors très nette.

L'inhibition de la contraction, provoquée par le salyrgan, a été levée par la cystéine, selon le processus décrit à la fin de la seconde partie.

On doit discuter ces nouvelles données, à savoir, qu'un Spirostome extrait, où ne doivent seules rester actives que les fibres contractiles, est effectivement capable de se contracter. Toutefois les réactions sont différentes de celles des animaux vivants. D'autre part, la relation entre les myonèmes décrits jusqu'ici et les éléments contractiles intervenant dans les modèles extraits n'est pas faite. Seule la microscopie électronique pouvait fournir la démonstration nécessaire. C'est pourquoi, avant de commencer la discussion sur ces expériences, nous allons aborder ici l'aspect ultrastructural des Spirostomes extraits.

Légendes de la pl XVI

Il s'agit de l'étude de l'action des inhibiteurs et des activateurs de la contraction sur des Spirostomes extraits.

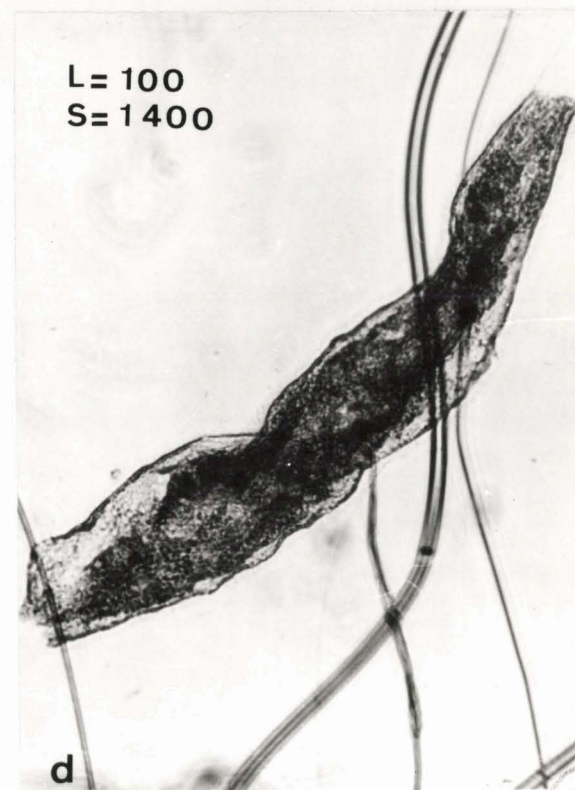
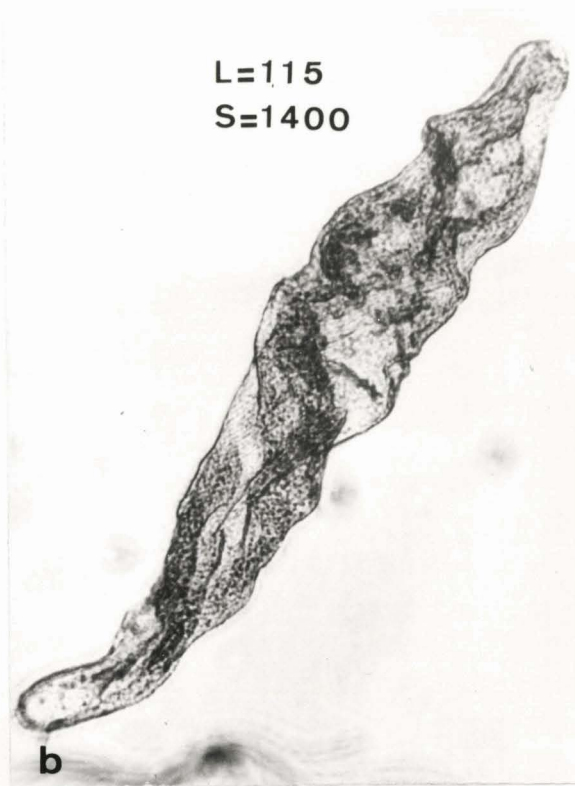
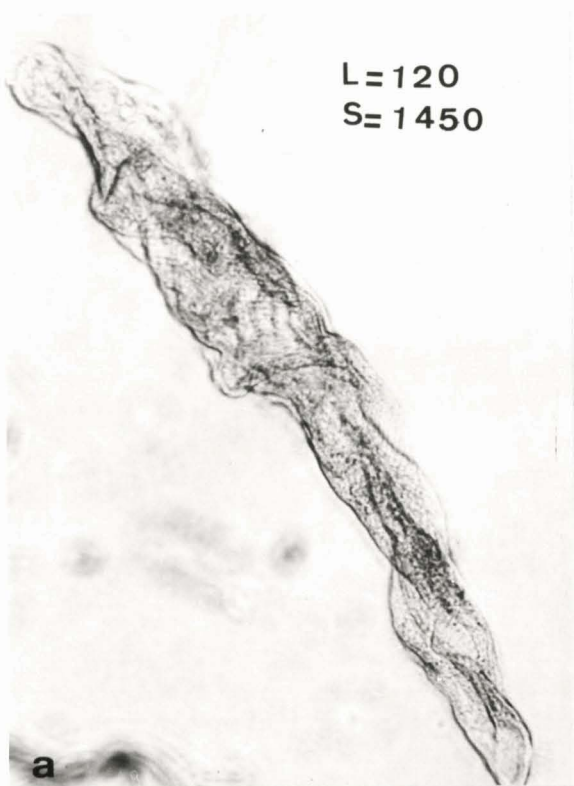
Fig. a - Spirostome extrait 10 jours placé dans une solution de salyrgan à 0,005 M. L = 120 et S = 1450. x 220 environ.

Fig. b - La solution de salyrgan a été remplacée par la solution de contraction. Pratiquement pas de modifications. x 220.

Fig. c - Spirostome extrait pendant 10 jours et placé dans une solution de salyrgan à 0,005 M. L = 130 ; S = 2350. x 220.

Fig. d - La solution de salyrgan a été remplacée par la solution de contraction renfermant en plus de la cystéine (à 0,01 M). On observe alors une diminution de longueur d'environ $1/4$ et une perte de surface supérieure à $1/3$. x 220.





BUS
CHL

c) Aspect ultrastructural

Nous avons donc démontré la "présence physiologique" d'éléments contractiles dans le Spirostome : par l'action d'une solution de contraction sur des animaux vivants, et, afin d'éliminer des interférences possibles, sur des Ciliés extraits.

Les études ultrastructurales classiques d'individus contractés et d'individus anesthésiés ont fait penser au rôle contractile joué par les endomyonèmes. Nos recherches de microscopie électronique sur des modèles glycélinés avaient donc pour but de repérer les structures contractiles et de les faire coïncider, éventuellement, avec ces myonèmes.

Les Spirostomes, préalablement anesthésiés, ont été extraits pendant 10 jours, selon la technique décrite précédemment. Après lavage, ils ont subi la double fixation glutaraldéhyde-osmium et inclus dans l'araldite. Les coupes ont été contrastées au citrate de plomb.

Le premier point qu'il vient d'abord à l'idée de décrire est l'énorme bouleversement du cytoplasme. On ne retrouve pratiquement aucune structure remarquable. Seules les mitochondries sont encore reconnaissables (Pl. XVII, fig. a). Sans qu'il soit possible de l'interpréter, l'aspect en crêtes et sillons de l'ectoplasme n'est plus visible. Ceci explique pourquoi il ne nous a pas été permis, jusqu'ici de repérer avec précision les structures fibrillaires périphériques. Aussi nous n'en parlerons pas ici, sans préjuger de leur devenir. Par contre, des formations, à aspect plus ou moins orienté, localisées au même endroit que les myonèmes (Pl. XVII, fig. a) et en ayant la même allure (Pl. XVII, fig. b) ont été repérées. Il semble indiscutable qu'elles correspondent effectivement aux myonèmes. Ils sont peu modifiés, mais le bouleversement cytoplasmique est tel, qu'il n'est pas possible de leur associer de vésicules, comme cela avait été possible sur les Spirostomes normaux, contractés. On ne semble pas non plus retrouver les structures envacuolisées décrites dans les fig. b des pl. XI et XIII.

La correspondance entre les myonèmes et les éléments contractiles semble maintenant clairement établie. Cependant, elle doit encore être discutée.

