

50.376
1971
30-1

50376
1971
30-1

FACULTE DES SCIENCES DE LILLE

THESE DE TROISIEME CYCLE
(Biologie cellulaire)

Gérard P R E N S I E R

CONTRIBUTION A L'ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES DIFFERENTS STADES DU CYCLE DE
DIPLAUXIS HATTI (GREGARINE MONOCYSTIDEE) PARASITE DE PERINEREIS CULTRIFERA
GRUBE.

Présentée en Mai 1971
devant la Commission d'examen

Jury d'examen

M. M. DURCHON

Président

M. E. VIVIER

Mme E. PORCHET HENNERE

Examineurs



SOMMAIRE

- INTRODUCTION -

I) MATERIEL ET METHODES :

A) MATERIEL

B) METHODES.

- a) Méthode expérimentale d'obtention des parasites..... p. 2
- b) Méthode d'observation in vivo..... p. 2
- c) Méthode d'obtention des larves..... p. 3
- d) Méthode de Microscopie électronique. p. 3

II) RAPPEL DU CYCLE IN VIVO p. 4

III) ETUDE ULTRASTRUCTURALE

Chapitre I : LE TROPHOZOITE - SON EVOLUTION AU COURS DE LA CROISSANCE :

1°) L'épicyte : p. 6

- la paroi
- Formations en relation avec la paroi..... p. 6

2°) La zone d'accolement : p. 7

3°) Le cytoplasme et ses inclusions

- Les Inclusions lipidiques p. 8
- Les Inclusions polysaccharidiques..... p. 8
- Les Inclusions denses..... p. 8
- les mitochondries..... p. 9
- L'appareil de Golgi..... p. 9

4°) Le noyau et la zone périnucléaire :

- L'enveloppe nucléaire p. 9
- Les caryosomes et le nucléo-
plasme..... p. 10

DISCUSSION :

- La paroi..... p. 11
- Formations en relation avec la paroi..... p. 11
- La zone d'accrolement..... p. 12
- Les inclusions cytoplasmiques.....
 - Les inclusions lipidiques..... p. 13
 - Les inclusions polysaccharidiques..... p. 13
 - Les inclusions denses..... p. 14
- Le noyau..... p. 14

Chapitre II : LA GAMETOGENESE

1°) Stade à noyaux progamiques - Evolution de
la paroi :

- Noyaux progamiques..... p. 16
- Evolution de la paroi..... p. 16

2°) Les gamètes

- a) Le gamète mâle p. 17
- b) Le gamète femelle p. 18

DISCUSSION

p. 19

Chapitre III : LA SPOROGENESE

- 1°) Le sporoblaste : paroi et inclusions p. 21
- Discussion..... p. 22
- 2°) Les divisions sporogoniques p. 23

DISCUSSION

p. 24

3°) Le sporozoïte :

- a) La paroi p. 26
- b) Les microtubules sous-
pelliculaires p. 26
- c) Le noyau et les organites
cytoplasmiques..... p. 27

DISCUSSION..... p. 28

- partie antérieure..... p. 28
- L'appareil de Golgi..... p. 29
- Les rhoptries..... p. 29
- Inclusions polysaccharidiques..... p. 30

4°) Formation du complexe membranaire des sporozoïtes, évolution de l'appareil de Golgi.

- a) L'appareil de Golgi
- b) L'individualisation des sporozoïtes.....
 - La partie antérieure p. 32
 - La zone médiane ; disposition des organites
cytoplasmiques..... p. 33
 - Les microtubules sous-
pelliculaires..... p. 34

DISCUSSION..... p. 35

IV) LE MECANISME D'INFESTATION p. 37

DISCUSSION..... p. 38

- CONCLUSION - p. 39

CONTRIBUTION A L'ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES DIFFERENTS STADES DU
CYCLE DE DIPLAUXIS HATTI (GREGARINE MONOCYSTIDEE) PARASITE DE
PERINEREIS CULTRIFERA GRUBE.

INTRODUCTION

Les Grégarines, et surtout celles qui parasitent communément les Annélides Polychètes, ont suscité de nombreux travaux, dont SCHREVEL (1969) donne une revue détaillée. La Grégarine que nous étudions, a été signalée semble t il la première fois par HATT (1961). Cette grégarine coelomique, que VIVIER, ORMIERES et TUZET (1964) ont nommé Diplauxis (1) hatti (2) (n. g., n. sp.) subit toute son évolution en syzygie.

DURCHON et VIVIER (1961) ont montré le synchronisme parfait entre l'hétéronéridation expérimentale et la reproduction de la Grégarine.

L'étude du cycle de Diplauxis en microscopie optique (PRENSIER, D. E. A.) s'était révélée très intéressante, et il nous a paru nécessaire de la compléter par des observations en microscopie électronique. En effet, du point de vue de la morphologie ultrastructurale, c'est essentiellement le trophozoïte qui a retenu l'attention des auteurs. La syzygie n'a été vue que par DEVAUCHELLE (1968), DESPORTES (1966 - 1970), VAVRA et MC LAUGHLIN (1970), et la gamétogenèse et la structure du sporozoïte ne sont connus que chez Stylocephalus (DESPORTES - 1967 - 1969 - 1970) et Lankesteria culicis (SHEFFIELD et coll., 1971). Quant à la sporogenèse, elle est encore pratiquement inconnue. La raison essentielle en est les difficultés de pénétration des fixateurs, contrecarrée d'une part par la paroi du sporokyste, d'autre part par l'enveloppe complexe qui entoure le sporocyste.

A côté de résultats intéressants concernant les trophozoïtes et leur évolution au cours de la croissance, nous avons pu obtenir chez Diplauxis des images des gamètes et de la formation des sporozoïtes qui montrent des caractères originaux.

Par ailleurs, nous avons fait quelques observations sur la biologie de Diplauxis en particulier sur le mécanisme de l'infestation.

(1) de Diplos = double et auxein = croître.

(2) en hommage à HATT.

I - MATERIEL ET METHODES

A) MATERIEL : Les Perinereis que nous avons utilisées proviennent du littoral de la Manche, de la Station de Biologie Marine de Luc-sur-Mer.

Des stages à la station de récolte, au moment de la période de reproduction, ont été très fructueux. Ils nous ont permis d'obtenir des parasites en grande quantité, et d'effectuer des fécondations de Perinereis en vue d'obtenir des larvés.

B) METHODES :

a) Méthode expérimentale d'obtention des parasites.

Au moment de la reproduction naturelle (vers âgés de trois ans) les Perinereis épitoques hébergent toujours dans leur coelome de grandes grégarines visibles à la loupe binoculaire, parvenues au stade de la gamogonie et de la sporogonie. Les Grégarines ne sont pas décelables à la loupe binoculaire chez des individus immatures. Elles s'y trouvent en fait sous forme de très petits trophozoïtes déjà accouplés.

DURCHON et VIVIER (1961 - 1964) ont montré le synchronisme parfait qui existe entre l'hétéronéridation expérimentale et la reproduction de Diplauxis. Parallèlement, aux transformations somatiques de l'hôte, on observe dans le coelome l'apparition de parasites, dont toute la croissance s'effectue en association par couples. L'hétéronéridation, comme la croissance des grégarines sont bloquées par l'hormone cérébrale de l'hôte : il suffit de supprimer l'inhibition du cerveau pour obtenir les parasites, ceci en utilisant les techniques mises au point par DURCHON (Décérébration, coupure en deux tronçons).

b) Méthode d'observation in vivo :

Des ponctions coelomiques régulières, à l'aide de pipettes capillaires, dont le produit est examiné sur lame au microscope à contraste interférentiel, ont permis de suivre in vivo l'évolution du parasite. Une conservation plus ou moins longue est réalisée en chambre humide, sous lamelle lutée à la vaseline, dans de l'eau de mer additionnée de quelques traces de pénicilline 10 000 .

Nous remercions vivement le laboratoire de Luc-sur-Mer pour les vers qu'il nous a envoyés et les stages qu'il nous a autorisé à y effectuer.

c) Méthode d'obtention des larves

Au laboratoire de Luc-sur-Mer, au moment de la reproduction naturelle des vers, il nous a été possible de réaliser des fécondations en cristallisoirs et d'obtenir des larves. En ajoutant à l'eau de mer des cristallisoirs une grande quantité de sporokystes de grégarines (eux-mêmes rejetés avec les produits génitaux) nous avons pu élucider le problème de l'infestation des hôtes.

d) Méthodes de microscopie électronique

L'étude histologique a été réalisée dans un précédent travail (DEA, 1969).

L'étude ultrastructurale a été faite selon les techniques classiques : double fixation glutaraldéhyde - acide osmique dans un tampon phosphate, puis inclusion en Epon ou Araldite. Nous avons également effectué la fixation selon TERZAKIS (1968) : double fixation glutaraldéhyde - acide osmique en tampon citrate, puis passage par l'acétate d'uranyle avec lavage à l'acétate de Sodium.

Les inclusions sont coupées à l'Ultramicrotome PORTER BLUM avec un couteau de diamant. Les coupes recueillies sur grilles parlodionnées sont contrastées par l'hydroxyde de Plomb selon la méthode A de KARNOVSKY (1961) ou le citrate de Plomb selon REYNOLDS (1963), précédé ou non d'un passage dans l'acétate d'uranyle en solution aqueuse ou alcoolique. Nous avons pratiqué la technique cytochimique de mise en évidence des polysaccharides par la thiocarbohydrazide - Protéinate d'Argent (technique de SELIGMAN modifiée par THIERY (1967)).

Les préparations ont été examinées aux microscopes HITACHI H S 7 et HU 11 E.

Nous remercions Madame BREDA pour sa collaboration technique.

II - RAPPEL DU CYCLE IN VIVO

Comme nous l'avons déjà signalé, Diplauxis hatti est une Grégarine Monocystidée dont l'évolution coelomique se déroule en syzygie. Les plus jeunes stades trouvés dans les vers non matures de 1 - 2 - 3 ans non opérés, sont déjà par couples fusiformes (Fig. 1 - 2) de 10 à 20 μ de long sur 2 à 6 μ de large. Ces jeunes trophozoïtes sont doués de mouvements pendulaires très rapides. Après décérébration de l'hôte, à une température constante de 14° C, les couples subissent une croissance rapide (Fig. 3). Dix jours environ après la suppression de l'inhibition cérébrale, les syzygies atteignent 200 μ de longueur. A ce stade, les mouvements pendulaires diminuent d'intensité, et il apparaît des contractions localisées qui parcourent toute la longueur des individus végétatifs, créant des mouvements de type péristaltique (Fig. 4). Dès le début de l'évolution, les trophozoïtes présentent un épicyte comportant de longs et fins prolongements, qui sont des microvillosités, dont le nombre et la taille croissent pendant cette première phase évolutive. Chaque individu du couple possède un noyau ovoïde contenant deux volumineux caryosomes. Le cytoplasme est rempli de granules réfringents de 1,5 à 2 μ de diamètre (Fig. 3 - 5). Quinze jours après la décérébration de l'hôte, les mouvements pendulaires disparaissent, les couples ne présentent plus alors que des ondes de contraction rapides et énergiques (Fig. 5). La taille des trophozoïtes augmente pour atteindre un maximum 25 à 30 jours après l'opération de l'hôte. Les syzygies, au terme de leur croissance, mesurent 600 à 800 μ de long (parfois 1 100) sur 60 à 120 μ de large.

C'est à cette période que débute la gamétogenèse. Les premiers signes de la gamogonie sont la dispersion des deux volumineux nucléoles de chaque noyau (Fig. 6) puis l'effacement de celui-ci. Au cours des divisions progamiques, les microvillosités disparaissent pour faire place à une enveloppe kystique (fig. 7). Les gamètes se forment par découpage du cytoplasme en amas plus ou moins sphériques à partir desquels les éléments sexuels sont progressivement libérés. (Fig. 8 - 9). La majeure partie du cytoplasme participe à l'élaboration des cellules sexuées, seules quelques masses non différenciées subsistent dans le cytoplasme. L'anisogamie est peu visible au microscope optique à cause de la petite taille des gamètes. Les éléments sexuels femelles sont sphériques, d'un diamètre de 3,5 à 4 μ (Fig. 10 - 11). Les gamètes mâles sont légèrement piriformes, d'une taille légèrement inférieure à celle des gamètes femelles, (2,5 à 3 μ) (Fig. 10 - 11). Ils possèdent un flagelle ténu, à peine visible au microscope (Nous n'avons d'ailleurs jamais pu le visualiser sur les photographies).

La fécondation donne des zygotes ovoïdes, mesurant 5 à 6 μ dans leur grand axe. (Fig. 12).

Trois divisions sporogoniques interviennent (Fig. 13 - 14) et chaque copula devient un sporocyste piriforme dont la partie antérieure est différenciée en mucron (Fig. 15). Les sporoblastes, au cours de leur évolution, s'associent en chaînes très longues, et sont ainsi libérés dans l'eau de mer après rupture de la paroi du kyste (Fig. 14 - 15 - 16). Chaque sporocyste contient huit petits éléments vermiformes, de 3 à 4 μ de long sur 1 μ de large et qui restent disposés autour d'un reliquat cytoplasmique assez important, après déhiscence de la spore (Fig. 16).

Au moment de la reproduction des vers épitoques, les sporokystes coelomiques sont rejetés en même temps que les gamètes de l'hôte. Les kystes s'ouvrent, et de nombreux sporocystes restent collés à la gangue mucopolysaccharidique des oeufs fécondés de Perinereis. Lors des fécondations réalisées au laboratoire, les oeufs tombent au fond du cristalliseur et restent collés au verre. Les larves, à l'éclosion, rampent dans l'amas de gangues vides et d'oeufs non fécondés ou avortés. Quand l'intestin des larves devient fonctionnel, il est vraisemblable que ces dernières ingèrent une partie de la gangue, avalant par la même occasion des sporocystes. Nous trouvons souvent dans l'intestin des larves de 5 à 6 segments, des amas de sporocystes (Fig. 17) Par suite sans doute de l'action des sucs digestifs, les spores s'ouvrent et libèrent leurs sporozoïtes. A un stade un peu plus avancé, nous avons pu remarquer, dans le coelome de la larve, la présence de sporozoïtes qui avaient vraisemblablement traversés l'intestin de l'hôte. (Fig. 18). Malgré de nombreuses observations, nous n'avons pu déceler le moment où les individus s'accouplent, moment qui doit être très précoce dans l'évolution. Il est probable que les petits couples de Grégarines restent en atteinte dans les cellules coelomiques de l'hôte.

III - ETUDE ULTRASTRUCTURALE

Chapitre I - LE TROPHOZOÏTE - SON EVOLUTION AU COURS DE LA CROISSANCE.

Nous étudions successivement : l'épicyte, la zone d'accolement, les inclusions cytoplasmiques, le noyau et la zone périnucléaire.

1°) L'épicyte

- La paroi : L'épicyte est caractérisé par la présence de très nombreuses microvillosités (VIVIER et PETITPREZ (1968a)).

La paroi, d'une épaisseur totale de 650 Å, est formée de trois membranes tripartites ou "unit membrane" de ROBERTSON (Fig. 19). Chacune de ces membranes est composée selon le schéma classique de deux feuilletts denses de 25 Å entourant une zone centrale claire de 25 Å, l'épaisseur totale étant de 75 Å. La membrane externe est séparée de la moyenne par un espace clair de 200 à 250 Å, alors que cette dernière ne semble distante de la membrane interne que de 70 Å. Sous la paroi se trouve une couche légèrement opaque aux électrons, épaisse d'environ 250 Å.

Chez les jeunes trophozoïtes, la membrane moyenne de la paroi n'est pas continue (Fig. 23 - 24 - 25), alors qu'elle est bien visible sur les microvillosités (Fig. 24). Nous ne pouvons dire si cette discontinuité est naturelle ou si elle est due à un artéfact de fixation.

Chez les individus âgés par contre, cette même membrane est bien continue. Les microvillosités, dont le diamètre varie entre 0,4 et 0,6 µ ont une base légèrement rétrécie (0,3 µ de diamètre), ceci sur une longueur de 0,25 µ (Fig. 19).

Certaines micrographies (Fig. 27 - 28) montrent nettement au niveau des microvillosités, que la couche dense sous la paroi, présente un aspect discontinu en coupe sagittale. En coupe tangentielle, cette sous-structure confère à la couche dense une striation oblique bien nette. (Fig. 28).

- Formations en relation avec la paroi :

Chez Diplaxia, des vésicules appendues au système membranaire interne sont assez nombreuses, et varient suivant l'âge du trophozoïte. A la différence des autres Grégarines, nous n'avons jamais pu mettre en évidence de vésicules ouvertes directement à l'extérieur, de micropores classiques.

Chez les jeunes syzygies, les vésicules sont très allongées, d'un diamètre de 1 400 Å, et présentent des ramifications internes. (Fig. 20).

Il semble même que ces formations puissent constituer un réseau canaliculaire important, au contenu assez dense.

Chez les trophozoïtes âgés, on rencontre toujours des vésicules sphériques, limitées par deux membranes, et qui proviennent d'une simple invagination du complexe membranaire interne de la paroi (Fig. 21). Leur contenu est peu dense et les vésicules semblent parfois crever dans le cytoplasme (Fig. 22).

2°) La zone d'accolement :

VIVIER et PETITPREZ (1968a) ont montré la particularité de la zone d'accolement chez les jeunes trophozoïtes, à savoir que sa structure est différente de celle de la paroi du trophozoïte, et qu'il existe de nombreuses communications directes d'un individu à l'autre.

Chez les syzygies en début de croissance, la zone de séparation est constituée d'une lame bimembranaire de 0,2 à 0,3 μ d'épaisseur (Fig. 25). Les membranes sont recouvertes, vers le cytoplasme, d'une couche dense aux électrons, analogue à celle qui tapisse la paroi. Les pores, dont on ne connaît nul équivalent chez les autres Grégarines, mettent en relation directe le cytoplasme des deux conjoints ; des organites cytoplasmiques (cisternes du réticulum) s'y engagent souvent (Fig. 25). Chez les couples plus âgés, la zone d'accolement se complique fortement. (Fig. 26). Elle perd sa régularité et présente de nombreux replis très marqués. Par endroit, le nombre des membranes augmente, et l'on peut observer jusque 4 couches bimbimbaires superposées (Fig. 25 - flèche). Les pores sont peu nombreux à ce stade. Cette limite doit être très lâche, car sur le vivant on la voit aller et venir selon les mouvements péristaltiques.

3°) Le cytoplasme et ses inclusions :

Les organites et inclusions cytoplasmiques sont répartis dans tout le cytoplasme par travées irrégulières. Dans un jeune couple, le cytoplasme est envahi par un réticulum granulaire formé de nombreuses vésicules et de courts canalicules. Les ribosomes sont très nombreux, groupés par bandes plus denses (Fig. 29).

Les trophozoïtes âgés ont un cytoplasme également fortement vacuolisé, mais la densité ribosomiale est moins importante. (Fig. 31, Fig. 34 - 35 - 36).

- Les inclusions lipidiques :

De nombreux globules homogènes, de 2 à 4 μ de diamètre, et de densité électronique variable, sont répartis par paquets dans le cytoplasme. (Fig. 29 - Fig. 31). Ces globules, dont la nature lipidique a été démontrée par les réactions cytochimiques spécifiques en microscopie optique et la coloration au Noir Soudan B sur coupe semi fine en Epon (Fig. 32) sont limités par une membrane unitaire (Fig. 29 - 31). Ils sont d'ailleurs souvent en relation étroite avec un dictyosome (Fig. 37 - 38) qui joue peut-être un rôle dans leur élaboration. Dans de nombreux cas, les globules sont coiffés, sur une partie de leur surface, par un saccule lisse de type golgien, indépendant de tout dictyosome (Fig. 29). La quantité de réserves lipidiques augmente fortement pendant la première phase de croissance, jusque l'apparition des mouvements péristaltiques.

- Les inclusions polysaccharidiques

Elles sont pratiquement absentes chez les individus végétatifs très jeunes, juste après la décérébration de l'hôte. Sur les coupes colorées au citrate de Plomb, on ne distingue aucun organite qui puisse faire penser à la présence d'inclusions polysaccharidiques du type paraglycogène (Fig. 29). Sur coupes traitées par la technique de THIERY (1967) (30' de TCH), les inclusions glucidiques apparaissent, éparses dans le cytoplasme (Fig. 30). Elles se présentent sous la forme de bâtonnets, navettes ou massues, d'une taille voisine de 3 000 Å. (VIVIER et coll. 1969). Ces organites diffèrent notablement des grains de paraglycogène classiquement décrits.

Quelques jours après la disparition de l'Hormone cérébrale, de nombreux grains identiques au paraglycogène se multiplient dans le cytoplasme (Fig. 31 - 34 - 36). Ils sont parfois étroitement enserrés par les saccules d'un dictyosome, ce qui traduit probablement des rapports métaboliques. (Fig. 41°).

- Les Inclusions denses :

Elles ne se rencontrent que chez les trophozoïtes en fin de croissance (20 jours après décérébration du ver). (Fig. 34). Ce sont des masses denses aux électrons, non homogènes, et englobées dans une sorte de vacuole. Leur contenu est granulaire, avec des zones plus claires (Fig. 34 - 36). Leur taille est variable (0,5 μ à 6 μ) et l'appareil de Golgi semble aussi participer à leur formation, car il est fréquent de rencontrer

de petites formations de ce type en relation étroite avec un dictyosome (Fig. 39 - 40). Ces inclusions, de petite taille au moment de leur formation (Fig. 34) se soudent vraisemblablement pour donner des masses énormes qui peuvent atteindre 6 à 7 μ (Fig. 36). Leur nature n'a pu encore être déterminée, mais elle pourrait être en partie protéique. Ces inclusions doivent correspondre aux granules sidérophiles décelés en microscopie optique après coloration par l'Hématoxyline de Heindenhein.

- Les mitochondries : Plus ou moins sphériques, elles sont de petite taille (0,2 μ environ). Leur membrane interne émet quelques diverticules qui rappellent les tubules classiques des mitochondries de protozoaires (Fig. 23 - 25 35 - 40). Dans le cytoplasme des trophozoïtes âgés, les mitochondries sont souvent groupées en association avec deux ou trois canalicules du réticulum disposés parallèlement, conférant à l'ensemble un aspect particulier. (Fig. 35).

- L'appareil de Golgi : Les dictyosomes se forment à partir de lames ergastoplasmiques. L'une des faces, agranulaire, émet de petites vésicules, qui se soudent pour former des saccules (Fig. 31). Ce phénomène est très courant chez les sporozoaires (UCHREVEL, 1969a) Généralement, les dictyosomes sont constitués par l'empilement de 4 à 5 saccules aplatis, dont les extrémités forment peu de vésicules. (Fig. 37- 38 - 39 - 40 - 41). L'appareil de Golgi est constitué par de nombreux dictyosomes dont nous avons déjà signalé les rapports morphologiques avec les inclusions cytoplasmiques.

4°) Le noyau et la zone périnucléaire :

Chaque individu du couple possède un volumineux noyau, où sont bien visibles sur le vivant deux grands caryosomes, discoïdes chez les jeunes trophozoïtes, sphériques chez les couples plus âgés. L'observation des mouvements de la grégarine montre l'extrême plasticité du noyau et des caryosomes. D'un point de vue ultrastructural, nous considérerons l'enveloppe nucléaire d'une part, le nucléoplasme et les caryosomes d'autre part.

- L'enveloppe nucléaire : La constitution de l'enveloppe nucléaire des trophozoïtes a fait l'objet d'un travail approfondi par VIVIER (1967). Le schéma proposé par cet auteur ne se retrouve pas totalement dans

le cas de Diplauxis. L'enveloppe nucléaire a une structure classique, formée de deux membranes unitaires de 75 à 80 Å, espacées de 200 Å environ, et percée de nombreux pores (Fig. 42 - 43). Les pores semblent dépourvus de diaphragme (Fig. 42) et l'on ne retrouve pas en coupe tangentielle la structure décrite par VIVIER (1967) (Fig. 43).

Les trophozoïtes âgés présentent une différenciation particulière de la zone périnucléaire. Des lamelles ergastoplasmiques parallèles à l'enveloppe nucléaire viennent la doubler extérieurement. (Fig. XI, 45 - 46 - 47), et certaines images donnent l'impression qu'il existe une double enveloppe (Fig. 45).

La membrane interne de l'enveloppe est tapissée par une couche opaque d'environ 600 Å (Fig. 42). Cette couche peut atteindre une épaisseur considérable, 3 000 Å (Fig. 46) dans le cas de syzygies plus avancées.

- Les caryosomes et le nucléoplasme :

Le caryosome est une masse opaque composée de deux zones de densité différente (Fig. 44 - 45). Ces deux parties semblent être de structure granulaire, alors que dans les cellules de vertébrés, sont décrites une zone granulaire et une zone fibrillaire. DAY, (1968), BERNHARTT et GRANBOULAN (1968). La zone périphérique du nucléole apparaît nettement composée par une densification de granules de ribonucléoprotéines tout à fait analogues aux ribosomes cytoplasmiques (Fig. 42 - 44). Il est d'ailleurs assez remarquable de constater cette ressemblance frappante, aussi bien du point de vue taille que densité électronique. Dans la zone la plus dense du caryosome, la structure granulaire est bien nette (Fig. 44), et il est possible que ce soit à cet endroit que se trouve localisé l'ADN.

Dans certains cas, nous avons pu mettre en évidence des lamelles intranucléaires (Fig. 47) à peu près analogues à celles décrites par DHAINAUT (1969 b - 1970 a - b) dans le noyau des oocystes de Nereis diversicolor et Nereis pelagica.

DISCUSSION

- La paroi : La structure trimembranaire particulière de la paroi des grégarines, signalée pour la première fois par VIVIER et SCHREVEL (1964) peut être considérée comme générale chez de nombreux sporozoaires. (VIVIER et coll. (1965) VIVIER (1969) VIVIER et coll. (1970a) et nous ne reviendrons pas sur ce problème.

Ce qui nous semble plus intéressant dans le cas présent, concerne la structure périodique de la strate sous-jacente à la paroi, au niveau des microvillosités. Ces différenciations peuvent être comparées à celles démontrées chez d'autres Grégarines par SCHREVEL (1969a) à la base des plis de Lecudina tuzetae, et HILDEBRAND (1970) au sommet des plis de la même espèce. HILDEBRAND suppose que cette structure pourrait avoir un rôle dans la contraction.

Chez Diplauxis, les mouvements de contraction sont très énergiques, alors que l'on ne peut déceler que de rares microtubules périphériques isolés. Il n'est donc pas impossible que les structures décrites aient un rôle dans la contraction.

La rareté des microtubules chez cette Grégarine très mobile est un argument supplémentaire à l'hypothèse de plus en plus répandue selon laquelle les microtubules ne seraient pas le support de la motilité.

- Formations en relation avec la paroi.

Les vésicules appendues à la paroi sont assez courantes chez les Grégarines et sont décrites par de nombreux auteurs : SCHREVEL (1969a), DESPORTES et THEODORIDES (1969), REGER (1967), VIVIER (1968), VIVIER et SCHREVEL (1964 - 1966). L'aspect observé chez les jeunes trophozoïtes, avec ramifications dans le cytoplasme, semble assez voisin du "micropyle" des Toxoplasma décrit par SENAUD (1966 - 1967). Pour VIVIER (1968), il s'agit de vésicules de pinocytose se formant par invagination des membranes de la paroi. Sur nos images cependant, il semble que seules les membranes internes participent à la formation de telles vésicules.

La paroi de Diplauxis, comme nous l'avons signalé, ne présente pas de micropores, ou alors ils se trouvent en nombre très restreint et nous ne les avons jamais obtenus sur les coupes. Cette absence ou rareté des micropores, pour des individus quand même très grands, pourrait faire penser à une nutrition par osmotrophie comme le supposaient déjà GRASSE et THEODORIDES (1959). En effet, malgré les nombreux travaux concernant la nutrition des

Grégarines, (VIVIER et SCHREVEL 1964, VIVIER et coll., 1964, CORBEL 1965 - 1966, SCHREVEL et VIVIER, 1965-1966, REGER, 1967, VIVIER, 1968, SCHREVEL, 1968a-b), il n'a jamais pu être démontré avec certitude que les micropores sont le siège de la nutrition. Seuls les travaux de RUDZINSKA et coll. (1957 - 1959 - 1960 - 1965) de FLETCHER et MAEGRAITH (1962) COX et VICKERMAN (1966), AIKAWA et coll. (1966-1967), HEPLER et coll. (1966) ont montré sur différents Plasmodium au stade érythrocytaire, une nutrition par phagotrophie : le matériel sanguin peut être observé à l'intérieur du parasite. Il en est de même chez Babesia rodhani (RUDZINSKA et TRAGER, 1961) et Anthemiosoma garnhami (VIVIER 1969 - 1970 a).

- La zone d'accolement : La zone de séparation entre deux trophozoïtes est très particulière, et ne ressemble en aucun cas aux figures de syzygies données par DEVAUCHELLE (1968) chez Gregarina polymorpha et DESPORTES (1966a - 1970) chez Gregarina blattarum et Stylocephalus. Ces auteurs notent en effet un affrontement des deux épicytes, dont les plis sont encore présents et se réduisent ensuite au cours de la gamogonie. DESPORTES et THEODORIDES (1969) montrent cependant chez Callyntrochlamys que la zone d'accolement des deux individus en syzygie est caractérisée par l'absence de plis, mais là encore chaque trophozoïte a une paroi classique à ce niveau. Sachant que chez Callyntrochlamys, la syzygie se fait tôt, la précocité de l'association chez Diplauxis expliquerait peut-être l'aspect de la zone d'accolement. La phase de sporozoïte libre est en effet très courte, et l'on rencontre toujours les trophozoïtes coelomiques accouplés.

Les inclusions cytoplasmiques :

Le cytoplasme chez Diplauxis n'est pas différencié en zone ectoplasmique et endoplasmique. C'est le cas également de nombreuses Grégarines étudiées en microscopie électronique : Monocystis herculea (VINCKIER et VIVIER (1968), Rhynchocystis pilosa (WARNER (1968), Callyntrochlamys phronimae (DESPOPTES et THEODORIDES (1969). Comme nous l'avons déjà signalé, on ne trouve pas dans la zone périphérique de système fibrillaire ni microtubulaire comme chez Selenidium (VIVIER et SCHREVEL (1964 - 1966), Pyxinoïdes balani (REGER (1967) ou Lecudina pellucida (VIVIER, 1968).

- Les inclusions lipidiques :

Ces inclusions sont très nombreuses, contrairement à ce que l'on note chez les autres Grégarines. On les retrouve à tous les stades du cycle (Trophozoïtes - gamètes - sporocystes).

L'association de globules lipidiques avec des dictyosomes est signalée par DROLLER et ROTH (1966) chez les ovocytes de Lebistes reticulatus guppyi, et TROTTER (1967) dans les cellules de foie de souris. La synthèse des lipides dans le réticulum lisse et l'appareil de Golgi a été montrée par une étude autoradiographique dans le foie de Rat (STEIN et STEIN 1967 a). Signalons qu'elle s'effectuerait dans le réticulum seul dans la glande mammaire (STEIN et STEIN 1967 b) et dans le réticulum et les mitochondries dans le coeur de rat (STEIN et STEIN, 1968). Toutes ces relations montrent une participation très grande des systèmes vacuolaires de la cellule dans les synthèses de substances de réserve. Il est possible que dans le cas des réserves lipidiques, ces dernières servent de support à des protéines (enzymes par exemple) ou qu'elles constituent un stock utilisé en partie au cours des importantes synthèses de membranes qui ont lieu à la gamétogenèse.

- Les inclusions polysaccharidiques :

Chez les trophozoïtes très jeunes, nous avons vu que les réserves polysaccharidiques sont très peu abondantes (VIVIER et coll. 1969) et qu'elles ne sont pas visibles avec les techniques classiques.