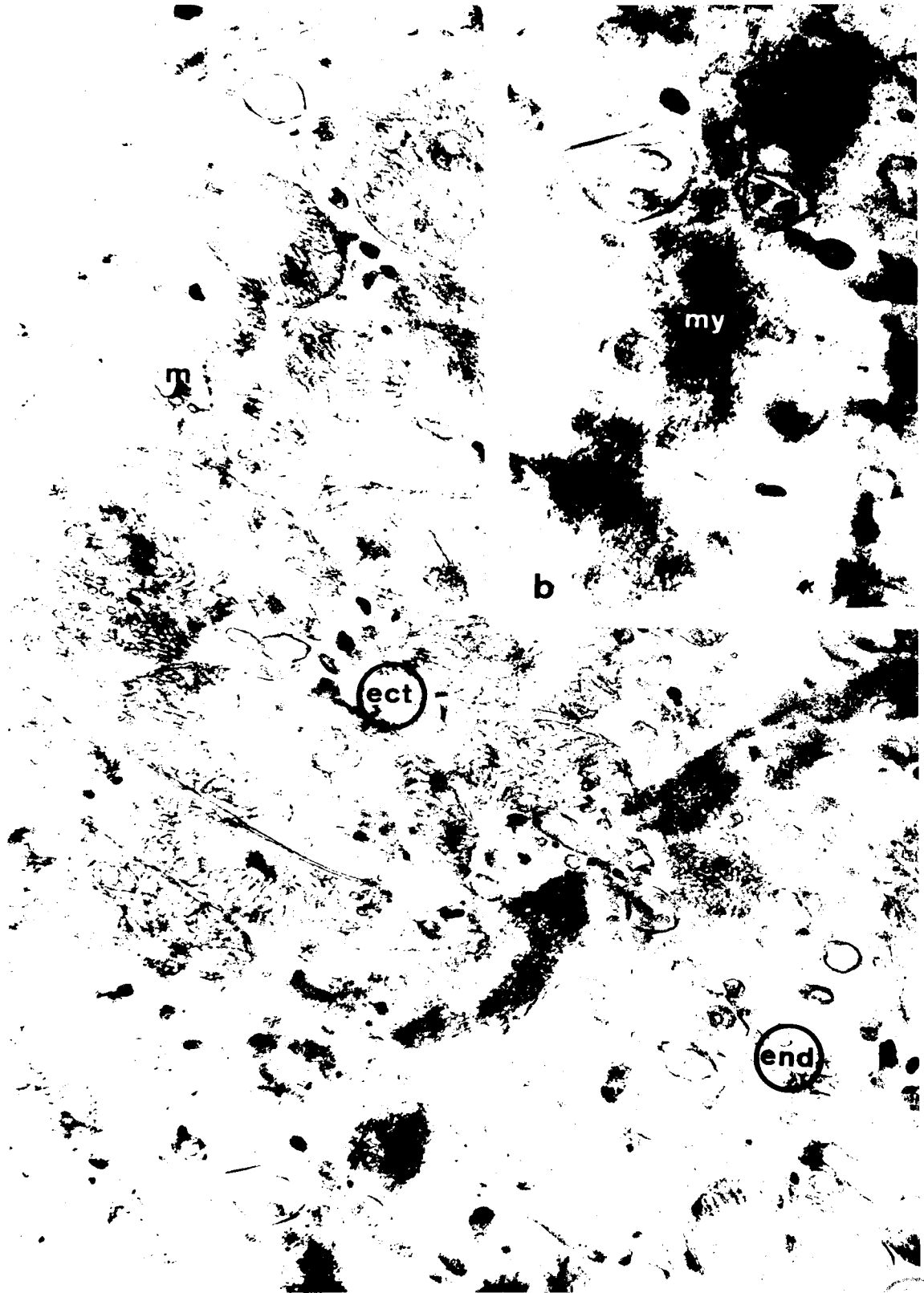
Légendes de la pl. XVII

Aspect ultrastructural des Spirostomes extraits.

Fig. a - La différence entre l'ectoplasme (ect) et l'endoplasme (end) est surtout marquée par la position des myonèmes (my). Toutefois les mitochondries sont encore visibles (m). x 23.000.

Fig. b - Myonèmes vus à plus fort grossissement. x 35.000.





d) Discussion

Après extraction par la glycérine, les myonèmes sont encore capables de réagir à une solution d'ATP. Cette réactivité est confirmée par de nombreux auteurs et sur du matériel très différent.

ARONSON, DETERT et MORALES (1968), par étude de fluorescence sur des fibres musculaires striées glycélinées arrivent à décomposer le mécanisme de contraction des différents disques avec beaucoup de précision. HOFFMANN-BERLING et WEFER (1953) analysent les fibres musculaires lisses et striées, après glycération. Des préparations typiquement musculaires, HOFFMANN-BERLING (1954) est passé à l'étude de l'action de l'ATP, lors des mouvements anaphasiques des cellules extraites, et même sur les protéines contractiles elles-mêmes (1956). Les recherches sur des cellules non musculaires étaient donc possibles. SIMARD-DUQUESNE et COUILLARD (1962) font ainsi contracter des Amibes, après extraction, avec de l'ATP, du $MgCl_2$, du tampon tris, avec une force ionique de 0,05, ajustée avec KCl. Avec une force ionique de 0,1, ils n'ont plus de contractions. L'importance de ce critère est étudiée par SCHAFER-DANNEEL (1967) sur Amoeba. Pour elle aussi, la meilleure force ionique est de 0,05. Rappelons que celle de notre solution est de 0,06. L'association du calcium et de l'ATP a été bien étudiée, sur des Amibes vivants, par KRISZAT (1950). Sur les Ciliés, les travaux portent surtout sur les Vorticelles. LEVINE (1956) entreprend les premières expériences sur des pédoncules de Vorticelles. TOWNES et BROWN (1965), sur le même matériel, obtiennent des contractions de pieds extraits, avec une solution contenant $3 \cdot 10^{-9}$ M. de $CaCl_2$, $4 \cdot 10^{-3}$ M. de $MgCl_2$ et 6 mM d'ATP. La réaction commence brusquement à pH : 6,8 et est optimum à pH : 7. Donc nos résultats coïncident, à quelques variantes près, avec ceux obtenus chez certains Protozoaires. Les travaux de microscopie électronique ont fait, là aussi, la jonction avec les travaux de physiologie. NAGAI et KAMIYA (1966) ont retrouvé des fibres orientées dans des Myxomycètes extraits. SCHAFER-DANNEEL (1967) et NACHMIAS (1968) ont réussi à visualiser l'évolution ultrastructurale des fibres contractiles chez certaines Amibes. Peu de travaux semblent avoir été faits chez les Ciliés. Cette rapide revue de

bibliographie avait surtout pour but de comparer nos expériences à celles effectuées sur divers types cellulaires. La concordance de nos résultats avec ceux de ces différents auteurs, semble éliminer toute possibilité d'artéfact, mais pose cependant quelques problèmes.

Ces animaux extraits ne se comportent plus comme des individus vivants, puisque leur pouvoir de contraction est moins fort. On ne peut qu'émettre certaines hypothèses à ce sujet : désorganisation cellulaire proprement dite, disparition d'un "synchronisme de fonctionnement" des myonèmes, bouleversement de l'orientation des fibres contractiles, désagrégation des éléments voisins (mitochondries, produits de réserve, vésicules) ou destruction d'éléments neuro-moteurs hypothétiques ? Le problème se trouve posé et la solution n'en paraît pas facile.

L'effet du chlorétone s'est certainement estompé pendant la période d'extraction. Aussi la fixation cytologique a amené une certaine contraction de l'animal, ce qui justifie l'apparition des myonèmes dans le cytoplasme. Il aurait fallu anesthésier (une nouvelle fois) les Spirostomes avant la fixation. Mais cela est aléatoire, car les réactions ne sont pas nettes. Au cas où cette possibilité aurait été réalisable, nous n'aurions pas dû retrouver de myonèmes, à la limite endoplasme-ectoplasme. Comme certains auteurs (notamment SCHAFER-DANNEEL et WEISSENFELS, 1969, sur des fibroblastes), nous aurions dû faire agir la solution de contraction avant la fixation et comparer nos résultats à ceux d'animaux extraits et fixés directement. Nous ne l'avons pas fait, car la fixation amenant déjà une contraction en elle-même, nous n'aurions pas pu observer de différences nettes entre des myonèmes "peu tassés" et "plus tassés". Toutefois SCHAFER-DANNEEL (1966), pour éliminer cet inconvénient, a utilisé un mélange glutaraldéhyde-osmium, qui, sous certaines conditions, n'amènerait pas de contraction. Nous comptons donc reprendre cette question.

Nous avons aussi abordé, mais jusqu'ici sans résultats, le problème purement cytochimique de ces fibres contractiles. En effet, LEVINE (1959) sur les Vorticelles, GUINDON et COUILLARD (1964) sur des Amibes, ont localisé une ATPase de type myosine, en microscopie optique. Les observations que nous avons faites jusqu'ici (en microscopies photonique et électronique) semblent aller dans le sens de la présence d'une ATPase au niveau des

myonèmes. Nos résultats, trop fragmentaires, ne permettent pas encore de trancher cette question. Logiquement une protéine de type contractile devrait exister à ce niveau, de même qu'un système énergétique de type ATPasique.

Le caractère contractile des structures considérées comme myonèmes semble maintenant indiscutable. Nous avons dû "isoler" ces myonèmes pour essayer de comprendre leur rôle. Toutefois, dans la cellule, ils sont associés à un certain nombre de structures. Notamment, si l'on fait référence aux planches XI et XIII, on se souvient que l'on trouvait, au dessus des myonèmes, de très nombreux grains. On peut tout de suite éliminer l'hypothèse d'une nature lipidique de ces corpuscules. De par leur densité et leur localisation, ils pourraient cependant constituer un produit de réserve, peut-être en relation avec la contraction.

2°) Produit de réserve

Nous avons tout naturellement abordé ce problème en microscopie photonique, en faisant les réactions caractéristiques des glucides, des mucopolysaccharides acides (M.P.A.) et des protéines. Nos observations, du fait même du pouvoir séparateur de la lumière, se sont révélées insuffisantes et ont nécessité des recherches cytochimiques ultrastructurales.

a) Microscopie optique

- Techniques

Les fixateurs utilisés ont été le Helly (avec ou sans formol), le Bouin (sans acide acétique), le Bouin-Hollande, le Duboscq-Brasil, l'alcool acétique et le Gendre. Les températures de fixation ont varié entre 4 et 37° C, de manière à concilier les nécessités de la cytochimie et la conservation difficile de l'endoplasme.

Diverses colorations cytochimiques ont été effectuées pour la caractérisation des glucides :

- Réaction acide periodique-schiff (APS) selon HUTCHKISS (1948) et Mc MANUS (1946). La coloration a été accentuée par l'action du jaune naphthol S. Des contrôles de spécificité ont été effectués : Schiff sans oxydation, APS après délipidation par la méthode de Baker (citée par PEARSE, 1961), A.P.S.-acétylation et A.P.S.-acétylation-saponification (Mc MANUS et CASON, 1950), digestion par la sialidase (MONTREUIL, DEFRETIN, CLAY, CAENEN, 1959).

- Réaction APS-salive selon LILLIE (1954) (d'après LISON, 1960) ; les coupes ont été traitées, préalablement à la coloration, par la salive pendant 1 h. à 37° C. Des essais ont été également effectués en remplaçant la salive par l'œ ou la β amylase.