Ces réserves apparaissent rapidement, et en grande quantité quelques jours après suppression de l'inhibition cérébrale. On trouve alors dans le cytoplasme, de nombreux grains assimilables à du paraglycogène. SCHREVEL (1969 a - 1970 a - 1970 b - 1971) a précisé les caractères cytochimiques des polysaccharides de réserve des Grégarines et Coccidies. Ses résultats montrent qu'il n'est pas possible d'assimiler le paraglycogène ni au glycogène, ni à l'amidon. RYLEY et coll. (1968 - 1969) chez Eimeria, ont déterminé les réserves polysaccharidiques comme étant de l'amylopectine.

Par leur taille cependant, les grains de Diplauxis, ne ressemblent pas exactement aux grains de paraglycogène classiques, et se rapprocheraient assez des inclusions glucidiques du Spirostomum (VIVIER et coll. 1969 a - c).

L'association de granules de paraglycogène avec des dictyosomes n'a à notre connaissance jamais été décrite. Par contre, chez les sporozoïtes, des liaisons ont été notées entre paraglycogène et : mitochondries chez Coelotropha (PORCHET-HENNERE 1967), cristalloïde chez Aggregata (PORCHET HENNERE 1971), corps paranucléaire chez Eimeria tenella (SCHOLTYSECK et coll. 1968), et enfin chez le macrogamète d'Eimeria, avec du réticulum empilé. (SCHOLTYSECK, 1964). Il faut se demander dans quelle mesure toutes ces associations seraient signe de synthèse, ou des relations purement topographiques.

- Les inclusions denses :

Ce type d'inclusion, jamais décrit semble-t-il chez d'autres Grégarines, a une signification et un rôle encore inconnu. Leur association avec le Golgi est cependant intéressante, puisqu'elle nous permet de remarquer l'extrême polyvalence de celui-ci. Il semble participer en effet à la synthèse de substances différentes, et ceci simultanément. L'apparition et l'augmentation des synthèses sont liées ^{étroitement} à la disparition de l'hormone cérébrale inhibitrice. Une étude approfondie des variations cytologiques et cytochimiques qui font suite à la décrébration se révélera certainement très intéressante, et nous permettra peut-être de préciser l'incidence de l'hormone cérébrale au niveau des synthèses cytoplasmiques.

Le noyau :

L'enveloppe nucléaire présente quelques particularités. Elle est doublée extérieurement par une lame de réticulum, et les pores paraissent avoir une structure simple : pas de diaphragme, et pas de différenciation structurale en coupe tangentielle (on ne retrouve pas les huit amas denses décrits par VIVIER (1967).

La couche dense qui tapisse la membrane interne de l'enveloppe nucléaire, et que l'on retrouve chez d'autres Grégarines telles que Selenidium (MAC GREGGOR et THOMASON 1965 - SCHREVEL (1969), Lecudina (VIVIER 1967) Callyntrochlamys (DESPORTES, THEODORIDES (1969), peut être comparée à la couche décrite sous le nom de "fibrous lamina" et de "Zonula Nucleum limitans" respectivement par FAWCETT (1966) et PATRIZI et POGER (1967) sur des cellules de vertébrés. STELLY et coll. (1970) dans les cellules nerveuses de sangsue, ont montré par une étude cytochimique que cette zone, qu'ils appellent "lamelle dense", est constituée essentiellement de protéines à tendance acide.

Ils suggèrent qu'elle remplit un rôle de soutien pour l'enveloppe nucléaire. Cette hypothèse est très plausible, si l'on considère que chez Diplauxis, nous avons une forte augmentation de l'épaisseur de la couche dense chez des trophozoïtes âgés dont le noyau est énorme (30μ sur 20μ) et garde toujours un aspect bien ovoïde.

La présence d'ADN dans cette zone est donc très problématique. Par contre, il est couramment admis que la chromatine des sporozoaires est incorporée dans un volumineux nucléole (JAMESON (1920) WESCHENFELDER (1938). Elle serait localisée, chez Diplauxis, dans la zone ovoïde interne du caryosome, comme semblent nous le montrer certaines colorations au Feulgen et Vert de Méthyle Pyronine. Mais les colorations sont trop peu démonstratives pour apporter une confirmation solide à cette hypothèse.

Cependant, la présence d'ADN dans les nucléoles est un fait suffisamment établi (GRANBOULAN et GRANBOULAN (1964 - 1965). CHARRET (1968). Mais tant que l'on ne pourra visualiser cytochimiquement l'ADN d'une façon certaine et fine, le problème de sa localisation dans le noyau des sporozoaires restera posé.

Fig. a : Schéma récapitulatif montrant l'ultrastructure d'un couple très jeune.

Il est caractérisé par l'absence d'inclusions polysaccharidiques classiques.

Il existe des canalicules (vé) en relation avec le complexe interne de la paroi.

m.e = membrane externe

m.i 1 + 2 = membranes internes.

mv = microvillosité

E et G : Relation Golgi - Ergastoplasme

z. a = zone d'accolement

po = pores

L = lipides souvent enserrés par un saccule de type golgien (s. g)

mi = mitochondrie

p. n = pore nucléaire

c. d = couche dense sous l'enveloppe nucléaire

N = nucléole

r = ribosomss nombreux.

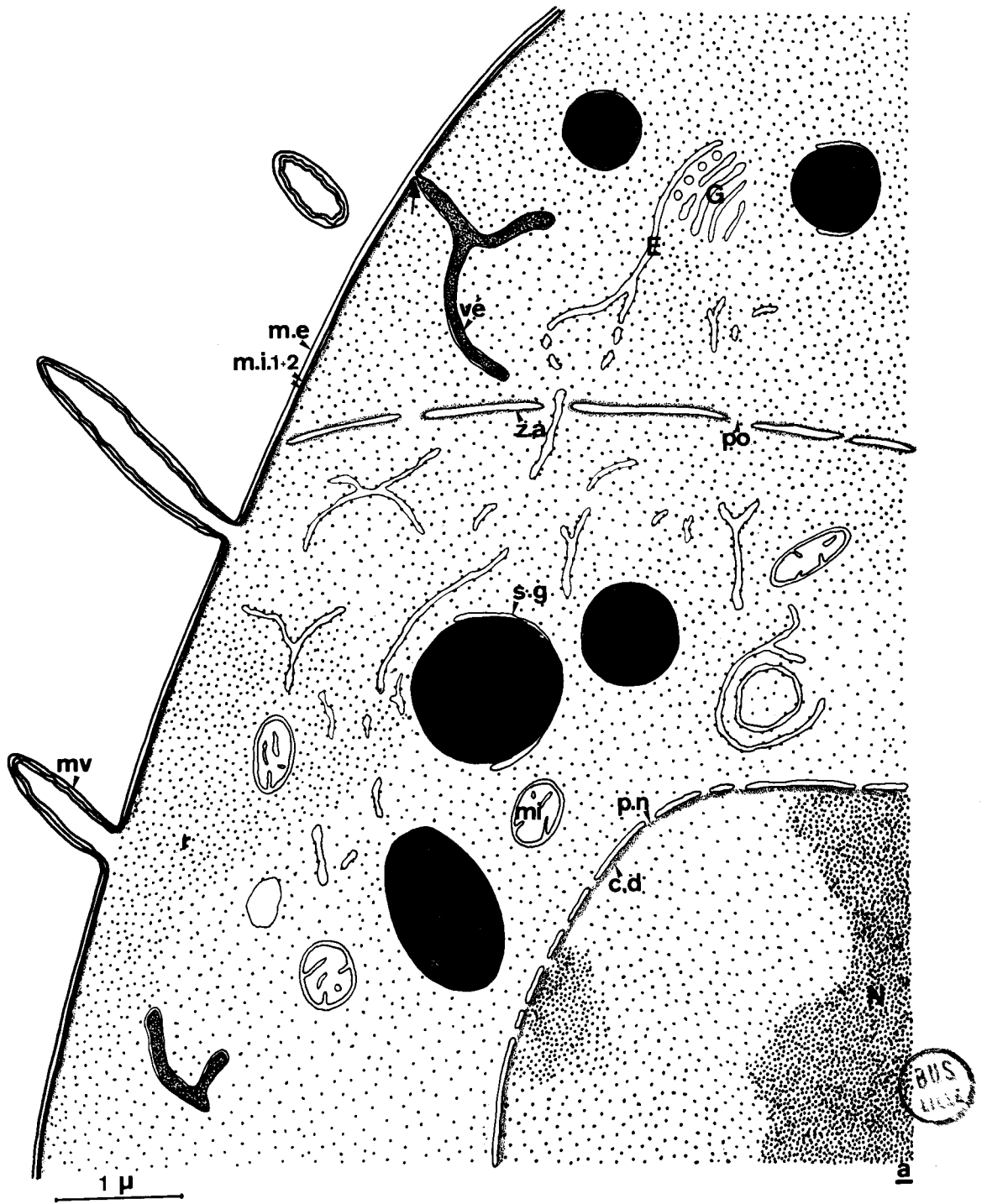


Fig. b : Ultrastructure schématisée d'un trophozoïte âgé.

La paroi est classique avec trois membranes (m - e, m. i 1 + 2). La couche dense sous jacente à la paroi présente une structure globuleuse (flèche) au niveau des microvillosités. Cette structure donne l'aspect d'une striation (st) en coupe tangentielle.

Des vésicules (vé) sont appendues au système membranaire interne.

Les inclusions polysaccharidiques sont abondantes (pg).

Remarquer la relation entre le Golgi (G) et :

lipides (L), paraglycogène (pg), inclusions denses (i. d).

L'ergastoplasme (E) présente des lames concentriques à l'enveloppe nucléaire.

La couche dense (c. d) sous l'enveloppe nucléaire est très épaisse et on note la présence de lamelles intranucléaires (l. i).

Le nucléole (N) présente deux zones de densité différente.

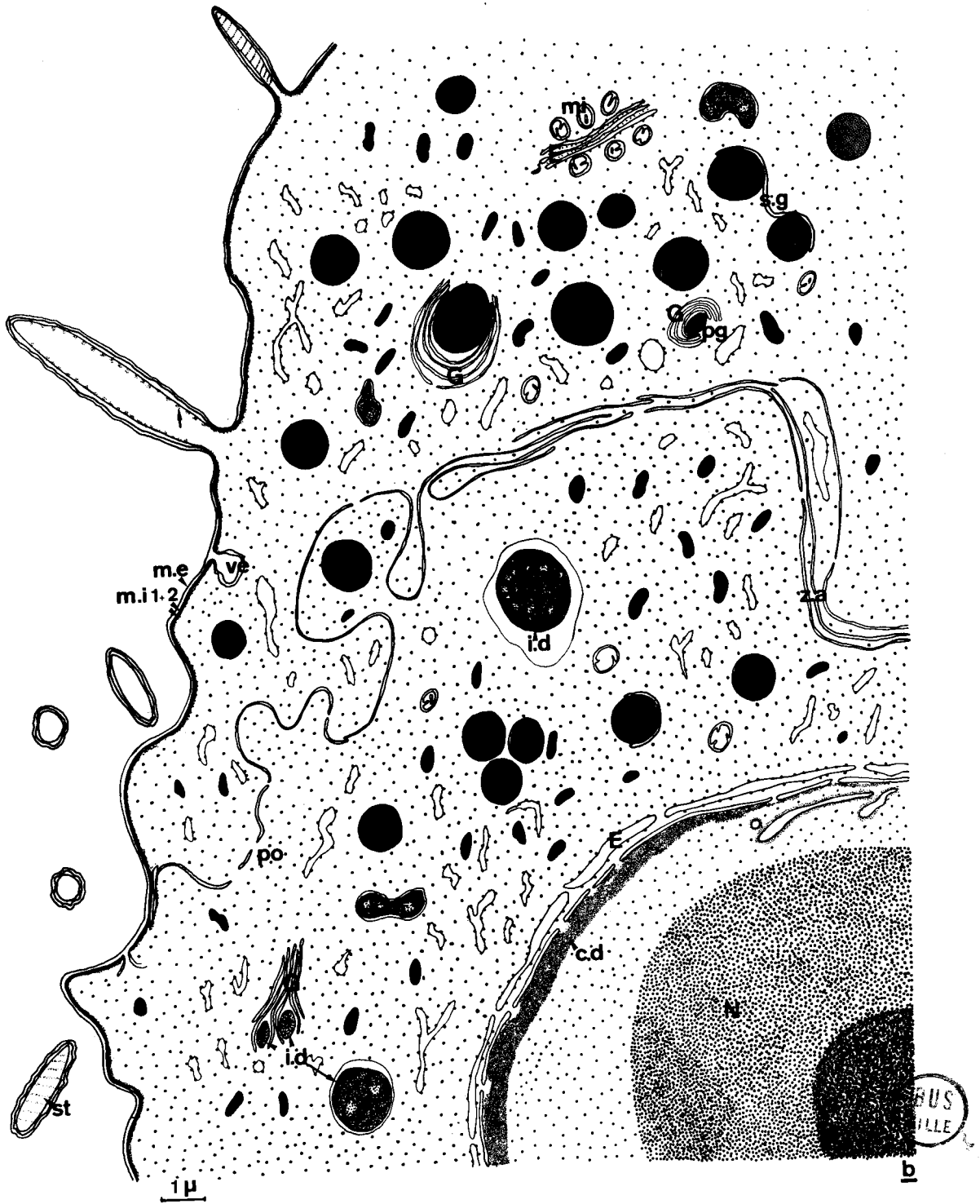
La zone d'accolement (z. a) est fortement contournée.

mi = mitochondries.

s. g = saccule golgien.

po = pores dans la zone d'accolement.





Chapitre II - LA GAMETOGENESE

Nous n'avons pu suivre en microscopie électronique la première division nucléaire des gamontes, ni obtenir d'images des divisions suivantes. Les premiers stades que nous avons observés sont ceux des noyaux progamiques.

1°) Stade à noyaux progamiques - Evolution de la paroi :

- Noyaux progamiques : Dans les gamétokystes en début d'évolution, le nombre des noyaux est restreint (Fig. 48) mais leur taille très petite. Ces noyaux sont très caractéristiques. Ils sont limités par une enveloppe tout à fait classique, percée de pores assez nombreux (Fig. 50). Ils sont toujours entourés par une ou plusieurs lamelles d'ergastoplasme empilées. (Fig. 49 - 50). Ces lames ergastoplasmiques sont par endroits percées de pores, de mêmes dimensions que les pores nucléaires, avec lesquels ils se trouvent en vis à vis (Fig. 50 Flèche). Cette disposition n'est pas sans évoquer les lamelles annelées, structures qui à notre connaissance n'ont pas encore été décrites chez les Protozoaires. Au niveau des pores nucléaires, qui sont pourvus d'un diaphragme, on remarque toujours une densification de matériel. (Fig. 50). La chromatine est très peu apparente, le nucléoplasme semble homogène, avec parfois seulement quelques petites zones plus denses (Fig. 49 - 50). Ceci confère aux noyaux progamiques un aspect très particulier. Selon certaines incidences de coupe, l'enveloppe nucléaire présente une dépression en cupule, remplie d'un matériel finement granuleux (Fig. 49). Cette zone est souvent coiffée par une lame du réticulum. Les observations réalisées sur des stades ultérieurs nous permettent de supposer que cette structure sera à l'origine du fuseau de division.

- Evolution de la paroi : Au cours de la gamétogenèse, la paroi du kyste subit des transformations importantes. Les microvillosités régressent et semblent se résoudre en petites vésicules vides (Fig. 48). La paroi du gamétokyste mur (Fig. 51) est constituée par la paroi du trophozoïte où la composition en trois membranes est beaucoup moins nette. Les microvillosités ont disparu complètement, et extérieurement, le kyste est recouvert d'une couche de $2,5\mu$ environ. Celle-ci est constituée de vésicules vides baignant dans un matériel granuleux très lâche. Il n'existe pas d'épaisse paroi kystique compacte comme c'est le cas chez d'autres espèces de Grégarines.