- Réaction APS-dimédon, selon BULMER (1959) ; les coupes ont été traitées au dimédon pendant 3 h. à 60° C.

- Réaction acide chromique-Schiff, selon BAUER (1933) modifiée par LISON (1949) (d'après LISON, 1960), avec action de l'acide chromique pendant 1 h.

- Réaction au tétra-acétate de plomb (TAP)-Schiff ; cette coloration a été effectuée d'une part, en milieu anhydre selon GRIEGER (1935) modifié par LISON (1960), avec traitement par le TAP dans l'acide acétique glacial pendant 10 mn, et d'autre part en milieu non anhydre, selon SCHIMIZU et KUMAMOTO (1952) (d'après HALE, 1957) avec le TAP dans l'acide acétique additionné d'acétate de sodium.

- Coloration par le carmin de BEST (1906) (d'après PEARSE, 1961) pendant 20 mn.

Les réactions des mucopolysaccharides acides (MPA) ont été plus rapidement menées, à cause des résultats obtenus chez les glucides : la réaction de VIALLI (reprise notamment par HEROVICI, 1961) par couplage d'un bleu Alcian (qui colore les MPA) et d'un APS (qui colore en rouge les fonctions glycoles), la réaction au bleu Alcian et la métachromasie au bleu de toluidine (d'après CURRAN, 1964).

Toutes les réactions des protéines ont été essayées (puisées notamment dans le GABE, 1968), nous ne tiendrons compte que de celles se rapportant aux protéines en général : la réaction au bleu de bromophénol et la réaction à la ninhydrine-Schiff.

- Observations

Les résultats essentiels relatifs à la cytochimie des glucides sont présentés dans le tableau X, en distinguant les réactions à 3 niveaux : ectoplasme, zone limite ectoplasme-endoplasme et endoplasme.

Tableau X - Résultats des colorations pour caractérisation des polysaccharides : - : réaction négative ; \pm : réaction peu nette ; + : réaction positive ; ++ : réaction positive nette ; +++ : réaction positive intense.

Réactions	Résultats		
	Ectoplasme	Zone ecto-endo.	Endoplasme
APS	\pm	+++	++
APS-acétylation	-	-	-
APS-acétylation-sapo.	\pm	++	+
APS-salive	\pm	\pm	\pm
APS α amylase	\pm	\pm	\pm
APS β amylase	\pm	++	+
APS-dimédon	-	++	+
Ac. chrom.-Schiff	\pm	++	+
TAP-Schiff :			
milieu anhydre	-	\pm	\pm
milieu non anhydre	\pm	++	+
Carmin de Best	\pm	++	+

La présence de matériel positif est clairement démontrée par la pl. XVIII, fig. a. Les réactions de contrôle effectuées (Fig. b et c) permettent non seulement la caractérisation de la fonction glycol, mais montrent des résultats semblables à ceux que donnerait le glycogène. L'action de la salive (pl. XVIII, fig. d) et des amylases est en particulier extrêmement nette : si la salive et plus encore l' α amylase rendent la coloration APS fortement labile, la β amylase ne la perturbe pratiquement pas.

Les deux réactions au TAP (Pl. XIX, fig. a et b), l'APS-dimédon (Pl. XIX, fig. c) et son contrôle par la salive, et la coloration de Best (Pl. XIX, fig. d), correspondent bien aux réactions de type glycogène.

Les réactions des M.P.A. ont surtout visualisé ceux-ci à la périphérie du Spirostome, au niveau des membranes. Les réactions des protéines, plus difficiles à interpréter, ne feront pas l'objet de commentaires ici, car l'ensemble des résultats exposés ici permet d'affirmer la présence d'un polysaccharide, à réactions cytochimiques identiques à celles du glycogène et particulièrement abondant à la limite profonde de l'ectoplasme. On a parfois une véritable "ligne APS +".

Cependant, l'analogie entre les grains décrits en microscopie électronique et les caractérisations cytochimiques en microscopie photonique ne peut encore être précisée. Il faudrait arriver à caractériser la nature de ces structures, en partant du fait qu'ils pourraient constituer une réserve de type glycogène.

b) Microscopie électronique

- Techniques

Le Spirostome a subi la double fixation glutaral-déhyde-osmium (déjà décrite dans le paragraphe I, premièrement) sans anesthésie. Les coupes ont alors subi le traitement acide periodique-thiocarbohydrazide (T.C.H.)-Protéinate d'Argent, mise au point et décrite par THIERY (1967) inspirée de celle de SELIGMAN et Coll. (1965).

Les temps de passage dans le T.C.H. ont été de 1 h. (pour la détection des polysaccharides), et de 40 h. (pour la détection éventuelle des mucopolysaccharides). Des témoins sans oxydation periodique ou sans passage dans le T.C.H. ont été aussi observés.

Légendes de la pl. XVIII

Cytochimie des glucides.

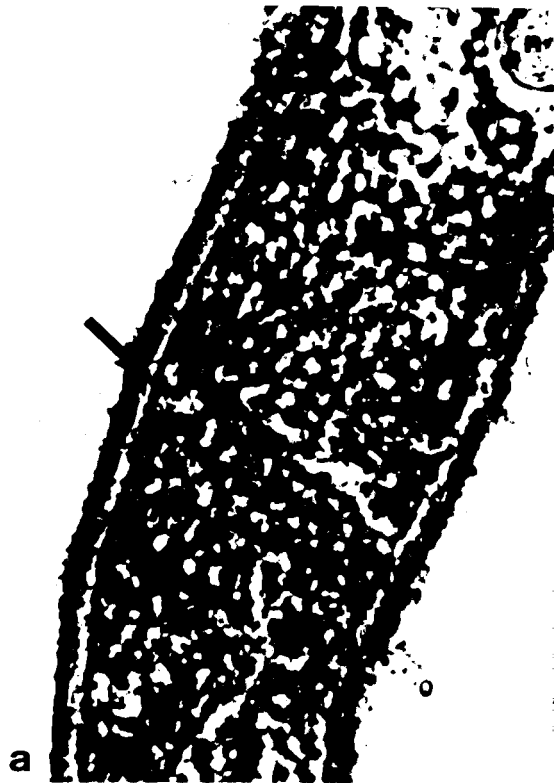
Fig. a - Réaction APS. Forte colorabilité du cytoplasme, et en particulier d'une véritable "ligne APS +" (flèche). x 1.600.

Fig. b - Réaction APS après acétylation, plus de coloration. x 1.600.

Fig. c - Réaction APS après acétylation et saponification. La coloration (cependant moins nette) réapparaît, et prédomine toujours au niveau de la limite ectoplasme-endoplasme (flèche). x 1.600.

Fig. d - Réaction APS après digestion par la salive pendant 1 h. à 37° C. Forte diminution de la coloration. (x 1.600).





Légendes de la pl. XIX

Cytochimie des glucides.

Fig. a - Réaction au TAP-anhydre. Coloration faible, le glycogène ne réagit pas. x 1.600.

Fig. b - Réaction au TAP-non anhydre. Le glycogène réagit et se colore en rouge. x 1.600.

Fig. c - Réaction à l'APS-dimédon. Seul le glycogène réagit. On observe une coloration uniforme de l'endoplasme, en particulier à sa limite (flèche) avec l'ectoplasme. x 1.600.

Fig. d - Réaction au carmin de Best. Coloration sélective du glycogène. x 1.600.





- Observations

Les résultats ont été extrêmement nets pour la localisation précise des polysaccharides, alors fortement contrastés (Pl. XX et XXI). Nous n'avons constaté aucune différence entre les coupes traitées au T.C.H. pendant 1 h. et celles traitées pendant 40 h. Nous pouvons donc éliminer la caractérisation de mucopolysaccharides ou de glycoprotéides, et ne retenir que celle du type glycogène.

Le T.C.H., visualisé par le protéinate d'argent s'est localisé sur les grains décrits déjà en microscopie électronique classique (commentaires de la pl. XI). Les grains polysaccharidiques, rares ou absents dans les crêtes ectoplasmiques sont par contre très abondants dans l'ectoplasme profond, au dessus des myonèmes. A ce niveau, les grains forment une véritable couche de 1 à 2 μ (Pl. XX). Dans l'endoplasme, leur répartition, beaucoup moins importante est quelconque et ne semble pas être en relation avec d'autres organites cytoplasmiques. Par contre la pl. XXI laisse entrevoir les possibilités de relations entre les mitochondries, les grains de type glycogène, les myonèmes, et les vésicules.

Quelle que soit leur localisation, chacun de ces grains polysaccharidiques apparaît toujours formé, après application de la technique au T.C.H.-protéinate d'argent, par un agrégat de sous structures granulaires dont les dimensions varient entre 80 et 160 Å, tandis que les grains ont un diamètre compris entre 800 et 3000 Å. L'opacité des grains est variable : cela peut être en relation avec l'incidence du plan de coupe.

c) Discussion

Si la présence d'inclusions polysaccharidiques est indiscutable (les résultats de la cytochimie optique et de la cytochimie ultrastructurale concordent sur ce point), la qualité de ce polysaccharide doit être discutée (VIVIER, PETITPREZ, LEGRAND, 1969), car elle ne semble correspondre à aucune structure connue du même type.

Légende de la pl. XX

Cytochimie ultrastructurale.

La richesse de l'ectoplasme (ect) en organites est beaucoup plus nette que celle de l'endoplasme (end). En dehors des différentes fibres (fsp et fl) on y trouve les mitochondries (m) et les grains de "paraglycogène" (pg). Les myonèmes sous-jacents (my) voisinent avec des vésicules périmyaires (vp). x 32.000.





Légende de la pl. XXI

Cytochimie ultrastructurale.


On remarque nettement la proximité des éléments suivants : mitochondries (m), le "paraglycogène" (pg), les myonèmes (my) et les vésicules périmyaires (vp). x 60.000.