(DESPORTES, 1970). La couche anhyste, qui est fortement réfringente et donne l'impression de l'existence d'une paroi kystique épaisse en microscopie optique (Fig. 7) est en fait très lâche. Elle est plus ou moins lavée dans le cas de fixations de kystes isolés.

2°) Les gamètes :

Nous n'avons pu suivre la formation des gamètes, et présentons ici, des micrographies de gamètes murs. Ils sont très nombreux, et dispersés dans l'ensemble du kyste (Fig. 51). La majeure partie du cytoplasme du gamonte participe à l'élaboration des éléments sexuels, le reliquat cytoplasmique étant réduit à quelques masses de matériel non utilisé. La distinction entre gamète mâle et femelle n'est pas toujours aisée.

a) Le gamète mâle : Nous identifions celui-ci en tant qu'élément mâle par suite de la présence d'une structure flagellaire.

Ces cellules sont assez petites, limitées par une membrane unitaire classique, et possèdent un volumineux noyau (Fig. 53 - 59). Celui-ci, délimité par une enveloppe classique, possède une chromatine en amas assez denses, généralement répartie à la périphérie, contre l'enveloppe (Fig. 59). Les inclusions cytoplasmiques sont les mêmes que chez les trophozoïtes.

Les globules lipidiques, assez mal conservés par la fixation, ont des contours mal définis et peu réguliers. Ils apparaissent peu denses aux électrons, d'une taille voisine de $0,4 \mu$ (Fig. 52).

Les grains de paraglycogène, qui se différencient parfois assez mal des lipides, sont très clairs, à contour net (Fig. 52 - 55). Les vacuoles du réticulum sont très nombreuses, et les mitochondries analogues à celles du trophozoïte (Fig. 52). Il est possible de distinguer, en outre, de petites vacuoles sphériques, de $0,1$ à $0,2 \mu$ de diamètre, remplies d'un matériel homogène, assez peu dense aux électrons (Fig. 52)

Ces cellules germinales sont pourvues de structures microtubulaires et flagellaires particulières. Nous n'avons jamais pu mettre en évidence de centriole classique, sur les coupes, à quelque stade que ce soit. Le centriole semble remplacé par un paquet de courts microtubules enchevêtrés (Fig. 52-53-54-55-⁵⁶) placé à proximité de la membrane plasmique du gamète. Cette structure doit correspondre au grain sidérophile décrit sur les gamètes, en microscopie optique (PRENSIER D. E. A.).

C'est à partir de cet enchevêtrement de microtubules que partent deux racines flagellaires (Fig. 53 - 54), bien visibles sur une coupe tangentielle à ce niveau. Les flagelles divergent, plongent un peu dans le cytoplasme (Fig. 56) avant de venir courir à la périphérie, sous la membrane plasmique du gamète (Fig. 55 - 56). Le flagelle détermine d'ailleurs un bombement externe de la membrane. Après un trajet assez long dans la cellule, dont le tracé exact est difficile à déterminer sans coupes sériées, les racines flagellaires viennent converger avant de sortir du gamète (Fig. 57). La sortie se fait généralement obliquement (Fig. 58 (59), l'un des deux flagelles s'interrompt d'ailleurs peu après son émergence. (Fig. 61 - 62).

Le fait le plus frappant est la structure même du flagelle. En effet, alors que la structure ennéanème est tenue pour universelle, le flagelle du gamète mâle de Diplauxis est constitué seulement de trois doublets périphériques (Fig. 60). Cette structure, qui semble aberrante, se retrouve aussi bien à l'intérieur du gamète (Fig. 52 - 55) quel que soit le niveau de la section, que dans le flagelle libre (Fig. 60). Au niveau de sa sortie est encore présente la deuxième racine flagellaire (2 fois trois doublets) qui disparaît très vite (Fig. 61-62).

L'observation sur le vivant peut en quelque sorte venir confirmer cette structure anormale de flagelle. Les gamètes mâles sont en effet pourvus d'un flagelle, mais beaucoup plus ténu qu'un flagelle normal. Il ne nous a d'ailleurs jamais été possible de le fixer sur pellicule photographique.

b) Le gamète femelle : Le gamète femelle n'offre à première vue que peu de différence avec le gamète mâle, ne serait-ce l'absence de flagelle. Pourtant, il présente une particularité au niveau de sa paroi. Celle-ci est en effet doublée à l'extérieur par une formation discontinue. (Fig. 63 - 64), une double lame régulière. La lame interne, d'une épaisseur voisine de 60 Å, rappelle par son aspect une membrane unitaire classique. Elle est située à environ 150 Å de la membrane plasmique du gamète. La lame externe, située à 80 Å de la moyenne, est formée par un support membranaire également, doublé extérieurement par un treillis assez dense de fins filaments, qui rappelle un peu des structures de type "glycocalyx" ou "surface coat". Par endroit, ces cellules montrent, intérieurement, des bandes bimembranaires parallèles à la membrane plasmique (Fig. 63 - 65). Ces bandes doivent correspondre à des saccules aplatis du réticulum.

Les éléments femelles sont pourvus, comme les mâles, d'une structure "centrosomienne" (amas de microtubules enchevêtrés) (Fig. 63 - 64) mais qui ne donne pas naissance à des flagelles.

Le noyau est souvent entouré par une ou plusieurs lames concentriques de réticulum (Fig. 63).

DISCUSSION

Les données concernant les gamètes de Diplauxis ne peuvent être comparées qu'aux résultats acquis par DESPORTES sur Stylocephalus (1966 - 1970), qui sont les seuls relatifs à l'ultrastructure des gamètes de Grégariines. Chez les Coccidies, les recherches sur la structure des microgamètes sont très nombreuses.

D'après nos observations en microscopie optique, les gamètes mâles et femelles sont pourvus d'un grain sidérophile latéral, après coloration à l'hématoxyline de Heindenhein. Ce granule correspond sans doute à la structure "centrosomienne" particulière observée en ultrastructure. Comme nous l'avons signalé, les racines flagellaires du gamète mâle émaneraient de ce "centrosome" indifférencié. De même, chez Stylocephalus, DESPORTES (1970) ne remarque pas de centriole classique, mais un amas de microtubules plus ou moins logé dans une encoche du noyau. Ces microtubules, en disposition **presque** conique, sont surmontés d'une zone plus dense. Cet aspect se retrouve aussi bien au moment de la division nucléaire pro-gamique qu'au cours de la poussée flagellaire.

Dans les cas classiques de cellules à centrioles typiques, la poussée du flagelle se fait par allongement de deux microtubules des triplets du centriole, un autre centriole se formant au voisinage de celui-ci par induction du centriole préexistant, comme le montrent RENAUD et SWIFT (1964), MIZUKAMI et GALL (1966), PITELKA (1969). Des observations analogues ont été faites par BRADEBURY et TRAGER (1968) chez Hoemoproteus columbae et HAMMOND et coll. (1969) chez E. auburnensis.

Dans le cas de Diplauxis, la seule présence de microtubules sans organisation bien définie semble suffire à l'induction de la formation des flagelles.

Un deuxième point important, relatif à la composition même du flagelle, se doit d'être discuté. Il est en effet surprenant d'observer une telle anomalie que la structure à trois doublets. PHILIPS (1967) signale des anomalies au niveau des centrioles dans les spermatogonies de Sciara. Il observe des centrioles géants, formés de très nombreux tubules simples. AIKAWA et coll. (1970) dans leur étude sur la microgamétogenèse de

Leucocytozoon simordi, montrent des images d'axonèmes incomplets, à nombre variable de doublets (moins de 9), qu'il considère comme des précurseurs des véritables flagelles définitifs.

DESPORTES (1970) décrit des flagelles à nombre incomplet de tubules (8), mais qui sont des exceptions.

TOSHIO NAGANO (1963) dans le cas de cryptorchidie expérimentale sur les rats, note des changements importants dans la structure du flagelle des spermatozoïdes. Au lieu de doublets, on trouve des tubules simples, en nombre inférieur à 9, et qui pour la plupart sont pleins.

La structure à trois doublets du flagelle des gamètes mâles de Diplauxis est peut être liée à la présence d'une structure "centriolaire" inorganisée.

- Comme chez Stylocephalus (DESPORTES (1970) , le cytoplasme et les inclusions sont très voisins chez les gamètes mâles et femelles, ce qui explique leur faible dimorphisme sexuel.

La paroi additionnelle qui recouvre une partie du gamète femelle constituera ultérieurement la paroi de la spore.

Chez les gamètes, nous avons remarqué la présence de micropores.

(Fig. 52). Ceux-ci sont formés par une invagination de la membrane plasmique qui est doublée, dans le cytoplasme par un matériel fortement dense. DESPORTES (1970) signale également la présence de micropores chez le gamète mâle de Stylocephalus.

Chapitre III - LA SPOROGENESE

L'étude ultrastructuralé de la sporogénèse de Diplauxis nous a permis de déceler un mode particulier de divisions, et un processus original de formation des sporozoïtes.

1°) Le sporoblaste : paroi et inclusions.

La copula, après fusion des deux noyaux gamétiques, dont le mécanisme n'a pas encore été observé, se transforme en sporoblaste à paroi complexe. Nous décrirons ici deux aspects différents de la paroi : celui du jeune sporoblaste uninucléé, celui du sporocyste mur.

La paroi du sporoblaste uninucléé est assez peu complexe (Fig. 67). La membrane plasmique est recouverte extérieurement par une double lame continue. La plus interne, d'une épaisseur voisine de 150 \AA , est située à 100 \AA environ de la membrane plasmique. La lame externe, d'une épaisseur à peu près identique, est recouverte d'un treillis de fins filaments. Cet aspect est très comparable à celui observé chez les gamètes femelles. (Fig. 63). La paroi du sporoblaste uninucléé se formerait par l'extension de la lame bimembranaire recouvrant en partie ces gamètes. Il faut remarquer qu'à ce stade, la bande interne a subi un épaissement.

Chez le sporoblaste plus âgé, nous retrouvons toujours extérieurement les deux bandes denses décrites précédemment, mais avec adjonction, dans ce cas, de deux lames denses supplémentaires d'une épaisseur voisine de 60 \AA (Fig. 68). Elles ressemblent fortement à des membranes unitaires. Cette double couche est intercalée entre le complexe externe (Fig. 67) et la membrane plasmique vraie du sporoblaste. La paroi de ce dernier a alors acquis son allure définitive et est formée par une alternance à peu près régulière de couches claires et denses.

Nous avons tenté d'élucider l'apparition de la deuxième paire de couches denses. Dans le chapitre précédent, nous avons signalé la présence de saccules aplatis bimembranaires, parallèlement à la paroi du gamète femelle (fig. 63). Ces saccules ont vraisemblablement pour origine le réticulum. Il est possible de penser que des saccules identiques viennent se placer sur toute la périphérie de la copula, et que par leur soudure se forme la lame bimembranaire interne de la paroi (Fig. 66). Les membranes subiraient des modifications au cours de l'évolution de la paroi, pour lui donner sa structure définitive.

En coupe tangentielle, les couches de la paroi présentent un alignement régulier de bandes denses et claires, d'une période de 60 Å. (Fig. 69). Les striations des deux lames internes forment entre elles un angle de 30° environ (fig. 69). Au niveau du mucron, la couche dense la plus interne forme un épaississement cône bien apparent. (fig. 70). Une nette striation y est visible.

Suivant les plans de coupe, on peut noter la présence d'expansions cytoplasmiques latérales (Fig. 85). Entre les deux couches externes et les deux couches internes de la paroi se trouve une bande cytoplasmique dépourvue d'inclusions, limitée par une membrane plasmique. Ces différenciations latérales doivent se trouver sur une portion de la surface de la spore, et intervenir sans doute au cours de la déhiscence.

Les inclusions cytoplasmiques du sporocyste sont identiques à celles des gamètes. On retrouve en assez grande abondance de gros granules de paraglycogène, quelques globules lipidiques, des mitochondries allongées, un reticulum endoplasmique granulaire très développé. (Fig. 71 - 72).

DISCUSSION

Le mode de formation de la paroi de la spore, proposé ici n'est encore qu'hypothétique. Toutefois, la présence de bandes cytoplasmiques latérales serait en faveur de notre hypothèse. Il est difficile de prendre des points de comparaison avec des travaux analogues. En effet, les auteurs qui présentent des images de sporoblastes ne peuvent donner que des descriptions imparfaites, ceci à cause des difficultés de fixation. Chez les Grégarines citons les travaux de DESPORTES (1970), VAVRA et McLAUGHLIN (1970).

L'origine des couches de la paroi du sporoblaste des Coccidies (BARDELE (1966), VOLKMANN (1967), PORCHET-HENNERE (1968), HELLER (1969), PORCHET HENNERE et RICHARD (1969)) n'est pas encore connue.

Chez les Coccidies, il existe une épaisse gangue externe, qui fait défaut chez Diplauxis.

2°) Les divisions sporogoniques

L'étude de la sporogénèse en microscopie optique s'est révélée très délicate à cause de la très petite taille des sporoblastes. Ceux-ci sont ovoïdes, d'une longueur de 6 à 7 μ sur 4 à 5 μ de largeur.

L'observation de figures de divisions s'apparentant à des "Métaphases" et "Anaphases", en microscopie optique et électronique a permis de faire facilement le rapprochement entre les deux aspects. Il faut signaler en outre que les divisions sporogoniques et progamiques doivent se dérouler selon le même processus, d'après nos observations en microscopie optique (Fig. 79).

Le sporoblaste uninucléé, comme les gamètes, contient un amas incohérent de courts microtubules enchevêtrés, à proximité de son noyau (Fig. 67). Les divisions sporogoniques, au nombre de trois, conduisent à la formation de huit sporozoïtes. Seule la troisième division a été observée en microscopie électronique. En interphase, les quatre noyaux issus de la deuxième division sont disposés à la périphérie de la spore, à proximité de la paroi. Le premier signe de la division est la différenciation, à deux pôles opposés du noyau, d'une zone cytoplasmique particulière, (Fig. 73 - 74 - 75) située entre la paroi de la spore et l'enveloppe nucléaire légèrement déprimée à cet endroit. Cette zone est dépourvue d'organites, et paraît avoir une structure homogène finement granulaire. C'est vraisemblablement à partir de là que va se former un faisceau de microtubules qui va traverser en un axe médian le noyau (Fig. 78). Ce fuseau de division dépourvu à ses extrémités de tout centriole, se termine à chaque pôle au niveau d'une bande de matériel plus dense, intercalée entre des structures membranaires proches de la paroi. (Fig. 83).

En "Métaphase", le noyau est fusiforme, et est traversé en son axe longitudinal par le faisceau de microtubules (Fig. 78). L'enveloppe nucléaire est toujours présente, mais est interrompue aux deux extrémités, où passe le fuseau. La chromatine est répartie régulièrement autour du paquet de microtubules, sous forme d'une bague. On ne peut y observer aucune différence de densité qui évoque l'individualisation de chromosomes. La condensation de la chromatine est due sans doute à la très petite taille des noyaux, qui ne contiennent que peu de nucléoplasme et pas de nucléole. La séparation de la masse chromatique se fait selon un processus très particulier. La figure de "Métaphase" s'étrangle en son milieu, lui donnant une

forme de haltère à manche court. (Fig. 80). Le phénomène d'étirement se poursuit pour aboutir à la forme d'une vraie haltère, chaque extrémité étant formée par le matériel chromatique limité par l'enveloppe nucléaire (Fig. 81 - 85). Au cours de l'allongement du fuseau et de la séparation des deux masses chromatiques, le faisceau de microtubules est engainé par des cisternes ergastoplasmiques qui se soudent à l'enveloppe nucléaire (Fig. 81-85 - 86). L'ergastoplasme, participe à la reconstitution de l'enveloppe nucléaire en fin de division (Fig. 86). Parfois, l'enveloppe pénètre en partie à l'intérieur d'un noyau fils, mais de façon irrégulière. Cet aspect est bien visible, aussi bien en coupe longitudinale (Fig. 81) que transversale (Fig. 86).