Les grains existants chez le Spirostome sont en effet différents, par leur taille et par leur aspect, des particules de glycogène décrites dans les cellules d'animaux supérieurs (DROCHMANS, 1962 ; REVEL, 1964 ; THIERY, 1967) : ils peuvent être beaucoup plus gros et forment une unité bien nette (ce qui n'est pas le cas des particules de glycogène α) mais sans membrane.

Ils sont également différents des autres inclusions de même nature ou de nature voisine décrites chez divers Protozoaires (BRESLAU, 1962). Des grains de "paraglycogène" ont en effet été décrits chez des Ciliés parasites et des Ciliés pédonculés (FAURE-FREMIET et THAUREAUX, 1944) mais ces globules sont beaucoup plus gros (quelques microns) que ceux du Spirostome ; des grains polysaccharidiques ont été signalés aussi chez le Stentor (WEISZ, 1949 ; TARTAR, 1958). Chez les Ciliés Ophryoscolécidés, ils ont été caractérisés comme amylopectine (FORSYTH et HIRST, 1953 ; FORSYTH, HIRST et OXFORD, 1953 ; NOIROT-THIMOTHEE, 1960 ; GRAIN, 1966), mais ceux-là aussi sont beaucoup plus volumineux (de 2 à 15 μ de diamètre). Le "paraglycogène" ("zooamylon" de MAUPAS, 1886) est une réserve caractéristique des Sporozoaires, mais là encore, la taille et l'aspect des grains (VIVIER et HENNERE, 1965 ; VIVIER et SCHREVEL, 1966) ne sont pas exactement semblables. Ce "paraglycogène" vient d'ailleurs d'être déterminé également comme amylopectine chez Eimeria par RYLEY (1968).

Chez les Ciliés, outre le "paraglycogène" mentionné ci-dessus, les recherches ont également révélé la présence de glycogène typique, mais uniquement sous forme  (PITELKA, 1965 ; ESTEVE, 1969, chez Paramecium ; MANNERS et RYLEY, 1952 ; LEVY et ELLIOT, 1968, chez Tetrahymena).

DUTTA (1965), par la technique de fluorescence nie la présence de glycogène chez le Spirostome. SAXENA (1968) semble ignorer la présence de glycogène et s'attache à décrire les grains basaux des cils. Cependant les colorations cytochimiques effectuées en microscopie photonique sont néanmoins semblables à celles du glycogène. Il est donc vraisemblable qu'il s'agit d'un polysaccharide très voisin du glycogène typique et de l'amylopectine. Seules les analyses biochimiques et enzymologiques permettront de résoudre cette question et de connaître, par la détermination de l'ordre de grandeur du nombre de molécules d'oses associées et de leur mode de

liaison, la nature exacte du polysaccharide du Spirostome, que, dans l'attente, nous pouvons désigner du nom général de "paraglycogène".

Les relations éventuelles de ce produit de réserve avec la contraction seront examinées à la fin de ce compte-rendu. Si l'on fait encore référence aux planches XI et XIII, on se souvient qu'elles font mention de structures d'allure cristalline, observées dans l'endoplasme. Leur description et leur nature chimique pourraient les faire intervenir aussi dans le processus de contraction.

3°) Etude des cristaux

a) Description

Sur des Spirostomes contractés, des inclusions de matière inerte, d'allure cristalline, se trouvent dans des cysternes ergastoplasmiques (Pl. XXII, fig. a). Elles ont également été décrites dans une note récente (VIVIER, LEGRAND, PETITPREZ, 1969). L'aspect réticulé de ces cristaux provient de l'assemblage de micro-aiguilles rayonnantes, lui donnant une allure "en oursin". Parfois, ils peuvent être directement en contact avec le cytoplasme, et il ne semble pas y avoir à ce moment là de membrane enveloppante.

Chez les Spirostomes fixés en extension (Pl. XXII, fig. b), les mêmes cristaux sont situés le plus souvent dans de grandes vacuoles. Une même vacuole peut renfermer plusieurs cristaux (parfois 8).

b) Composition chimique

Les recherches ont été effectuées par VIVIER, GALLE, BERRY (1968), GALLE, VIVIER et PETITPREZ (1968), par analyse de coupes fines au microscope électronique couplé avec une microsonde électronique. La détection de phosphore, de calcium et de carbone dans des proportions déterminées, a permis à ces auteurs de caractériser l'apatite. PAUTARD (1959), par la technique de diffraction aux rayons X avait penché pour une interprétation d'"hydroxyapatite" $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Les auteurs déjà cités pensent

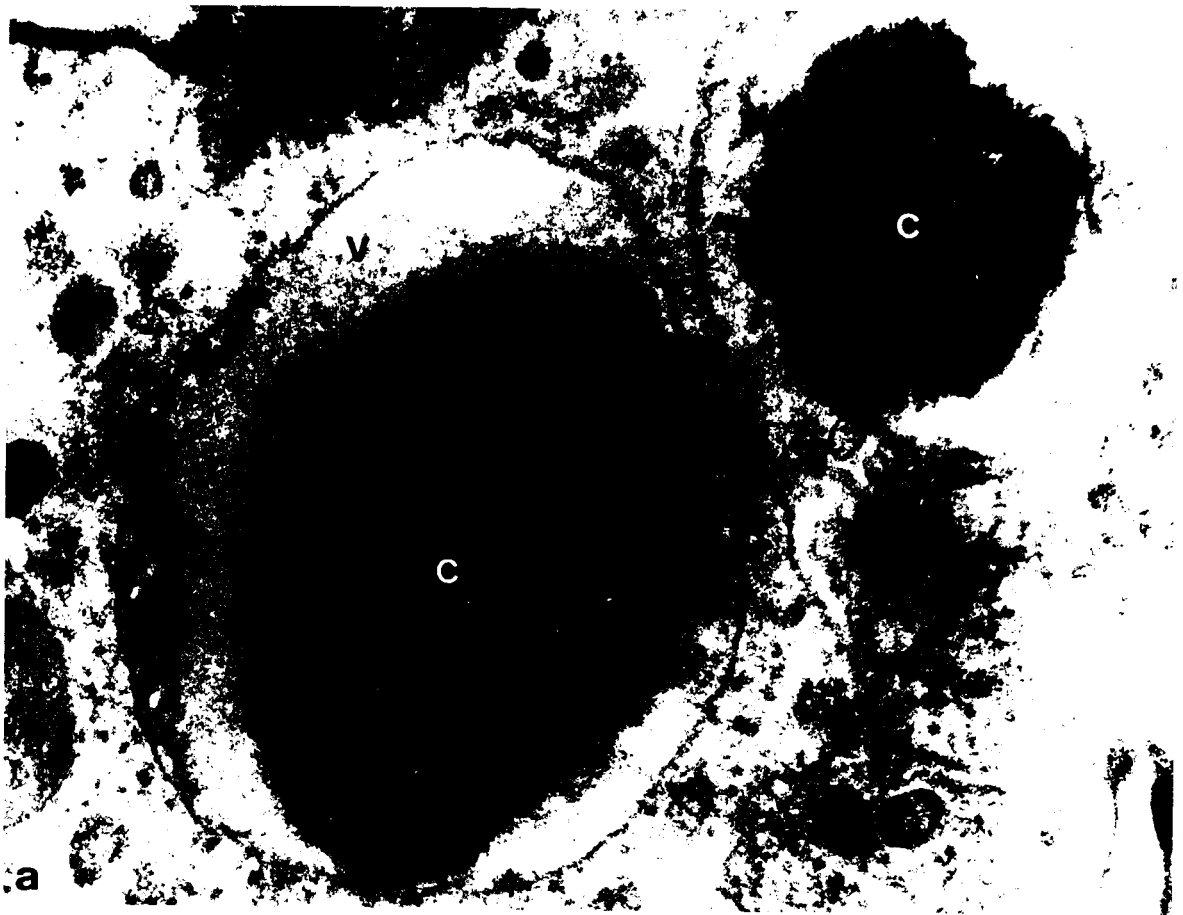
Légendes de la pl. XXII

Les cristaux du Spirostome.

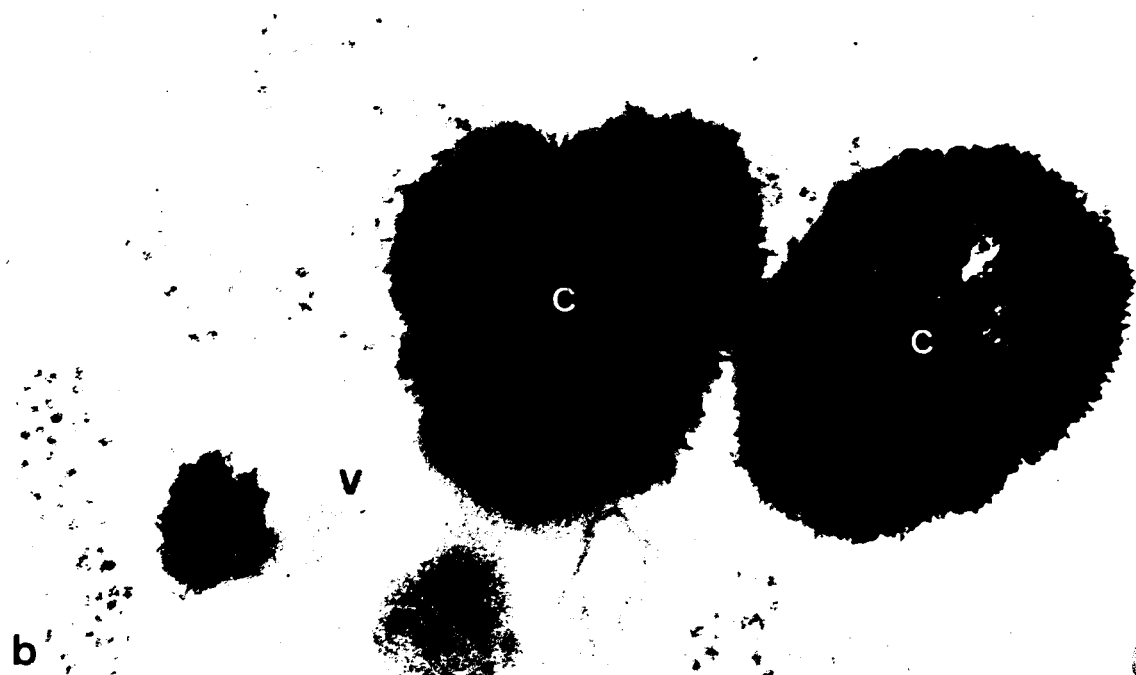
Fig. a - Cristaux du Spirostome contracté. Chaque cristal (c) se trouve souvent dans une vacuole (v). x 70.000.

Fig. b - Cristaux du Spirostome anesthésié. Plusieurs cristaux (c) peuvent se rencontrer dans une même grande vacuole (v). x 70.000.





a



b



plutôt qu'il s'agit de carbonato-apatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)\text{H}_2\text{O}$. La différenciation entre ces deux constituants est délicate et n'est peut-être pas fondamentale, l'essentiel étant de savoir qu'il y a du calcium et du phosphore. Ce qui a été montré par CARTER (1957), par BIEN et PRESTON (1968), puis par comptage autoradiographique, JONES (1966, 1967) a montré les possibilités d'accumulation du calcium et du phosphore, en fonction du milieu extérieur.

c) Discussion

Caractérisons simplement la nature de ces cristaux comme étant de l'apatite. Ils se trouvent isolés dans une vacuole endoplasmique ou parfois directement dans le cytoplasme (c'est le cas des Ciliés contractés) ou ils sont regroupés dans une même vacuole, plus importante (c'est le cas des Spirostomes anesthésiés). Ceci est probablement en relation avec la diminution de volume (donc la réduction des vacuoles et peut-être l'excrétion d'eau) consécutive à la contraction. Mais quelle est la signification de ces cristaux. Constituent-ils, comme le pense JONES (1966, 1967) une forme de déchets, ou au contraire une forme de stockage ? Dans ce dernier cas, pourrait-elle avoir des relations avec la contraction, dans le sens d'une solubilisation opportune des ions provenant de ces cristaux, c'est ce que nous envisagerons dans le dernier paragraphe.

III - ESSAI DE SYNTHÈSE

Les localisations de différents éléments décrits précédemment (en y ajoutant les vésicules adjacentes aux myonèmes) sont troublantes et peuvent laisser envisager des relations entre ces différentes structures, dans le processus de contraction.

Les pl. XXIII et XXIV schématisent l'hypothèse métabolique de la contraction, émise par VIVIER, LEGRAND et PETITPREZ (1969) : quelques points sont certains, d'autres sont probables, beaucoup sont à démontrer.

Les éléments certains concernent la localisation des différents éléments : l'oxygène se trouve dissous dans le milieu de culture ; les mitochondries (à nombreux tubules, en relation possible avec la vie aérobie du Cilié ; VIVIER, 1966) sont proches de la membrane cytoplasmique et se situent au voisinage intime du paraglycogène ; cet ensemble est très proche du complexe myonèmes vésicules (Pl. XXIII). Leur importance métabolique est bien connue (notamment LEHNINGER, 1964). La chaîne respiratoire nécessite, en outre, de l'oxygène. Le produit de dégradation du "paraglycogène", subissant le cycle de Krebs au niveau des mitochondries, libère aussi de l'ATP, qui est nécessaire à la contraction de l'actomyosine (notamment DUPRAW, 1968). Les ions Ca^{++} sont indispensables à la déconnection de l'actine et de la myosine, avec libération d'ADP (acide adénosine diphosphate), qui peut être repris en charge par les mitochondries (Pl. XXIV).

Ce processus, bien connu et décrit chez les Métazoaires, constitue encore, chez les Protozoaires, une hypothèse de travail, qu'il faut sérieusement vérifier. Il faut déterminer le "paraglycogène" du point de vue chimique, de manière à caractériser les enzymes qui doivent le transformer en corps plus simple, pris en charge par le cycle de Krebs (Pl. XXIV). Ceci n'a été abordé que partiellement chez certains Protozoaires (notamment RILEY sur les Coccidies, 1968). Les enzymes respiratoires et l'ATP, difficiles à mettre techniquement en évidence, constituent toutefois une caractérisation générale de toutes les mitochondries. La localisation d'ATPase de type myosine, décrite sommairement chez quelques Protozoaires, (GUINDON et COUILLARD, 1964 sur des Amibes; LEVINE, 1959, sur des Vorticelles) demeure insuffisante. Nos recherches dans ce domaine, laissent présager la présence d'ATPase au niveau des myonèmes.

Par contre, la présence de calcium chez certains Ciliés a été clairement démontrée (FAURE-FREMIET, 1957). Le calcium se trouvant dans les cavités du réticulum endoplasmique qui accompagnent les myonèmes (FAVARD et CARASSO, 1965) a été mis en évidence de façon très nette en microscopie électronique (CARASSO et FAVARD, 1966). Le rôle de ce calcium dans la contraction a été envisagé par ces auteurs et aussi par JONES et Coll. (1966). Nos essais de précipitation du calcium dans ces vésicules périmyaires (équivalentes des vésicules sarcoplasmiques musculaires) n'ont,

Légende de la pl. XXIII

Essai de synthèse sur le processus de contraction
du Spirostome.

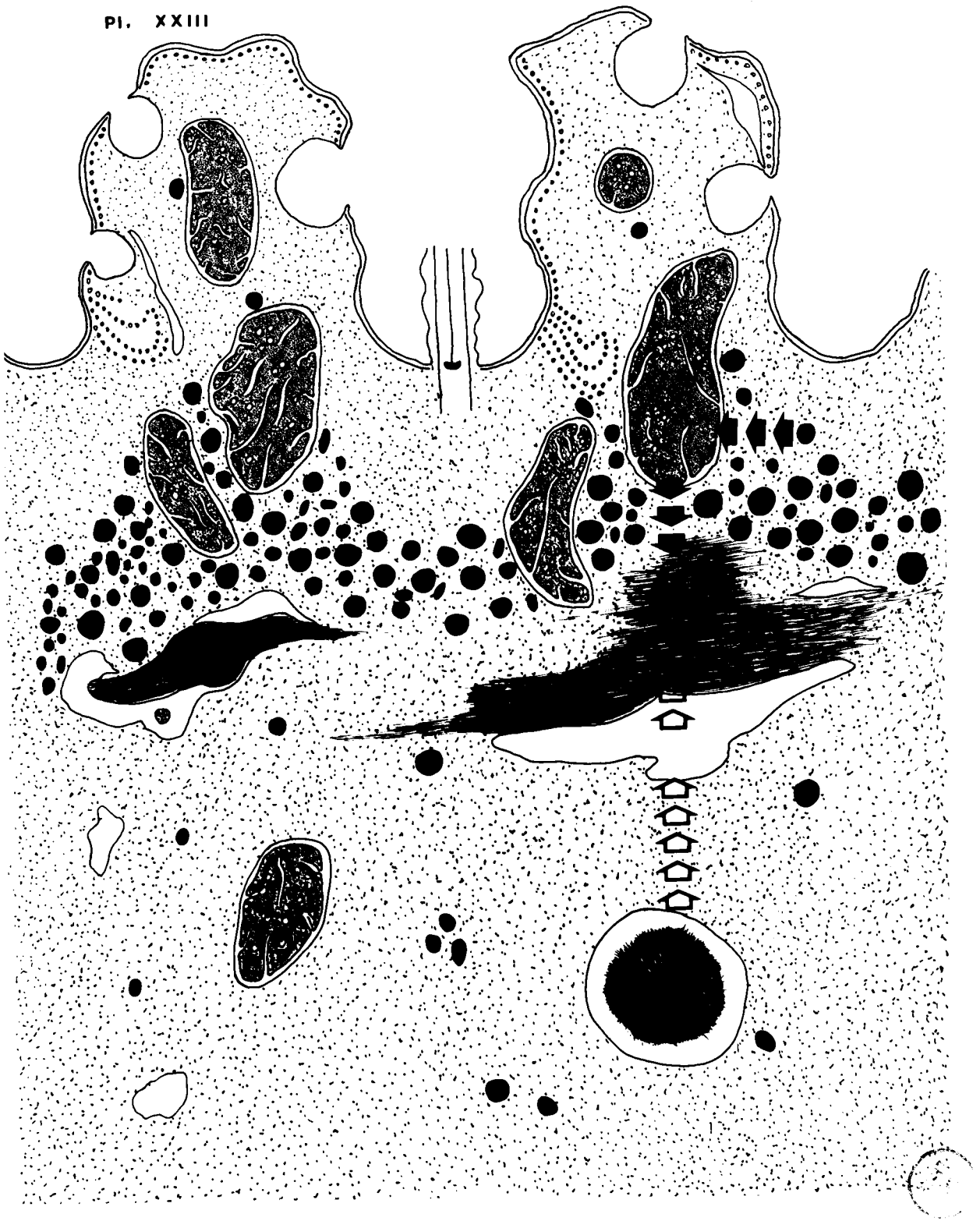
Les relations pratiquement certaines entre le paragly-
cogène, les mitochondries et les myonèmes sont indiquées par des
flèches noires. Les relations hypothétiques entre les cristaux
d'apatite, les vésicules périmyaires et les myonèmes sont signa-
lées par des flèches blanches.