Le manchon ergastoplasmique n'est pas continu, il présente des interruptions, au niveau desquelles il est en relation avec l'ergastoplasme du sporoblaste (Fig. 81 - 86). Les figures 87 - 88 montrent deux vues d'ensemble de sporoblaste lors de la troisième division sporogonique. La disposition des fuseaux de division, va déterminer la place des noyaux autour desquels vont s'individualiser les sporozoïtes. Un schéma récapitulatif montre cette disposition. (Fig. c).

DISCUSSION.

La division sporogénétique chez Diplauxis présente des caractères particuliers : la densité du matériel chromatique et l'absence de signes visibles d'individualisation de chromosomes, le passage du fuseau de division au travers de l'enveloppe nucléaire, la forme particulière des figures de division avec la participation bien nette de l'ergastoplasme.

Au cours de l'"Anaphase", la pénétration de l'enveloppe nucléaire qui semble délimiter incomplètement une partie de la masse chromatique rappelle un peu les chromosomes engainés dans une structure bimembranaire décrits par DESPORTES (1970) au cours des divisions progamiques chez Stylocephalus. Cependant, chez Stylocephalus, dès la Métaphase, les chromosomes sont bien individualisés, limités par l'enveloppe nucléaire, et reliés aux microtubules du fuseau par l'intermédiaire de cinétochores.

Chez Diplauxis par contre, on ne remarque jamais de différenciations semblables, la chromatine paraissant toujours bien homogène.

- Chez les Protozoaires, deux types essentiels de division ont pu être mis en évidence : l'orthomitose et la pleuromitose. HOLLANDE et VALENTIN (1968) chez des Flageī liés Hypermastigines, montrent un type de

division où l'enveloppe nucléaire persiste, mais les fibres chromosomiques sont extranucléaires ; les chromosomes sont fixés à des cinétochores différenciés au contact même de l'enveloppe nucléaire.

HOLLANDE et CACHON (1969) notent chez des Radiolaires et Foraminifères, que les fibres sont intranucléaires et fixées au niveau de l'enveloppe nucléaire à des plaques atractophoriennes d'une part, à des cinétochores, intranucléaires également, d'autre part. Ce type de mitose, dit "dinomitose atractophorienne", a été décrit également dans divers groupes inférieurs par ROBINOW et MARAK (1966) chez des Levures, SPRAGUE et VERNICK (1968) et VINCKIER, NEVAUCHELLE et PRENSIER (1971) chez les Microsporidies, PERKINS (1969) chez les Haplosporidies, TERZAKIS et coll. (1967), AIKAWA (1966), AIKAWA et coll. (1967) chez les Hémosporidies, BIANCHI et coll. (1969) chez une Leishmania.

Tous ces auteurs décrivent des types de pleuromitoses à peu près similaires, où le faisceau de microtubules vient s'insérer sur une zone différenciée de l'enveloppe nucléaire, la chromatine bien visible étant située au centre du fuseau à la métaphase.

Chez Diplauxis, le faisceau de microtubules est intranucléaire mais traverse l'enveloppe par effraction, et vient s'insérer sur une densification externe, analogue à la structure condensée surmontant la masse centrosomienne décrite par DESPORTES (1970) chez Stylocephalus.

Une autre particularité consiste en la densité de matériel chromatique dans le noyau en cours de division. Ceci est dû vraisemblablement à la très petite taille des noyaux, les chromosomes occupant tout l'espace situé autour des microtubules.

La division sporogénétique de la Grégarine étudiée montre certains aspects déjà décrits au cours des divisions d'autres protozoaires, mais présente des particularités qui lui donnent une originalité certaine. Des observations ultérieures, relatives à la division des noyaux progamiques viendront certainement préciser les modalités exactes du déroulement de la division chez Diplauxis. Il serait très intéressant également de savoir comment s'effectue la première division sporogénétique, puisqu'il est généralement reconnu (GRASSE, 1953) que c'est à ce moment que se produit la Réduction chromatique;

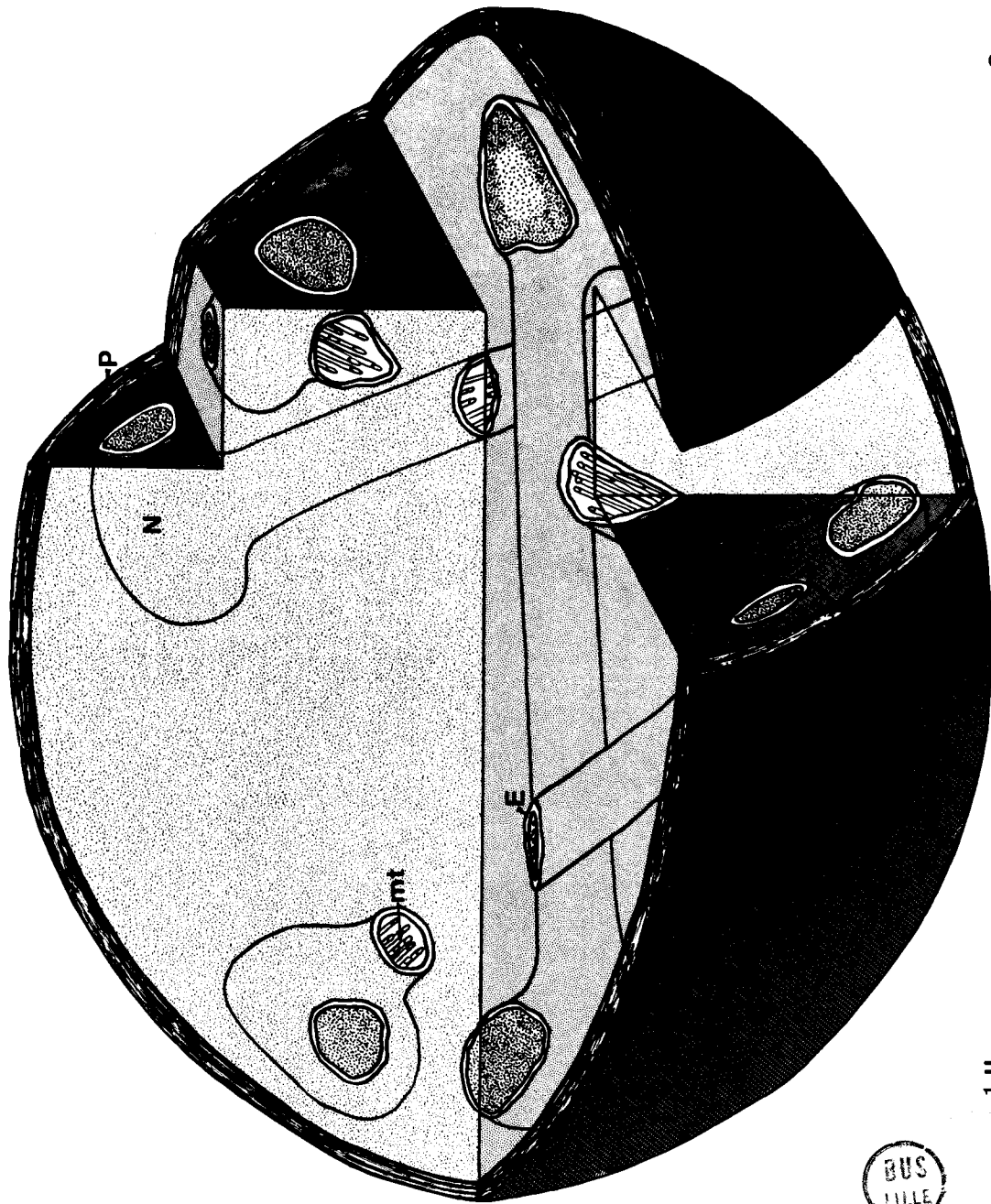
Fig. c : Nous avons essayé ici de montrer la place prise par les noyaux en fin d'Anaphase de la 3ème division sporogonique.

N = noyau.

P = paroi du sporoblaste

E = Ergastoplasme

mt = microtubules du fuseau de division.



91

1 μ

BUS
LILLE

3°) Le sporozoïte

Avant d'entreprendre l'étude de la formation du sporozoïte dans le sporoblaste, pour la bonne compréhension du processus d'individualisation, il nous a semblé utile de connaître d'abord la structure fine des germes infectieux mûrs.

a) La paroi : Le sporozoïte, en forme de banane légèrement arquée, a une longueur de 3 à 4 μ sur 1 μ de largeur. Il est limité par une paroi complexe formée d'une membrane externe de 80 Å d'épaisseur (les 3 feuillets sont bien visibles) recouvrant un complexe membranaire interne (Fig. 117 - 118). Celui-ci est constitué de deux membranes étroitement accolées (chacune d'une épaisseur inférieure à celle de la membrane externe), 60 Å environ, et situé à environ 250 Å de cette dernière.

Les membranes internes sont interrompues à la partie antérieure sous forme d'un cercle (Fig. 113). A ce niveau, aucune structure qui puisse faire penser aux formations habituelles aux germes des Sporozoaires (conoïde et annexes) n'est visible. Sur certaines coupes obliques, la partie terminale des membranes internes, au niveau de leur interruption, semble légèrement épaissie. (Fig. 113).

Nous n'avons jamais observé de micropores sur les sporozoïtes, mais nos coupes n'ont pas forcément passé à leur niveau s'ils existent.

b) Les microtubules sous-pelliculaires.

Sous la paroi, des microtubules classiques, d'un diamètre de 220 Å, courent sur toute la longueur du germe (Fig. 115 - 119 - 120). Ils sont interrompus à la partie postérieure, ce qui peut s'expliquer par le fait que le sporozoïte reste pendant un certain temps en relation avec le reliquat cytoplasmique du sporocyste au moment de sa déhiscence. Le nombre exact de microtubules n'a pu être déterminé, mais doit se situer aux environs de 25 (Fig. 120). Sur nos images, les sporozoïtes ayant juste achevé leur individualisation, la disposition des microtubules périphériques n'est pas régulière et rappelle celle qu'ils occupent au cours de leur formation (Fig. 101). Entre les microtubules, des rangées longitudinales de ribosomes sont régulièrement intercalées (Fig. 115 - 119) et donnent à la zone sous-pelliculaire un aspect très original.

Les microtubules viennent s'insérer à la partie antérieure,

sur la couronne apicale déterminée par l'interruption du complexe membranaire interne. (Fig. 111 - 113).

c) Le noyau et les organites cytoplasmiques :

Le noyau, médian, est limité par une enveloppe double qui semble dépourvue de pores. La chromatine assez dense est périphérique. Il n'y a pas de nucléole (Fig. 114 - 117 - 118). Le noyau émet, vers la partie antérieure, un haut diverticule assez mince, qui forme une cupule très profonde (Fig. 112 - 118) où se trouve logé un dictyosome (Fig. 114 - 118 - 123). La membrane externe de l'enveloppe nucléaire, qui se trouve vis à vis du Golgi, émet de petites vésicules qui se soudent pour former des saccules aplatis (Fig. 117 - 118). Au pôle opposé, le dictyosome se résoud en petites vésicules claires, qui après coalescence donnent des vacuoles sphériques de 500 Å environ. Leur contenu est homogène et moyennement dense aux électrons (Fig. 114-118 - 122).

Certaines images montrent nettement l'existence, vers la partie antérieure du sporozoïte, d'un deuxième dictyosome dont les saccules émettent des vésicules à évolution similaire à celles du Golgi proche du noyau. (Fig. 114).

Les vacuoles sphériques issues de la fusion des vésicules golgiennes subissent une évolution rapide. Elles forment, par coalescence, des masses très allongées, d'un diamètre d'environ 600 à 700 Å et limitées par une membrane (Fig. 111 - 113 - 122). Ces masses se pédiculisent à une extrémité et prennent la forme de bouteilles très allongées. Les goulots ainsi constitués viennent s'accoler à la partie antérieure, sur la membrane externe, en passant par l'interruption des membranes internes (Fig 111 - 113). Un grand nombre de ces organites viennent ainsi converger vers l'extrémité antérieure.

Nous pouvons assimiler ces organites à ceux que SENAUD (1967) appelle rhoptries chez Toxoplasma et Sarcocystis.

Dans la partie antérieure sont parfois visibles des inclusions sphériques ou ovoïdes, dont la densité aux électrons rappelle un peu celle des globules lipidiques du sporoblaste (Fig. 114 - 122 - 123).

La zone postérieure au noyau contient également quelques sphérules d'un aspect analogue à celui des rhoptries.

De petits granules de paraglycogène, sans forme bien définie, d'une taille d'environ $0,1 \mu$, sont répartis dans le cytoplasme, mais surtout dans la partie médiale (Fig. 114). Les inclusions polysaccharidiques sont plus opaques que les rhoptries, et sont très bien mises en évidence par la réaction de SELIGMAN modifiée par THIERY. ⁽¹⁹⁶⁷⁾ (Fig. 121).

Les mitochondries, sont très rares et situées dans la partie postérieure. (Fig. 123).

DISCUSSION :

. Partie antérieure : les études ultrastructurales du germe infectieux des Grégarines sont peu nombreuses. Le principal travail sur ce sujet est celui de DESPORTES (1967 - 1969) et il concerne le sporozoïte de Stylocephalus. (SCHREVEL (1968 - 1969) décrit des mérozoïtes de Selenidium.

Une différence fondamentale entre les formes observées par ces auteurs et le sporozoïte de Diplauxis est l'absence de conoïde chez ce dernier. La partie antérieure est seulement définie par une interruption localisée des membranes internes.

Les microtubules sous-pelliculaires viennent s'insérer directement à ce niveau, alors que chez Stylocephalus, ils viennent se fixer à la base du conoïde, sur des structures mal définies. Par l'absence de conoïde, la partie antérieure du sporozoïte de Diplauxis s'apparente fortement à celle des Hémosporidies (Plasmodium - piroplasma) (PORCHET HENNERE et VIVIER (1971)). Le conoïde doit jouer, selon l'hypothèse la plus communément admise (SCHOLTYSECK, MEHLHORN et FRIEDHOFF (1970)), un rôle mécanique dans la pénétration dans la cellule hôte, en coulissant selon un axe ou en se détendant comme un ressort.

PORCHET HENNERE et VIVIER (1971) pensent que l'absence de conoïde chez les Hémosporidies serait lié à un mode particulier de pénétration, car il s'agit de parasites dont une partie du cycle se déroule dans le sang. En ce qui concerne Diplauxis, les seuls stades que nous ayons rencontré sont intracellulaires (voir chapitre ~~1~~) et intracoelomiques. Le passage au niveau de l'intestin de l'hôte se fait vraisemblablement par un phénomène voisin de la phagocytose, le parasite étant toujours englobé dans une vacuole dans les stades intracellulaires.

. L'appareil de Golgi :

La disposition particulière d'un dictyosome, niché dans une cupule du noyau semble être assez générale chez les germes infectieux de Sporozoaires. De nombreux auteurs signalent une relation étroite entre Golgi et enveloppe nucléaire : SHEFFIELD (1966) chez Besnoitia, OGINO et coll. (1966), SENAUD (1967), SHEFFIELD et coll. (1968), VIVIER (communication personnelle) chez Toxoplasma, PORCHET HENNERE et RICHARD (1971) chez Aggregata, ANDREASSEN et BENTNKE (1968) notent, chez les mérozoïtes d'Eimeria mivairii que l'enveloppe nucléaire qui fait face au Golgi est dépourvue de ribosomes, mais sans montrer la formation de vésicules. Il est vraisemblable cependant qu'à cet endroit privilégié il se produit un renouvellement des saccules golgiens par perlage et fusion de petites vésicules issues de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire.

STANG VOSS (1970), dans les spermatides d'Eisenia foetida, décrit également une formation du Golgi à partir de l'enveloppe nucléaire.

Ce phénomène semble être assez courant, surtout chez les Sporozoaires, tout comme la formation de dictyosomes à partir de l'ergastoplasme.

. Les rhoptries :

Comme le signalent PORCHET HENNERE et VIVIER (1971), la confusion la plus totale règne au sujet de ces organites. Nous éliminerons les termes de "toxonèmes", "paired organelles" pour ne retenir que celui de rhoptries qui ne préjuge ni de leur fonction ni de leur nombre.

Chez Diplauxis, les organites antérieurs sont très allongés et en nombre assez important (5 à 6). Ils viennent s'aboucher sur la membrane externe.