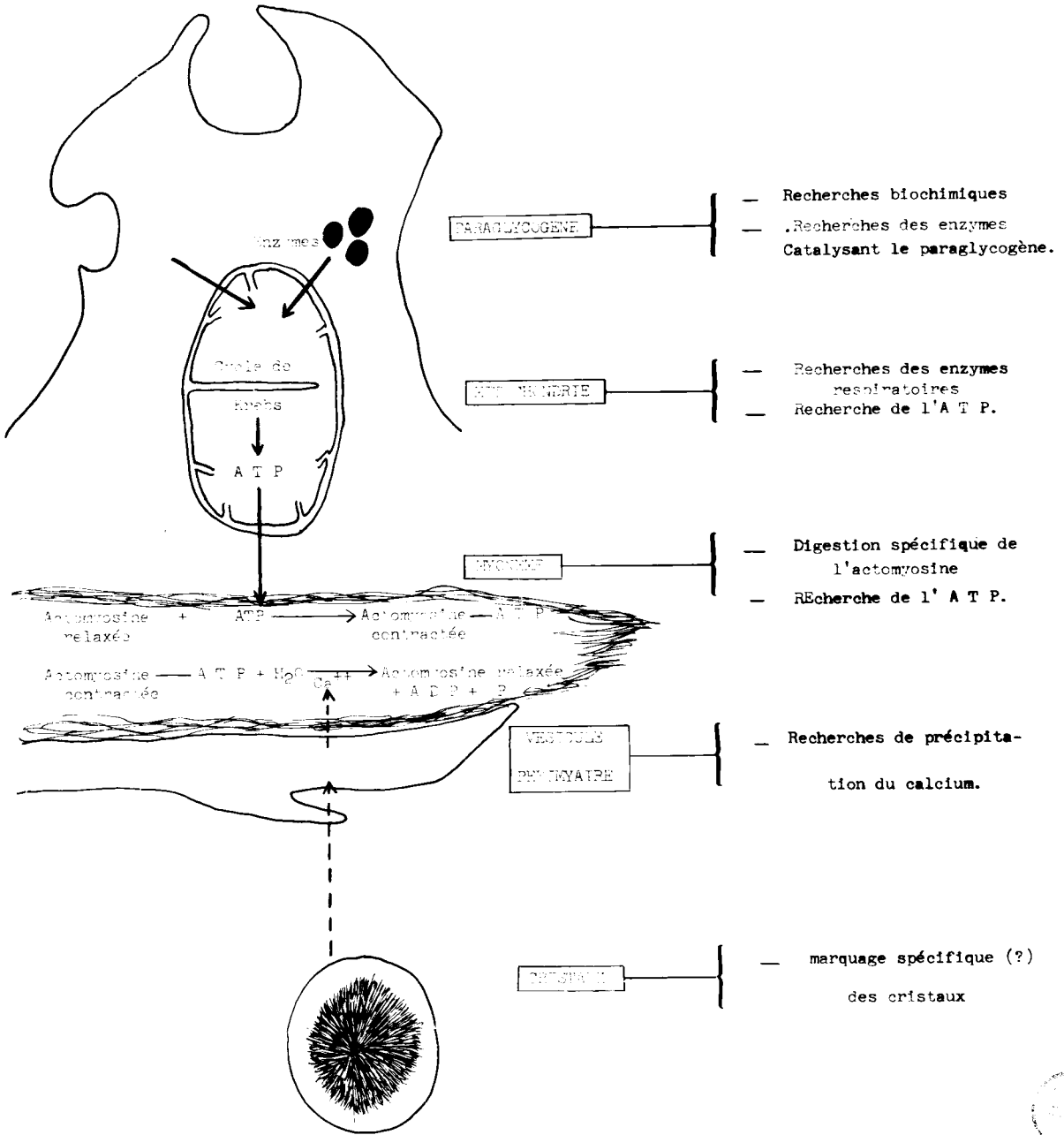
Légende de la pl. XXIV

Essai d'interprétation métabolique de la contraction.

La portion gauche de la planche tient compte de notre hypothèse de travail : à savoir les liaisons possibles entre les différentes structures décrites. La portion droite tient compte des recherches qui restent à effectuer.







jusqu'ici donné aucun résultat. Comme ALLEN et ECKERT (1969) sur Paramecium, nous avons localisé des vacuoles qui se situent sous la membrane cytoplasmique (notamment pl. XX et XXIII). Ces auteurs les associent au réticulum sarcoplasmique du muscle strié. Cette question doit être reprise au sujet du Spirostome. La signification des cristaux d'apatite n'est pas encore connue de façon précise. Peuvent-ils constituer un stock de calcium ? La démonstration ne sera pas aisée. Cependant, du fait que, chez le Spirostome, la contraction vide vraisemblablement une partie du contenu vacuolaire à l'extérieur, l'existence d'une réserve importante de calcium non solubilisé, qui puisse fournir, par une remise en solution opportune les ions Ca^{++} semble être indispensable. Une telle élimination de calcium nécessiterait aussi une incorporation importante de cet élément, ce qu'a effectivement montré JONES (1966, 1967), par l'utilisation de ^{45}Ca et ^{32}P .

Toutes ces données devront être vérifiées de façon rigoureuse.

CONCLUSION

A première vue, il semble que nous soyons en face d'un phénomène de contraction assez analogue à celui des Métazoaires.

Le concept de myonèmes, en qualité d'éléments contractiles du Spirostome, semble être d'interprétation complexe. Leurs différences ultra-structurales entre les animaux anesthésiés et contractés, la réactivité du Spirostome glycérimé aux solutions d'ATP et son contrôle par la microscopie électronique semblent la confirmer. Il reste à préciser leur orientation dans la cellule : les fibres sont-elles circulaires ou longitudinales ; sont-elles réellement discontinues ou est-ce là une conséquence de la fixation ; les structures envacuolisées proches de ces myonèmes peuvent-elles constituer des coupes transversales de myonèmes orientés longitudinalement ou sont-ce des structures banales ? Une étude plus précise doit être entreprise.

La présence de "paraglycogène", de mitochondries, de structures fibrillaires et de structures membranaires semble correspondre à la réunion de tous les éléments nécessaires à la contraction. PITELKA (1969) faisant la synthèse de plusieurs travaux, a émis l'hypothèse d'une orientation des filaments des myonèmes comparable à celle du muscle lisse, les membranes accompagnatrices (celles des vésicules supposées périmyaires) pouvant transmettre l'excitation le long de la fibre, ou pouvant délivrer les métabolites nécessaires à la contraction rapide, ou les deux à la fois.

Toutefois les travaux relatifs aux excitations électriques (JONES, JAHN et FONSECA, 1966) montrent des différences avec la contraction des muscles de Métazoaires : il n'y a pas de formation de potentiel d'action ; l'excitation électrique du Spirostome commence du côté de l'anode. Pour un muscle, il y a formation d'un potentiel d'action et le muscle commence à se contracter du côté de la cathode. Pour SLEIGH (1969) l'excitation chez le Spirostome, résulterait d'une migration des ions dans le champ électrique, ce qui augmenterait la somme de Ca associée aux protéines contractiles, allant de l'extrémité située vers l'anode et se dirigeant vers la cathode. La confirmation de ceci (toujours selon SLEIGH, 1969)

semble être apportée par le fait que la sensibilité du Spirostome au champ électrique est en augmentation quand la concentration en Ca du milieu augmente et diminue quand cette même concentration de Ca décroît.

Ceci peut donc expliquer le processus de contraction. Mais que penser des Ciliés non contractiles et renfermant des structures analogues aux myonèmes. Selon PITELKA (1969), les protéines contractiles pourraient contribuer au tonus et à l'élasticité du Cilié, mais pourraient entrer dans le processus de contraction, quand elles seraient en quantité suffisante.

Il va donc falloir explorer systématiquement ce difficile problème de la contraction. Si une certaine analogie avec la contraction musculaire reste vraisemblable, on vient de voir que les expériences de physiologie amènent des oppositions. Il conviendra donc de se montrer prudent dans nos interprétations, compte tenu du fait que les Protozoaires constituent des cellules organismes, dont les modes de vie sont très différents de ceux des Métazoaires.

B I B L I O G R A P H I E

- ABE S., 1963 - The effect of P-chloromercuribenzoate on amoeboid movement, flagellar movement and gliding movement. Biol. Bull., 124, 107-114.
- ALLEN R.D., ECKERT R., 1969 - A morphological system in Ciliates comparable to the sarcoplasmic reticulum transverse tubular system in striated muscle. J. Cell Biol., 43, n° 2, 4 a.
- ARONSON J.F., DETERT A.M., MORALES M.F., 1968 - Fluorescence staining of glycerinated myofibrils with 1-anilino naphthalene-8-sulfonate. J. Royal Microsc. Soc., 88, 389-397.
- BANNISTER L.H., TATCHELL E.C., 1968 - Contractility and the fibre systems of Stentor coeruleus. J. Cell Sci., 3, 295-308.
- BEAUCHAMP P. de, 1904 - Fixation à l'état d'extension des animalcules contractiles et spécialement des Vorticelles. Bull. Soc. Zool. France, 29, 26-29.
- BIEN S.M., PRESTON F.B., 1968 - Calcification of Spirostomum ambiguum. J. Protozool., 15, n° 2, 251-256.
- BISHOP A., 1927 - The cytoplasmic structures of Spirostomum ambiguum (Ehrenberg). Quart. J. Microsc. Sc., 71, 147-172.
- BOGGS N., 1965 - Comparative studies on Spirostomum silver impregnation of three species. J. Protozool., 12, n° 4, 603-606.
- BOVEE E., 1958 - Nickel sulfate as an anesthetic for protozoa. Turtox News, 36, n° 2, 78.

- BOYDE A., BARBER V.C., 1969 - Freeze-drying methods for the scanning electron-microscopical study of the protozoan Spirostomum ambiguum and the statocyst of the cephalopod Loligo vulgaris. J. Cell Science, 4, n° 1, 223-240.
- BRESLAU A.M., 1962 - Polysaccharides in microorganisms. In "Handbuch der Histochemie" Band II, Polysaccharide, G.F. Verlag, Stuttgart, 1-94.
- BULMER D., 1959 - Dimedone as an aldehyde blocking reagent to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. Stain Technol., 34, 95-98.
- CARASSO N., FAVARD P., 1966 - Mise en évidence du calcium dans les myonèmes pédonculaires de Ciliés Péritriches. J. Microscopie, 5, 759-770.
- CARTER L., 1957 - Ionic regulation in the ciliate Spirostomum ambiguum. J. Exp. Biol., 34, 71-84.
- CLARK A.M., 1945 - The reactions of isolated parts of Spirostomum. J. Exp. Biol., 21, 88-94.
- COLE W.H., RICHMOND E., 1925 - The use of chloretone as an anesthetic for Paramecium. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 22, 231-233.
- CURRAN R.C., 1964 - The histochemistry of mucopolysaccharides. Internat. Rev. Cytol., 17, 149-212.
- DANIEL W.A., MATTERN C.F.T., 1965 - Some observations on the structure of the peristomial membranelle of Spirostomum ambiguum. J. Protozool., 12, 14-27.
- DEMBITZER H.M., HIRSHFIELD H.I., 1966 - Some new cytological observations in the heterotrichous Ciliate, Blepharisma. J. Cell Biol., 30, 201-207.
- DIERKS K., 1926 - Lähmungsversuche an Stentor coeruleus durch Kaliumionen. Zool. Anz., 67, 207-218.

- DROCHMANS P., 1962 - Morphologie du glycogène. Etude au microscope électronique de colorations négatives du glycogène particulaire. J. Ultr. Res., 6, 141-163.
- DUPRAW E.S., 1968 - Cell and molecular biology. Academic Press, 177.
- DUTTA G.P., 1965 - Demonstration of neutral polysaccharides with fluorescence microscopy using acridine orange. Nature G.B., 205, n° 4972, 712.
- ESTEVE J.C., 1968 - Données complémentaires sur le déterminisme du groupement en anneau chez les paramécies. Protistologica, 4, fasc. 2, 243-248.
- ESTEVE J.C., 1969 - Observations sur l'ultrastructure et le métabolisme du glycogène de Paramecium caudatum. Archiv.f. Protistenk., 111, 195-203.
- FAURE-FREMIET E., 1957 - Concrétions minérales intracytoplasmiques chez les Ciliés. J. Protozool., 4, 96-109.
- FAURE-FREMIET E., ROUILLER C., GAUCHERY M., 1956 - Les structures myoïdes chez les Ciliés. Etude au microscope électronique. Arch. Anat. micr. et Morph. exp., 45, n° 2, 139-161.
- FAURE-FREMIET E., THAUREAUX S., 1944 - Les globules de "paraglycogène" chez Balantidium elongatum et Vorticella monilata. Bull. Soc. Zool. Fr., LXIX, n° 1, 3-6.
- FAVARD P., CARASSO N., 1965 - Mise en évidence d'un réticulum endoplasmique dans le spasmonème de Ciliés péritriches. J. Microscopie, 4, n° 4, 567-572.
- FINLEY H.E., 1951 - Electron micrographs of Spirostomum ambiguum. Anat. Rec., 111, 527.

- FINLEY H.E., BROWN C.A., DANIEL W.A., 1964 - Electron microscopy of the ectoplasm and infraciliature of Spirostomum ambiguum. J. Protozool., 11, n° 2, 264-280.
- FORSYTH G., HIRST E.L., 1955 - Protozoal polysaccharides. Structure of the polysaccharide produced by the holotrich ciliates present in sheep's rumen. J. Chem. Soc. G.B., 2132-2135.
- FORSYTH G., HIRST E.L., OXFORD A.E., 1953 - Protozoal polysaccharides. Structure of a polysaccharide produced by Cycloposthium. J. Chem. Soc. G.B., 2030-2033.
- GABE M., 1968 - Techniques histologiques. Masson et Cie, Editeurs, Paris.
- GALLE P., VIVIER E., PETITPREZ A., 1968 - Etude par microscopie électronique couplée à la spectrographie des rayons X, d'inclusions de matière **inerte chez** Spirostomum ambiguum. Electr. Microsc. Fourth Europ Conf., 2, Biology, 439-440.
- GRAIN J., 1966 - Etude cytologique de quelques Ciliés Holotriches endocommensaux des Ruminants et des Equidés. IIe chapitre : Microscopie électronique. Protistologica, 2, fasc. 2, 5-52.
- GRAIN J., 1966 - Observations sur les fibres tubulaires chez les Ciliés Stentor igneus Ehrenberg et Spirostomum ambiguum Ehrenberg. Ann. Stn. biol. Besse-en-Chandesse, n° 1, 71-76.
- GRAIN J., 1968 - Les systèmes fibrillaires chez Stentor igneus Ehrenberg et Spirostomum ambiguum Ehrenberg. Protistologica, 4, fasc. 1, 27-35.
- GRAIN J., 1969 - Le cinétosome et ses dérivés chez les Ciliés. Ann. Biol., 8, fasc. 1-2, 53-97.
- GREBECKI A., KUZNICKI L., 1961 - Immobilization of Paramecium in the chlorhydrate solutions. Bull. Acad. polon. Sci. Ser. Sci. Biol., 9, n° 11, 459-462.

- GUINDON A., CGUILLARD P., 1964 - Localisation par histochimie de l'ATPase de type myosine chez Amoeba proteus. Rev. Canad. Biol., 23, n° 2, 123-127.
- HALE A.J., 1957 - The histochemistry of polysaccharides. Internat. Rev. Cytol., 6, 193-263.
- HEROVICI C., 1961 - Détection histochimique des polysaccharides. Sem. Hop. Pathol. Biol. Française, 9, 19-20.
- HOFFMANN-BERLING H., WEBER H.H., 1953 - Vergleich der motilität von zellmodellen und muskelmodellen. Biochimica Biophysica Acta, 10, 629-630.
- HOFFMANN-BERLING H., 1954 - Adenosintriphosphat als betriebsstoff von zellbewegungen. Biochimica Biophysica Acta, 14, 182-194.
- HOFFMANN-BERLING H., 1956 - Das kontraktile eiweiss undifferenzierter zellen. Biochimica Biophysica Acta, 19, 453-463.
- HOTCHKISS R.D., 1948 - A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. Arch. Biochem., 16, 131-141.
- JAHN T.L., BOVEE E.C., 1967 - Mobile behavior of Protozoa. Res. in Protozool. Ed. T.T. Chen, Pergamon Press, London, 42-200.
- JENNINGS H.S., 1899 - Studies on reactions to stimuli in unicellular organisms. III - Reactions to localized stimuli in Spirostomum and Stentor. Am. Naturalist., 33, 373-389.
- JONES A.R., 1966 - Uptake of ⁴⁵-Calcium by Spirostomum ambiguum. J. Protozool., 13, n° 3, 422-428.
- JONES A.R., 1967 - Calcium and phosphorus accumulation in Spirostomum ambiguum. J. Protozool., 14, n° 2, 220-225.

- JONES A.R., JAHN T.L., FONSECA J.R., 1966 - Contraction of Protoplasm. I - Cinematographic analysis of the anodally stimulated contraction of Spirostomum ambiguum. Cell Physiol., 68, n° 2, 127-134.
- KAMIYA N., KURODA K., 1965 - Movement of the Myxomycete Plasmodium. I - A study of glycerinated models. Proceed. Japan Academy, 41, n° 9, 837-841.
- KAPPNER W., 1961 - Bewegungsphysiologische untersuchungen an der Amoebe Chaos chaos L. II - Die Wirkung von salyrgan, Cystein und ATP. Proto-plasma, 53, 504-529.
- KATZ A.N., 1962 - The influence of cations on the SH reactivity of actin. Proc. 2 nd Meet. Soc. Cell Biol., San Francisco, 89.
- KENNEDY J.R.Jr., 1965 -The morphology of Blepharisma undulans Stein. J. Protozool., 12, 542-561.
- KINOSITA H., 1938 - Electric stimulation of Spirostomum. J. Fac. Sci. Imp. Univ. Tokyo, Sect. IV, 5, 71-105.
- KRISZAT G., 1950 - Die Wirkung von Adenosinetriphosphat und calcium auf Amöben (Chaos chaos). Archiv. für Zoologi 2, 477-490.
- LEGRAND B., 1968 - Essai de fixation en extension du Spirostome, après anesthésie préalable. Protistologica, 4, fasc. 2, 263-270.
- LEHNINGER A.L., 1964 - The mitochondrion. W.A. Benjamin, Inc., 263 p.
- LEVINE L., 1956 - Contractility of glycerinated Vorticellae. Biol. Bull., 111, 319.
- LEVINE L., 1959 - ATPase of vorticellan contractile apparatus. J. Protozool., 6 (suppl.), 16.

- LEVY M.R., ELLIOTT A.M., 1968 - Biochemical and ultrastructural changes in Tetrahymena pyriformis during starvation. J. Protozool., 15, 208-222.
- LISON L., 1960 - Histochimie et cytochimie animales, principes et méthodes. Gauthier-Villars, Paris.
- LOM J., CORLISS J.O., 1968 - Observations on the fine structure of two species of the peritrich ciliate genus Scyphidia and on their mode of attachment to their host. Trans. Amer. Microsc. Soc., 87, n° 4, 493-509.
- MANNERS D.S., RILEY J.F., 1952 - Studies on the metabolism of the protozoa. II. The glycogen of the ciliate Tetrahymena pyriformis (Glaucoma piriformis). Biochem. J. G.B., 52, n° 3, 480-482.
- McMANUS J.F.A., 1946 - Histochemical demonstration of mucus after periodic acid. Nature, 158, 202.
- McMANUS J.F.A., CASON J.E., 1950 - Carbohydrate histochemistry studied by acetylation technique. J. Exp. Med., 91, 651-654.
- MAUPAS E., 1886 - Sur les granules amylicés du cytosome des Grégarines. C.R. Acad. Sc. C II, n° 2, 120-123.
- MAYER M., 1961 - Die fixierung kontraktiler Protozoen. Mikrokosmos 50, 91-94.
- MONTREUIL J., DEFRETIN R., CLAY A., CAENEN A., 1959 - Acide sialique et spécificité de la réaction histochimique de Hotchkiss Mc Manus. C.R. Soc. Biol., 153, n° 8-9, 1354-1357.
- NACHMIAS V.T., 1968 - Further electron microscope studies on fibrillar organization of the ground cytoplasm of Chaos chaos. J. Cell Biol., 38, n° 1, 40-50.
- NAGAI R., KAMIYA N., 1966 - Movement of Myxomycete Plasmodium. II. Electron microscopic studies on fibrillar structures in the Plasmodium. Proceed. Japan Academy, 42, n° 8, 934-939.