A côté de ces organites déjà différenciés, se trouvent de nombreuses vacuoles sphériques ou ovoïdes, probablement précurseurs de futures rhoptries, et que l'on pourrait apparenter aux inclusions appelées "micronèmes" (ou encore sarconèmes - corps denses etc.). L'observation de l'apparition et de l'évolution de ces organites nous amène à penser qu'il pourrait n'exister qu'un seul et même type de corps denses antérieurs. Selon de nombreux auteurs, les rhoptries auraient un rôle sécrétoire ; mais seul le travail de SCHREVEL (1969) démontre une activité phosphatase acide sur des corps rappelant les rhoptries chez des trophozoïtes de Selenidium.

Pour VIVIER (Travaux en cours) et SCHOLTYSECK et MELTZORN (1970) les micronèmes et les rhoptries ne constitueraient qu'un seul type d'inclusion ou au moins un même ensemble fonctionnel, les premiers pouvant élaborer des substances excrétées par les secondes. Seules de fines études cytochimiques pourront résoudre ce problème.

. Inclusions polysaccharidiques

L'existence d'inclusions glucidiques chez les germes infectieux de sporozoaire semble générale (PORCHET HENNERE et VIVIER (1971)) sauf chez Plasmodium. Chez Diplauxis, le paraglycogène provient d'une synthèse dans le sporozoïte individualisé car les grains glucidiques du sporoblaste ne sont pas distribués dans les germes. La différence de taille et de forme est d'ailleurs très nette (Fig. 114 - 115).

Le lieu et le mode de synthèse des nouvelles inclusions polysaccharidiques n'a pu être démontré, mais souvent ces dernières se trouvent dans une zone fortement vacuolisée, à proximité du Golgi. DUBREMETZ (1971) remarque également chez le macrogamète d'Eimeria necatrix un développement très important de l'ergastoplasme peu avant l'apparition des réserves polysaccharidiques. A partir d'observations similaires, SCHOLTYSECK (1964) chez Eimeria perforans émet l'hypothèse d'une origine ergastoplasmique des grains de paraglycogène. Mais aucune certitude n'existe à ce sujet, et PORCHET HENNERE (1967) soupçonne plutôt une origine mitochondriale pour ce corps.

Le système mitochondrial est très réduit chez Diplauxis, mais ceci est peut-être dû au fait que les germes observés n'étaient pas encore adaptés à une vie libre. A la différence des mitochondries des autres Sporozoaires, dont la membrane interne émet de petites ampoules (VIVIER, 1965), il semble y avoir ici des tubules assez longs.

L'ultrastructure du sporozoïte de la Grégarine étudiée dans ce travail, montre que malgré de petites variations de détail (conoïde - organites antérieurs), l'homogénéité des structures rencontrées chez les germes infectieux des sporozoaires est nette. Déjà de nombreux auteurs (SCHOLTYSECK, PIEKARSKY (1965), SHEFFIELD et HAMMOND (1965-1966), ANDREASSEN et BEHNKE (1968), SENAUD (1967), SENAUD et CERNA (1969) avaient envisagé une liaison phylétique entre Coccidies et Toxoplasmes. De plus en plus, actuellement, les recherches viennent confirmer que le groupe des Sporozoaires en son entier possède des liens de parenté étroits.

Fig. K : Représentation schématique du sporozoïte de Diplauxis.

1 et 2 : Sections transversales à deux niveaux différents du sporozoïte.

Rh = rhoptries

L = lipide

me = membrane externe

mi = membranes internes

Er = Ergastoplasme

Pg = paraglycogène

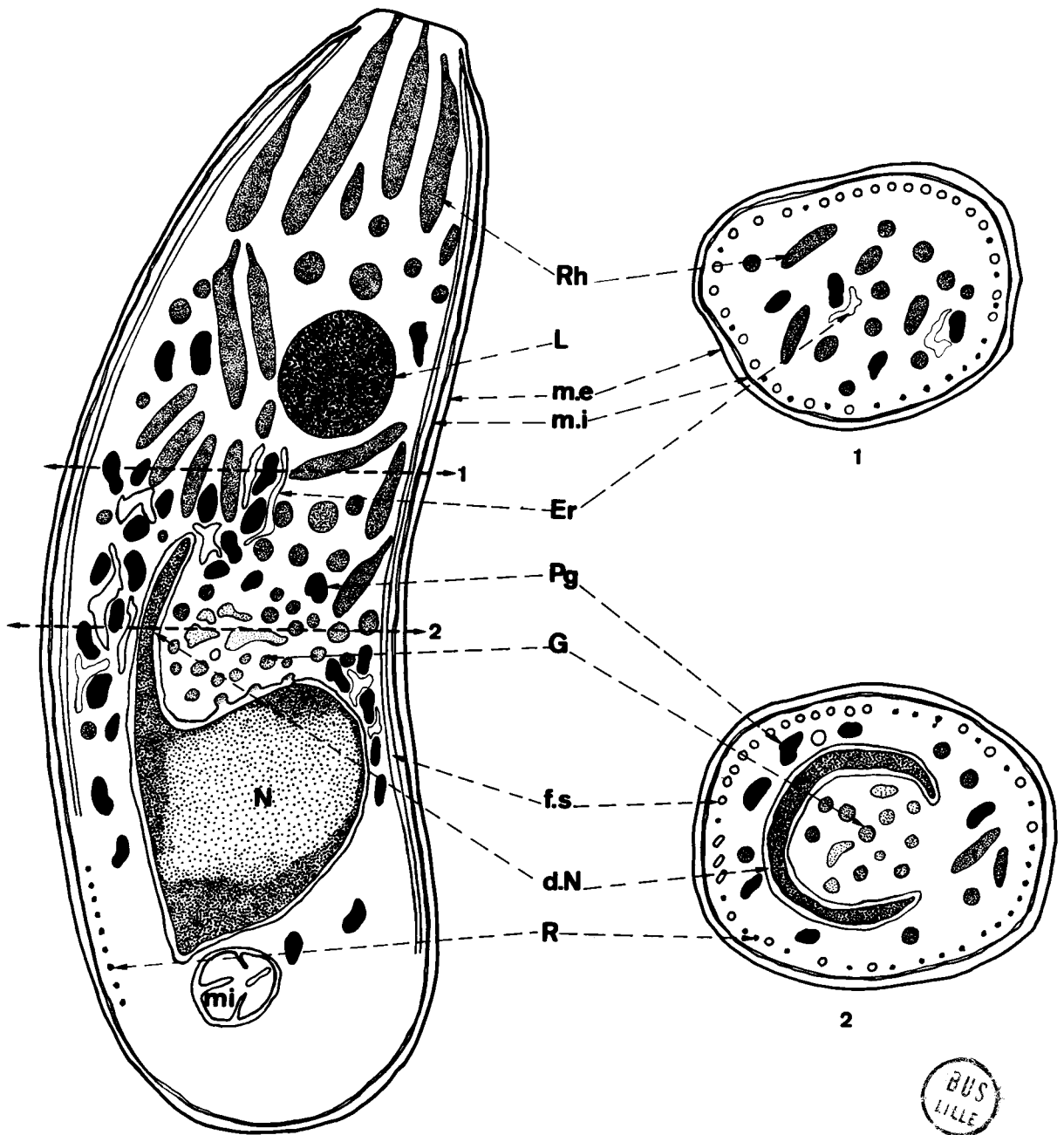
G = Golgi

F. s = fibres sous pelliculaires

d. N = diverticule du noyau

R = ribosomes

mi = mitochondries.



1μ

BUS
LILLE

k

4°) Formation du complexe membranaire des sporozoïtes, évolution de l'appareil de Golgi.

Le sporokyste est limité par une gangue composée de deux couches (Fig. 72). La couche interne, continue présentant de nombreux replis dérive de la paroi du trophozoïte après disparition des microvillosités. On y distingue encore plus ou moins des membranes modifiées. Cette limite est doublée extérieurement par une couche anhyste très épaisse (2 à 3 μ) formée par un matériel fibrillaire dans lequel sont visibles de petites vésicules. Celles-ci proviennent vraisemblablement de la réduction des microvillosités. Le matériel fibrillaire aurait peut-être pour origine les nombreuses inclusions denses décrites au chapitre I.

Le sporoblaste jeune est très riche en ergastoplasme (Fig. 73). Les premiers signes d'individualisation des sporozoïtes sont décelables dès le stade à quatre noyaux. Ils se marquent par la disposition de certaines lames d'ergastoplasme qui après avoir perdu leurs ribosomes s'aplatissent le long de la membrane cytoplasmique du sporoblaste, à environ 200 Å de cette dernière (Fig. 74). Ces lames seront à l'origine du futur complexe membranaire interne du sporozoïte. (PREISIER, 1970b) En coupe transversale, ces lames bimembranaires prennent un aspect particulier à l'emplacement de la zone où va apparaître le fuseau de division. (zone dépourvue d'inclusions décrite plus haut (Chapitre II). Elles sont interrompues au niveau d'un anneau, à l'endroit où vient aboutir le faisceau de microtubules des noyaux en division. (Fig. 73 77).

Cette zone, qui se différencie donc très tôt, sera à l'origine de l'interruption du complexe membranaire interne à la partie antérieure du sporozoïte.

a) L'appareil de Golgi :

Au cours de la 3ème division, de nombreuses structures apparaissent, d'autres se modifient. L'appareil de Golgi subit les transformations les plus spectaculaires. Dans le sporoblaste uninucléé, le Golgi est constitué vraisemblablement par un seul dictyosome. Au cours des divisions qui vont suivre, des dictyosomes néoformés apparaissent toujours à proximité d'un noyau fils (Fig. 89 - 90 - 91). Des lamelles d'ergastoplasme, vers une extrémité, montrent une face dépourvue de ribosomes (Fig. 91). A partir de cette membrane

agranulaire, se forment de petites vésicules atteignant 400 Å environ. Elles sont remplies de la substance diffuse intracisternale qui semble se condenser (Fig. 91, flèche). La soudure de ces vésicules amène la formation d'un dictyosome composé par l'empilement de 4 à 5 saccules qui émettent à la partie apicale de petites vésicules au contenu homogène assez peu dense aux électrons. Ces vésicules de sécrétion restent dans le cytoplasme et leur nombre croît au fur et à mesure de l'individualisation des sporozoïtes.

b) L'individualisation des sporozoïtes :

Plusieurs phénomènes synchrones vont aboutir à la formation des sporozoïtes. Nous allons considérer, au cours de la différenciation l'évolution de plusieurs zones : la partie antérieure, la zone médiane avec ses différents organites, les microtubules sous pelliculaires.

- La partie antérieure :

Au cours de la formation du germe infectieux dans le sporocyste, l'emplacement de la zone antérieure est déterminée très tôt. Dès la fin de "l'anaphase" de la troisième division sporogonique, l'interruption du complexe membranaire interne à la partie antérieure de chaque germe est déterminée par l'aboutissement du fuseau de division. (Fig. 77 - 84 - 91). A ce niveau, des microtubules divergent souvent du fuseau. (fig. 77). C'est alors que la membrane cytoplasmique du sporoblaste forme au niveau des futures membranes internes et au bord de celles-ci, une invagination qui pénètre presque à angle droit dans le cytoplasme. (Fig. 92 - 93). Les deux membranes issues de cette invagination sont régulièrement espacées de 200 Å et entraînent avec elles la pénétration du futur complexe périphérique interne. Des plans de coupe transversaux montrent clairement ce processus (Fig. 100) qui s'effectue également latéralement pour venir englober le noyau et une portion de cytoplasme. A la partie antérieure, l'invagination de la membrane plasmique, qui se fait d'abord perpendiculairement à la paroi, progresse ensuite parallèlement à celle-ci. (Fig. 93 - 94). La région antérieure semble avancer dans ce sens sous l'influence du noyau.

• La Zone médiane ; disposition des organites cytoplasmiques :

En coupe transversale, il est net que les membranes internes évoluent moins vite que la double bande membranaire externe. (Fig. 101). Il est possible que l'accroissement de la couche interne puisse se faire par l'apport de vésicules golgiennes, qui s'aplatissent en venant se souder aux membranes en place (Fig. 95 - 96). Sur la même planche, fig. 96, la relation entre le complexe sous-jacent et l'ergastoplasme est bien évidente. Il faut remarquer l'aplatissement de la lame du réticulum.

A ce stade de l'évolution, les organites cytoplasmiques sont placés dans leur position définitive. Le noyau médian, à chromatine dense périphérique, s'aplatit légèrement face à la paroi (Fig. 93 - 94). Il émet antérieurement un diverticule (Fig. 107). Le dictyosome est toujours placé à l'avant du noyau. (Fig. 106), et il a des relations étroites avec la membrane externe de l'enveloppe nucléaire. Nous avons déjà signalé plus haut la polarité de l'appareil de Golgi, ce qui est bien visible sur ces stades (Fig. 106). Des vésicules se détachent latéralement pour participer sans doute à l'élaboration du complexe interne du futur sporozoïte (Fig. 95 - 96).

Certains organites cytoplasmiques ne sont pas inclus dans le sporozoïte : les grains de paraglycogène, les globules lipidiques. Il semble que les mitochondries, qui sont souvent très allongées, et ramifiées (Fig. 109) ne pénètrent pas telles qu'elles dans le sporozoïte. D'après certaines observations, elles doivent se diviser en petites mitochondries arrondies qui sont incluses dans le sporozoïte au moment où celui-ci est libéré. En ce qui concerne ce problème, nos images ne sont pas assez significatives pour avoir la certitude de l'existence de ce processus.

Au cours de l'individualisation apparaît une grande vacuole, située entre le Golgi et la partie antérieure (Fig. 95 - 103). Cette vacuole devient énorme⁽¹⁾, et dans les sporozoïtes presque mûrs, elle est bien apparente, au contenu granuleux peu dense aux électrons (Fig. 109). Il est possible que cette vésicule soit à l'origine des gros globules lipidiques observés chez les sporozoïtes libres.

Dans le cytoplasme du sporoblaste, on observe occasionnellement des inclusions d'allure paracrystalline. Elles présentent une double striation formant un angle de 60° (Fig. 108).

D'un point de vue disposition spatiale, les sporozoïtes se forment toujours deux par deux. Deux germes, plaqués contre la paroi, s'individualisent bout à bout, avec leurs parties antérieures opposées (Fig. 108 - 109).

Les noyaux sont proches l'un de l'autre. Cette disposition résulte de la place prise par les noyaux au cours de la troisième division sporogonique.

Dans le sporocyste, les germes murs sont limités par leur complexe membranaire complet, le tout étant lui-même englobé dans une sorte de "sac" (Fig. 101 - 102) qui garde de relations avec la membrane cytoplasmique de la cellule mère. (fig. 102). Les sporozoïtes sont au nombre de huit par sporocyste (Fig. 110) et disposés à la périphérie, contre la paroi (Fig. 112). Il subsiste au centre un reliquat cytoplasmique très important où restent : les grains de paraglycogène, les globules lipidiques, des mitochondries. Les sporozoïtes, au moment de la déhiscence de la spore (le mécanisme de son ouverture n'a pas été élucidé) restent rattachés par leur partie postérieure au reliquat cytoplasmique (Fig. 116). Dans ce cas, on note une continuité directe entre la membrane cytoplasmique qui délimite le "résiduum" et la membrane externe du germe.

- Les microtubules sous-pelliculaires :

Ils apparaissent très tôt au cours de la formation des sporozoïtes, dès la fin de la 3^{ème} division sporogonique, au niveau de la terminaison du fuseau. (Fig. 91 - 92). Les microtubules se forment vraisemblablement à partir de cette zone, et courent entre l'enveloppe nucléaire et les futures membranes internes du sporozoïte (Fig. 97 - 98). Le noyau subit un aplatissement très marqué à cet endroit et doit sans doute induire tous les processus qui amèneront la différenciation du sporozoïte.