- NERESHEIMER E.R., 1903 - Ueber die Höhe histologischen differenzierung bei heterotrigen Ciliaten. Arch. Protistenk., 2, 305-324.
- NGIROT-TIMOTHEE C., 1958 - L'ultrastructure de la limite ectoplasme-endoplasme et des fibres formant le caryophore chez les Ciliés du genre Isotricha Stein (Holotriches Trichostomes). C.R. Acad. Sci., 247, 692-695.
- NGIROT-TIMOTHEE C., 1960 - Etude d'une famille de Ciliés : les "Ophryoscolicidae". Structures et ultrastructures. Ann. Sc. Nat. Zool., t. II, 527-718.
- PAUTARD F.G.E., 1959 - Hydroxyapatite as a developmental feature of Spirostomum ambiguum. Biochim. Biophys. Acta, 35, 33-46.
- PEARSE A.G.E., 1961 - Histochemistry theoretical and applied. J. and A. Churchill L.T.D., London.
- PITELKA D., 1965 - New observations on cortical ultrastructure in Paramecium. J. Microscopie, 4, 373-394.
- PITELKA D., 1969 - Fibrillar systems in Protozoa. Res. Protozool., 3, Ed. T.T. Chen, Pergamon Press, 279-388.
- PUYTORAC P. de, 1959 - Le cytosquelette et les systèmes fibrillaires du Cilié Metaradiophrya gigas De Puytorac, d'après étude au microscope électronique. Arch. Anat. Microsc. Morph. Exp., 48, n° 1, 49-62.
- PUYTORAC P. de, ANDRIVON C., SERRE F., 1963 - Sur l'action cytonarcotique des sels de nickel sur Paramecium caudatum Ehrb. J. Protozool., 10, n° 1, 10-19.
- RANDALL J.T., 1956 - Fine structure of the Protozoan Spirostomum ambiguum. Symposia Soc. Expt Biol., 10, 185-196.

- RANDALL J.T., JACKSON S.F., 1958 - Fine structure and function in Stentor polymorphus. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 807-830.
- REVEL J.P., 1964 - Electron microscopy of glycogen. J. Histochem. Cytochem., 12, 104-114.
- REYNOLDS E.S., 1963 - The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17, n° 1, 208-212.
- RYLEY J.F., 1968 - Amylopectine, the storage polysaccharide of Eimeria tenella. J. Protozool., 15 (suppl.), 31.
- SAXENA D.M., 1968 - Cytochemistry of Blepharisma intermedium and Spirostomum ambiguum (Ciliata : Spirotricha). Ann. Histochem., 14, 291-300.
- SCHAFFER-DANNEEL S., 1967 - Strukturelle und funktionelle Voraussetzungen für die Bewegung von Amoeba proteus. Z. Zellforsch., 78, 441-462.
- SCHAFFER-DANNEEL S., WEISSEN FELS N., 1969 - Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die ATP-abhängige Kontraktion kultivierter Fibroblasten nach Glycerin-Extraction. Cytobiologie, 1, n° 1, 85-98.
- SELIGMAN A.M., HANKER S.S., WASSERKRUG H., DMOCHOWSKI H., KATZOFF L., 1965 - Histochemical demonstration of some oxidized macromolecules with thiocarbohydrazide (T.C.H.) or thiosemicarbazide (T.S.C.) and osmium tetroxide. J. Histochem. Cytochem., 13, 629-639.
- SIMARD-DUQUESNE N., COUILLARD P., 1962 - Ameboïd movement. I. Reactivation "of glycerinated models" of Amoeba proteus with adenosinetriphosphate. Exp. Cell Res. 28, 85-91.
- SLEIGH M.A., 1969 - The Excitation of contractile organelles in ciliate Protozoa. "Progress in Protozoology" Third Internat. Cong. Protozool., Leningrad, Acad. Sci. URSS, 165-166.

- SOTELO J.R., TRUJILLO-CENCZ O., 1959 - The fine structure of an elementary contractile system. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 6, 126-128.
- SPECHT H., 1935 - The culture of Spirostomum ambiguum. *Arch. Protistenk.*, 85, 150-152.
- STOCKEM W., WOHLFARTH-BÖTTERMANN K.E., HABEREY M., 1969 - Pinocytose und Bewegung von Amöben. V. Mitteilung : Konturveränderungen und faltungsgrad der zelloberfläche von Amoeba proteus. *Cytobiologie*, 1, fasc. 1, 37-57.
- SZENT-CYORGYI A., 1949 - Free energy relations and contraction of actomyosin. *Biol. Bull.*, 96, 140-161.
- SZENT-GYORGYI A., 1953 - Chemical physiology of contraction in body and heart muscle. Acad. Press New York, 135 p.
- TARTAR V., 1957 - Reactions of Stentor coeruleus to certain substances added to the medium. *Exptl. Cell Res.*, 13, 317-332.
- TARTAR V., 1958 - Behaviour of certain nutritional reserves in Stentor during cell division. *Anat. Rec.*, 132, 513.
- TARTAR V., 1961 - The biology of Stentor. Pergamon Press, Oxford, London, New-York, Paris, 241-243.
- TCHAHOTINE S., 1921 - Procédés de narcotisation. *C.R. Soc. Biol.*, 2, 228-229.
- THIERY J.P., 1967 - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc.*, 6, 987-1018.
- THOMAS R., 1935 - L'action anesthésique du sulfate de nickel sur Paramecium caudatum. *Bull. Microscop.*, Appl. 3, 73-76.

- TOWNES M.N., BROWN D.E.S., 1965 - The involvement of pH, adenosine triphosphate, calcium and magnesium in the contraction of glycerinates Vorticella. J. Cell Comp. Physiol., 65, 261-270.
- TS'U P.O.P., BONNER J., EGGMAN L., VINOGRAD J., 1956 - Observations on the ATP-sensitive protein system from the plasmodia of a myxomycete. J. Gen. Physiol., 39, 327-347.
- VIVIER E., 1960 - Contribution à l'étude de la conjugaison chez Paramecium caudatum. Ann. Sc. Nat. (Zoologie), 2, 387-506.
- VIVIER E., 1966 - Variations ultrastructurales du chondriome en relation avec le mode de vie chez les Protozoaires. Elect. Micros. Sixth Internat. Congr. Kyoto, vol. 2, Biol., 247-248.
- VIVIER E., SCHREVEL J., 1964 - Etude, au microscope électronique d'une Grégarine du genre Selenidium, parasite de Sabellaria alveolata L. J. Microsc., 3, n° 6, 651-670.
- VIVIER E., HENNERE E., 1965 - Ultrastructure des stades végétatifs de la Coccidie Coelotropha durchoni. Protistologica, 1, n° 1, 89-104.
- VIVIER E., SCHREVEL J., 1966 - Les ultrastructures cytoplasmiques de Selenidium hollandei n. sp, grégarine parasite de Sabellaria alveolata L. J. Microscopie, 5, n° 2, 213-228.
- VIVIER E., GALLE P., BERRY J.P., 1968 - Recherches cytochimiques ultrastructurales par spectrographie des rayons X sur des microinclusions intra-ergastoplasmiques chez Spirostomum ambiguum. J. Microscopie, 7, n° 4, 62 a.
- VIVIER E., LEGRAND B., PETITPREZ A., 1969 - Recherches cytochimiques et ultrastructurales sur des inclusions polysaccharidiques et calciques du Spirostome : leurs relations avec la contractilité. Protistologica, 5, fasc. 1, 145-159.

- VIVIER E., PETITPREZ A., LEGRAND B., 1969 - Etude cytochimique des polysaccharides du Spirostome et importance physiologique de leur localisation. J. Microscopie (abstract), 8, n° 4, 91 a.
- VOLKONSKY M., 1933 - Digestion intracellulaire et accumulation des colorants acides. Etude cytologique des C.sanguines des Sipunculidés. Bull. Biol. Fr. Belg., LXVII, fasc. 2, 136-198.
- WAGTENDONK W.J. VAN, VLOEDMAN D.A. Jr., 1951 - Evidence for the presence of a protein with ATP-ase and antigenic specificity in Paramecium aurelia, variety 4, stock 51. Biochem. Bioph. Acta, 7, 335-336.
- WEISZ P.B., 1949 - A cytochemical and cytological study of differentiation in normal and reorganizational stages of Stentor coeruleus. J. Morph., Philadelphia, 84, 335-364.
- WICHTERMAN R., 1953 - The biology of Paramecium. The Blakistan Company, Inc., New York.
- YAGIU R., SHIGENAKA Y., 1961 - Electron microscopical observation of Condylostoma spatiosum Ozaki and Yagiu, in ultra-thin section. VIII, Myoneme (the contractile fibrils). Zool. Mag., 70, 110-114.
- YAGIU R., SHIGENAKA Y., 1963 - Electron microscopy of the longitudinal fibrillar bundle and the contractile fibrillar system in Spirostomum ambiguum. J. Protozool., 10, n° 3, 364-368.
- ZIMMERMAN A.M., 1962 - Action of ATP on Amoeba. J. Cell Comp. Physiol., 60, 271-280.