Il faut remarquer que l'extension latérale des microtubules se fait toujours parallèlement à celle des membranes internes (Fig. 97 - 101). Les microtubules sont fixés à la partie antérieure, sur les membranes internes, légèrement en deçà de leur interruption (Fig. 104). En coupe tangentielle, l'insertion des tubules détermine une zone circulaire dense (fig. 105) sous celle que forme l'interruption du complexe membranaire sous-jacent. Cet aspect fait penser aux anneaux apicaux observés par DESPORTES (1969) chez Stylocephalus.

DISCUSSION

L'étude du mécanisme d'individualisation des sporozoïtes dans le sporoblaste montre beaucoup de faits nouveaux. Les points de comparaisons avec d'autres Grégarines sont inexistant dans le cas de la sporogénèse. DESPORTES (1970) chez Stylocephalus, et VAVRA et McLAUGHLIN (1970) chez Mattesia grandis donnent des images de sporoblastes, mais n'apportent aucun détail sur la formation des sporozoïtes.

Il est très intéressant par contre de confronter nos résultats avec ceux obtenus chez des groupes voisins (Coccidies - Toxoplasmes - Hémosporidies) bien que ces travaux concernent essentiellement la mérogonie et schizogonie, et également la formation des sporozoïtes chez Leuocytozoon (DRESSER et WRIGHT 1966) et Plasmodium (VANDERBERG et coll., 1967). En effet, bien qu'aboutissant à la formation de germes infectieux morphologiquement très semblables, les processus d'individualisation diffèrent notablement. Nous pouvons considérer qu'il existe trois grands types d'individualisation.

a) Chez les Coccidies, les mérozoïtes et schizozoïtes se forment par exogénèse (avec certaines variantes). La membrane externe du germe provient de la membrane plasmique du schizonte. Le complexe membranaire interne, plus ou moins résolu, a une origine assez obscure. PORCHET HENNERE et RICHARD (1971) notent cependant que le complexe bimembranaire interne des schizozoïtes d'Aggregata eberthi dérive vraisemblablement de structures pré-existantes. (peut-être des lamelles d'ergastoplasme!).

Chez Plasmodium, SCALZI et BAHN (1968), certaines des images (fig. 5) pourraient laisser supposer une origine ergastoplasmique des membranes internes.

b) Chez Toxoplasma, limité par une paroi formée de trois membranes, les individus fils se forment dans la cellule mère par endogénèse. VIVIER et PETITPREZ, 1968 et VIVIER (1970) ont nettement montré que les membranes internes du germe en formation proviennent du complexe membranaire sous-jacent de la cellule mère. La membrane externe de l'individu fils se forme à sa sortie, celui-ci étant coiffé par la membrane externe de la cellule mère.

- 30 -

c) Chez les Grégarines, RÜGER (1967 a - b) signale, sous la membrane externe du sporozoïte de Fyxinoïdes balani, la présence d'un complexe "pentalaminaire inhabituel, qui dériverait de cisternes placées sous la paroi du germe. Il est fort probable que dans ce cas les cisternes soient d'origine ergastoplasmique, ce qui expliquerait la présence d'interruptions au niveau de ce complexe pentalaminaire.

Chez Diplauxis, nous pouvons affirmer que les membranes internes sont issues de membranes intracytoplasmiques du sporocyste (ergastoplasme - Golgi). La membrane externe se forme par invagination de la membrane plasmique de la cellule mère.

Ces comparaisons nous amènent à penser que malgré certaines variantes du point de vue de la disposition spatiale, la paroi des germes infectieux des sporozoaires se forme généralement à partir de membranes préexistantes, ou nouvellement formées à partir de membranes en place.

Pour les microtubules sous pelliculaires, il est vraisemblable que leur synthèse s'effectue à partir de la zone antérieure du futur germe. Ils apparaissent dès la résorption du fuseau de division. En se basant sur l'excellente synthèse effectuée par FAURE-FREMIET (1970) sur les "microtubules et mécanismes morphopoiétiques", il est possible de penser que les molécules élémentaires des microtubules se trouvent dans le cytoplasme (au niveau de la zone dépourvue d'inclusions à structure granulaire). Des portions de microtubules pourraient alors jouer le rôle de support pour leur synthèse, aussi bien pour former le fuseau de division que les microtubules sous-pelliculaires.

Formation des membranes du sporozoïte dans le sporoblaste.

Fig. d : i - m - i = interruption des futures membranes internes au niveau de la zone granuleuse (z. g) où va apparaître le fuseau de division.

Fig. e : Le fuseau de division (f. d) se termine au niveau d'une densification (d) entre l'interruption des membranes internes.
La membrane plasmique du sporoblaste (m.p) s'invagine sur le bord des membranes internes.

Fig. f. g. h. : Différents stades de l'évolution du sporozoïte, en coupe longitudinale.

On remarque bien l'invagination (I) de la membrane plasmique (m.p).

mt = microtubules

m. i = membrane interne

L = lipide

E = Ergastoplasme

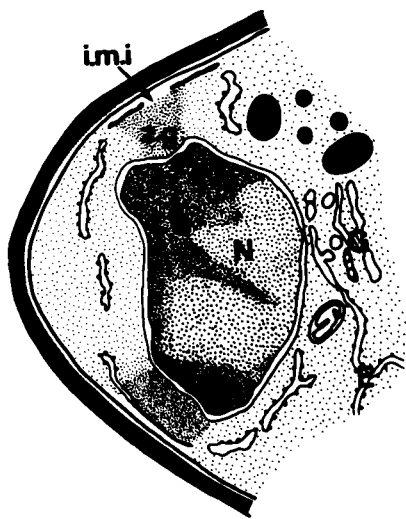
Va = vacuole antérieure

S. d = sphérules denses

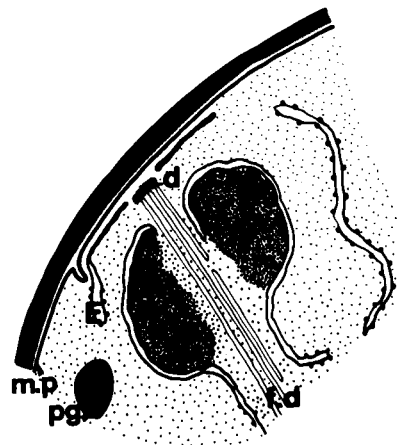
G = Golgi

Fig. i. j : Evolution du complexe membranaire du sporozoïte en coupe transversale. Le sporozoïte mûr est limité par un complexe trimembranaire

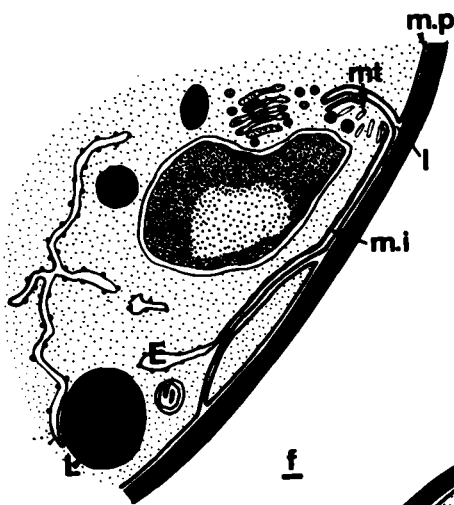
(m. e = membrane externe - m. i = membranes internes), le tout étant englobé dans une sorte de sac (m. s).



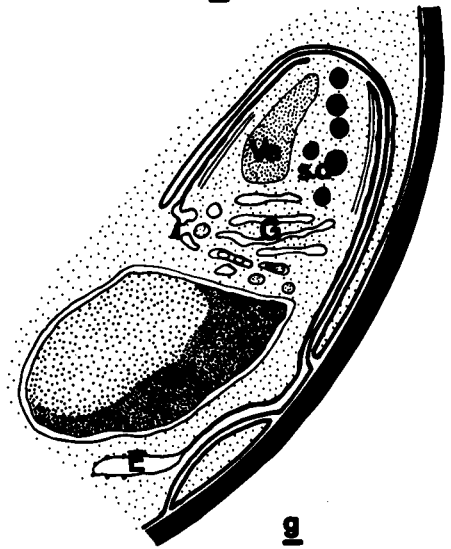
d



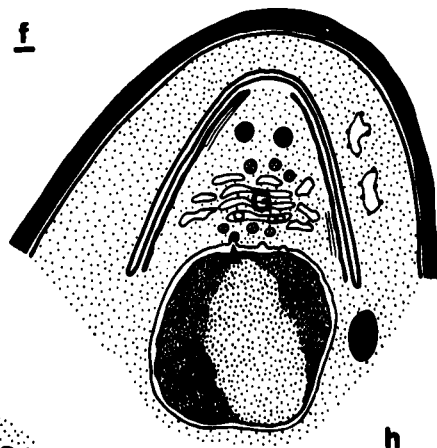
e



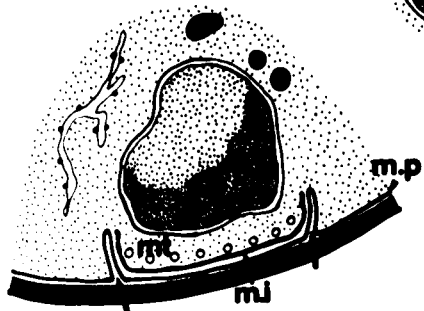
f



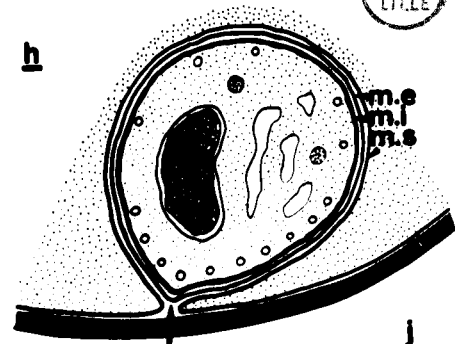
g



h



i



j

1 μ

BUS
LITTLE

IV - LE MÉCANISME D'INFESTATION

L'observation des premiers stades de l'infestation est délicate à réaliser en microscopie électronique. En effet, ils constituent un matériel très rare : l'obtention de larves est limitée à une seule période dans l'année ^{et} l'éloignement de la station de récolte est cause de nombreux déboires. Malgré l'essai d'infestation massive des larves, la petite taille des germes infectieux rend très difficile leur obtention sur les coupes ultra-fines.

Nous avons cependant pu, dans un premier temps, aborder le problème.

Nous avons mis en évidence sur les coupes des aspects différents de cellules qui ressemblent à des sporozoïtes.

a) Des parasites, englobés dans une vacuole, et limités par un complexe trimembranaire ont été observés plus ou moins engagés dans l'épithélium intestinal de la larve (Fig. 124). Ceci prouve que la libération des sporozoïtes a lieu dans la lumière intestinale ; le passage dans l'épithélium ^{colit} se faire rapidement.

b) Sur les mêmes hôtes, des stades intracoelomiques libres sont visibles. Ces cellules sont allongées, et malgré une fixation défectueuse, la paroi triple est bien nette (Fig. 125 - 126)

c) A côté de ces éléments libres, d'autres sont envacuolisés dans des cellules coelomiques de l'hôte (Fig. 127 - 128) qui rappellent assez des cellules sanguines (DHAINAUT, 1969).

Dans tous les cas, des organites rappelant ceux du sporozoïte sont éparés dans le cytoplasme : rhoptries, grains de paraglycogène, globules lipidiques. L'ergastoplasme est très abondant (fig. 126) et sur une micrographie sont apparentes des sections longitudinales de microtubules. (fig. 125).

Les réserves polysaccharidiques prennent parfois une forme particulière en rosette, (fig. 128) un peu analogue à celle du glycogène typique visible dans la cellule hôte (fig. 127). Les formes envacuolisées ne sont vraisemblablement pas encore associées, et il est possible que la syzygie s'effectue au moment de la sortie de la cellule où les germes restent en attente.

DISCUSSION

Malgré le peu de résultats obtenus, nous pouvons cependant entrevoir en partie ce qui se déroule à ce moment du cycle. Les sporozoïtes, libérés dans l'intestin, traversent son épithélium, puis vont se loger dans des cellules coelomiques particulières. Il s'agit vraisemblablement là d'une forme d'attente comme c'est le cas pour les premiers stades de développement de Coelotropha et Myriosporides. (PORCHET HENNERE, 1967 a et b).

Sur des larves plus âgées, des observations que nous n'avons encore pu renouveler ont montré l'existence possible d'une schizogonie. Si elle existe, elle s'effectue sans doute dans les cellules coelomiques de l'hôte, et l'association en couple se ferait après la schizogonie. Des observations plus précises sur les larves de Perinereis nous permettront certainement de solutionner ce problème.

CONCLUSION

Diplauxis était déjà une Grégarine originale par son aspect, par sa syzygie très précoce, par son déterminisme sexuel lié à l'hormone cérébrale de l'hôte. L'ultrastructure accentue encore cette originalité : pas de micropores semble-t-il chez les trophozoïtes, existence d'un polysaccharide de réserve légèrement différent du paraglycogène, et d'une zone d'accolement qui n'est pas une vraie séparation. Originalité encore dans la structure du flagelle des gamètes mâles, qui est exceptionnelle non seulement pour une Grégarine, mais pour tout le règne animal. Originalité toujours dans le mode de division des noyaux du sporocyste ; enfin matériel exceptionnel pour l'étude de la formation des sporozoïtes, qui a été élucidé pour la première fois chez un Sporozoaire. Bref un matériel captivant à propos duquel se posent encore de nombreux problèmes importants.

Tout d'abord, le rôle exact de l'hormone inhibitrice et son effet sur la biologie et la physiologie du parasite se doit d'être précisé par l'utilisation de techniques nouvelles (cytochimie ultrastructurale - Autoradiographie à haute résolution et surtout essai de culture organotypique ou in vitro). Il faut d'ailleurs remarquer ici le parallélisme étroit entre l'évolution ovocytaire de Perinereis et l'évolution de son parasite intra-coelomique. Ceci facilitera certainement le travail ultérieur.

Quelques précisions intéressantes concernant la gamétogenèse et la fécondation doivent pouvoir être apportées.

Un dernier point du cycle, qui a été seulement abordé dans le présent travail, relatif au début de l'évolution du parasite (infestation de l'hôte, présence éventuelle d'une schizogonie, mode et lieu de l'accouplement des jeunes trophozoïtes) mérite d'être approfondi.

Nous espérons que ces recherches pourront apporter, aussi ^{bien} du point de vue de la connaissance du cycle d'un parasite que de la cytologie générale, des résultats très intéressants.

BIBLIOGRAPHIE

- AIKAWA (M.), 1966. - The fine structure of the erythrocytic stages of three avian malarial parasites - Pl. fallax - Pl. lophurae - Pl. cathemerium.
Amer. Journ. of Trop. Med. and Hyg., 15, n° 4, p. 449-471.

- AIKAWA (M.), HEPLER (P. K.), HUFF (C. G.) et SPRINZ (H.), 1966. - The feeding mechanism of avian malarial parasites.
J. Cell Biol., 28, p. 355 - 373.

- AIKAWA (M.), HUFF (C. G.) et SPRINZ (H.), 1967. - Fine structure of the asexual stages of Plasmodium elongatum.
J. Cell Biol., 34, p. 229-249.

- AIKAWA (M.), HUFF (C. G.) et STROME (C. P. A.), 1970. - Morphological study of microgamétogenesis of Leucocytozoon simondi.
Ult. Research., 32, n° 1 - 2, p. 43-68.

- ANDRIASSEN (J.), et BEHNKE (O.), 1968. - Fine structure of merozoites of a rat coccidian Eimeria miyairii, with a comparison of the fine structure of other Sporozoa.
J. Parasitol., 54, n° 1, p. 150-163.

- BARDELE (C. F.), 1966. - Elektronenmikroskopische Untersuchungen an dem Sporozoon Eucoccidium dinophili GRELL.
Z. Zellf., 74, p. 559-595.

- BERNHARD (W.) et GRANBOULAN (N.), 1968. - Electron microscopy of the nucleolus in vertebrate cells.
Ultrastr. in biological systems Dalton A. et Haguenau F. edit. Academic Press N Y, 3, p. 81-149.

- BIANCHI (L.), RONDANELLI (E. G.), CAROSI (G.) et CERNA (G.), 1969. - Endonuclear mitotic spindles in the leptomonad of Leishmania tropica.
J. Parasitol., 55 (5), p. 1091-1092.

- BRADBURY (F. C.) et TRAGER (W.), 1968. - The fine structure of microgametogenesis in Haemoproteus columbae Kruse.
J. Protozool., 15, n. 700 - 712.
- CHARRET (R.), 1969. - L'ADN nucléolaire chez Tetrahymena pyriformis : chronologie de sa replication.
Exp. Cell Res, 54, p. 353-361.
- CORBEL (J. C.), 1965. - Remarques sur l'incorporation de S^{35} par une Grégarine intestinale d'Insecte orthoptère.
C. R. A. S., 261, p. 3669-3671.
- CORBEL (J. C.), 1966. - Contribution à l'étude des Grégarines d'orthoptères
Thèse, Faculté des Sciences, Paris.
- COX (F. E. G.) et VICKERMAN (K.), 1966. - Pinocytosis in Plasmodium vinckei.
Ann. trop. Med. Parasit., 60, 293-296.
- DAY (E. D.), 1968. - Structure and function of the nucleolus in developing cells. Ultrastructure in biological systems. Dalton A et Haguenau Edit. Academic Press. NY. 3, p. 1-79.
- DESPORTES (I.), 1966 a.- L'ultrastructure de la jonction entre le primite et le satellite des associations de Gregarina blattarum Sieb. (Eugrégarine - Gregarinidae).
C. R. A. S., 262, p. 1869-1870.
- DESPORTES (I.), 1966 b.- L'ultrastructure du gamète mâle de l'Eugrégarine "Stylocephalus longicollis" F. St. (Stylocephalidae).
C. R. A. S., 263, p. 517-520.
- DESPORTES (I.), 1967. - Ultrastructure et évolution du sporozoïte de Stylocephalus africanus Theodoridès, Desportes et Jolivet, Eugrégarine Stylocephalidae.
C. R. A. S., 265, p. 423-426.

- DESPORTES (I.), 1969. - Ultrastructure et développement des Grégarines du genre Stylocephalus.
Ann. Sci. Nat. Zool. 12e série, 11, p. 31-96.

- DESPORTES (I.), 1970. - Ultrastructure des Grégarines du genre Stylocephalus. La phase enkystée.
Annales des Sciences Naturelles Zool. et Biol. Animale. 12e série.
Tome XII, fasc. 2, p. 74-169.

- DESPORTES (I.), THEODORIDES (J.), 1969. - Ultrastructure de la Grégarine Callyntrochlamys phronimae (Frenzel) ; étude comparée de son noyau avec celui de Thalicola salpae (Frenzel) (Eugregarina).
J. Protozool., 16 (3), p. 449-460.

- DESSER (S. S.) et WRIGHT (K. A.), 1968. - A preliminary study of the fine structure of the oökinete, oöcyst, and sporozoöite formation of Leucocytozoon simondi Mathis et Leger.
Canadian J. of Zool. V. 46, p. 303-307.

- DEVAUCHELLE (G.), 1968. - Etude de l'ultrastructure de Gregarina polymorpha (Hamm) en Syzygie.
J. Protozool., 15 (4), p. 629-636.

- DHAINAUT (A.), 1969 a. - Etude ultrastructurale des cellules sanguines de Nereis diversicolor O. F. Müller (Annélide polychète).
C. R. A. S., 268, p. 711-712.

- - DHAINAUT (A.), 1969 b. - Etude ultrastructurale et cytochimique de la formation des inclusions intranucléaires dans les ovocytes de l'Annélide N. diversicolor O. F. Müller.
Z. Zellf., 96, p. 75-86.

- DHAINAUT (A.), 1970 a. - Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution ovocytaire de Nereis pelagica L. (Annélide polychète).
I - (Ovogenèse naturelle).
Z. Zellf., 104, p. 375-389.

- DHAINAUT (A.), 1970 b. - Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution ovocytaire de Nereis pelagica L. (Annélide Polychète).
II. - Evolution expérimentale en l'absence d'hormones cérébrales.
Z. Zell., 104, p. 390-404.

- DROLLER (M. J.) et ROTH (T. F.), 1966. - An electron microscope study of yolk formation during oogenesis in Lebistes reticulatus GUPPYI.
J. Cell Biol., vol. 28, p. 209-232.

- DUBREMETZ (J. F.), 1970. Contribution à l'étude cytologique et ultrastructurale d'Eimeria necatrix JOHNSON (1930) (Coccidiomorpha - Eimeriidae) parasite du poulet domestique (Gallus Gallus L.).
D. E. A. Décembre 1970.

- DURCHON (M.) et VIVIER (E.), 1961. - Déterminisme de la gamogonie chez une Grégarine parasite de Ferineris cultrifera Grube (Annélide Polychète).
C. R. A. S., 253, p. 318-320.

- DURCHON (M.) et VIVIER (E.), 1964. - Influence des sécrétions endocrines sur le cycle des Grégarines chez les Néreidiens (Annélides polychètes).
Ann. D'endocrinologie, 253, n° 5 suppl., p. 43-48.

- FAURE-FREMIET (E.), 1970. - Microtubules et mécanismes morphopoiétiques.
Année biologique Fr. 1970., 9, n° 12, p. 1-61.

- FAWCETT (D. W.), 1966. On the occurrence of a fibrous lamina of the inner aspect of nuclear envelope in certain cells of vertebrate.
Ann. J. Anat., 119, p. 129-146.

- FLETCHER (K. A.) et MAEGRAITH (B. G.), 1962. - Intracellular phagotrophy by Plasmodium knowlesi.
Ann. Trop. Med. Parasit., 56, p. 492-495.

- GRANBOULAN (N.) et GRANBOULAN (P.), 1964. - Cytochimie ultrastructurale du nucléole : I - Mise en évidence de chromatine à l'intérieur du nucléole.
Exp. Cell Res., 34, p. 71-87.

- GRANBOULAN (N.) et GRANBOULAN (P.), 1965. - Cytochimie ultrastructurale du nucléole.
II) Etude de sites de synthèse de R N A dans le nucléole et le noyau.
Exp. Cell Res., 38, p.604-619.
- GRASSE (P. P.), 1953 - Traité de Zoologie, Tome I, fasc. II, Masson et Cie Ed.
- GRASSE (P. P.) et THEODORIDES (J.), 1959. - Recherches sur l'ultrastructure de quelques Grégarines.
Ann. Sc. Nat. Zool., 12e série 1, p. 237-252.
- HAMMOND (D. M.), SCHOLTYSECK (E.) et CHOBOTAR (B.), 1969. - Fine structural study of the microgametogenesis of Eimeria auburnensis.
Zeitch. f. Parasitenk., 33, p. 65-84.
- HATT (P.), 1955. - Stades de sporozoaires chez Perinereis cultrifera Grube.
Natur. Monsp., série Zool., fasc. I, p. 28-32.
- HELLER (G.), 1969. - Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Aggregata eberthi aus dem Spiraldarm von Sepia officinalis (Sporozoa - Coccidia).
I - Die Feinstrukturen der Merozoiten, Makrogameten und Sporen.
Z. Parasitenk., 33, p. 44-64.
- HENNERE (E.), 1967. - Etude cytologique des premiers stades du développement d'une Coccidie Myrisporides amphiglenae.
J. Protozool., 14 - 1, p. 27-39.
- HEPLER (P. K.), HUFF (C. G.) et SPRINZ (H.), 1966. - The fine structure of the exoerythrocytic stages of Plasmodium fallax.
J. Cell Biol., 30, p. 333-358.
- HILDEBRAND (H.), 1970. - Contribution à l'étude des mouvements de quelques Grégarines parasites d'Annélides polychètes.
D. E. A., Décembre 1970.

- HOLLANDE (A.), CACHON (J.) et CACHON (M.), 1969. - La dinomitose atractophorienne chez les radiolaires Thalonomphysidae. Son homologu^e avec la mitose des foraminifères et celle des levures.
C. R. A. S., 269, p. 179-182.

- HOLLANDE (A.) et VALENTIN (J.), 1968. - Infrastructure des centromères et déroulement de la pleuromitose chez les hypermastigines.
C. R. A. S., 266, p. 367-370.

- JAMESON (A. P.), 1920. - The chromosome cycle of Gregarines with special reference to Diplocystis schneideri.
Quart. J. Micros. Sci., 64, p. 207-266.

- KARNOUSKY (M. J.), 1961. Simple methods for "staining with lead" at high pH in electron microscopy.
J. Biophys. Biochem. Cyt., 11, p. 729-732.

- MAC GREGOR (M. C.) and THOMASSON (P. A.), 1965. - The fine structure of two Archigregarines, Selenidium fallax and Ditrypanocystis cirratuli.
J. Protozool., 12 (3), p. 438-443.

- MIZUKAMI (I.) et GALL (J.), 1966. - Centriole replication. II - Sperm formation in the fern, Marsilea and the cycad, Zamia.
J. Cell Biol., 29, p. 97-111.

- OGINO (N.) et YONEDA (C.), 1966. - The fine structure and mode of division of Toxoplasma gondii.
Arch. Ophtal., 75, p. 218-227.

- PATRIZI (G.) et POGER (M.), 1967. - The ultrastructure of the nuclear periphery. The Zonula Nucleum Limitans.
J. Ultr. Res., 17, p. 137-157.
- PERKINS (F. O.), 1969. - Electron microscope study of sporulation of the oyster pathogen Minchina costalis. (Sporozoa - Haplosporida).
J. Parasitol., 55, p. 897-920.
- PHILLIPS (D. M.), 1967. - Giant centriole formation in Sciara.
J. Cell Biol., 33p73.
- PITELKA (R.), 1969. - Centriole replication. Reprint from Hand book of Molecular cytology, 44, p. 1200-1218.
- PORCHET-HENNERE (E.), 1967. - Etude des premiers stades de développement de la Coccidie Coelotropha durchoni.
Zeits f. Zell., 80, p. 556-569.
- PORCHET-HENNERE (E.), 1968. Evolution de la paroi du sporoblaste de la Coccidie Coelotropha durchoni étudiée en Microscopie électronique.
C. R. A. S. (Paris) t. 267, p. 1856-1857.
- PORCHET-HENNERE (E.) et RICHARD (A.), 1969. - Structure fine du sporoblaste immature d'Aggregata eberthi Labbe (Sporozoaire Coccidiomorphe).
C. R. A. S., T. 269, p. 1681-1683.
- PORCHET-HENNERE (E.) et RICHARD (A.), 1971. - La Schizogonie chez Aggregata eberthi. Etude en Microscopie Electronique.
Protistologica (sous presse).
- PORCHET HENNERE (E.) et VIVIER (E.), 1971. - Ultrastructure comparée des germes infectieux (sporozoïtes - mérozoïtes - schizozoïtes - endozoïtes etc.) chez les Sporozoaires.
Année Biol., X, 1, 2, p. 77-113.

- PRENSIER (G.), 1969. - Etude in vivo, cytologique et ultrastructurale du cycle de Diplauxis hatti, Grégarine parasite de Perinereis cultrifera Grube. (Annélide polychète).
D. E. A. (1968).

- PRENSIER (G.), 1970 a. - Premières observations ultrastructurales sur la formation des sporozoïtes à partir du sporoblaste chez Diplauxis hatti.
C. R. A. S., t. 270, p. 100-103.

- PRENSIER (G.), 1970 b. Structure de la paroi du sporoblaste et origine du complexe membranaire interne du sporozoïte de Diplauxis hatti. (Grégarine Monocystidée) démontrées par la microscopie électronique.
C. R. A. S., t. 271, p. 2329-2331.

- REGER (J. F.), 1967. - The fine structure of the Gregarine Pyxinoïdes balani Parasitic in the the Barnacle Balanus tintinnabulum.
J. Protozool. (14) (3), p. 488-497.

- REGER (J.F.), BARNETT (A.) et POGER (M. P.), 1967. - Observations on an unusual membrane complex found in Gregarines parasitic in the Barnacle Balanus tintinnabulum.
J. Ult. Res. 18, p. 422-427.

- RENAUD (L. F.) et SWIFT (H.), 1964. - The development of basal bodies and flagella in Allomyces arbusculus.
J. Cell Biol., 23, 2, p. 339-354.

- REYNOLDS (E. S.), 1963. - The use of lead citrate at high PH as an electron opaque stain in electron microscopy.
J. Cell Biol., 17, p. 208-212.

- RUBINOW (C. F.) et MARAK (J.), 1966. - A fiber apparatus in the nucleus of the yeast cell.
J. Cell Biol., 29, p. 129-151.

- RUDZINSKA (M. A.) et TRAGER (W.), 1957. - Intracellular phagotrophy by malaria parasites : an electron microscope study of Plasmodium lophurae.
J. Protozool., 4, p. 190-199.
- RUDZINSKA (M. A.) et TRAGER (W.), 1959. - Phagotrophy and two new structures in the malaria parasite Plasmodium berghei.
J. Biophys. Biochem. Cyt., 6, p. 103-112.
- RUDZINSKA (M. A.), BRAY (R. S.) et TRAGER (W.), 1960. Intracellular phagotrophy in Plasmodium falciparum and Plasmodium gonderi.
J. Protozool., 7 (Suppl.), p. 24-25.
- RUDZINSKA (M. A.) et TRAGER (W.), 1962. - Intracellular phagotrophy in Babesia rodhoni as revealed by electron microscopy.
J. Protozool., 9, p. 279-288.
- RUDZINSKA (M. A.), TRAGER (W.) et BRAY (R. S.), 1965. - Pinocytotic uptake and digestion of Hemoglobin in malaria parasites.
J. Protozool., 12, p. 563-576.
- RYLEY (J. F.), MANNERS (D. J.) et STARK (R. J.), 1968. - Amylopectin, the storage polysaccharide of Eimeria tenella.
J. Protozool., 15, suppl. 31.
- RYLEY (J. F.), BENTLEY (M.), MANNERS (D. J.) et STARK (J. R.), 1969. - Amylopectin, the storage polysaccharide of the coccidia Eimeria brunetti and E. tenella.
J. Parasitol., 55, 4, p. 839-845.
- SCALZI (H. A.) et BAHR (G. F.), 1968. An electron microscopic examination of Erythrocytic stages of two Rodent Malarial parasites, Plasmodium chabaudi and Pl. vinckei. J. Ult. Res., 24, p. 116-133.

- SCHOLTYSECK (E.), 1964. - Elektronenmikroskopische cytochemischer nachweis von glycogen bei Eimeria perforans.
Zeitsch. f. Zell., 64, p. 688-707.
- SCHOLTYSECK (E.) et MEHLHORN (H.), 1970. - Ultrastructural study of characteristic Organelles (Paired organelles, Micronemes, Micropores) of Sporozoa and Related organisms.
Z. Parasit. 34, p. 97-127.
- SCHOLTYSECK (E.), MEHLHORN (H.) et FRIEDHOFF (K.), 1970. - The fine structure of the conoid of Sporozoa and related organisms.
Z. Parasitenk., 34, p. 68-94.
- SCHOLTYSECK (E. O.) et PIEKARSKY (U. G.), 1965. - Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Merozoiten von Eimerien (Eimeria perforans und E. stiedae) und Toxoplasma gondii. Zur systematischen Stellung von T. gondii
Z. Parasitenk., 26, p. 91-115.
- SCHOLTYSECK (E.) et STROUT (R. G.), 1968. - Feinstrukturuntersuchungen über die Nahrung saufnahme bei Coccidien in Gewebekulturen (E. tenella)
Z. f. Parasit., 30, p. 291-300.
- SCHREVEL (J.), 1968 a. - Existence d'un pore d'excrétion chez les schizozoïtes de Sporozoaires.
C. R. A. S., 267, p. 746-748.
- SCHREVEL (J.), 1968 b. - Ultrastructure de la région antérieure de la Grégarine Selenidium et son intérêt pour l'étude de la nutrition chez les sporozoaires.
J. de Microscopie, vol. 7, n° 3, p. 391-410.
- SCHREVEL (J.), 1969 a. - Biologie, Cytologie, Physiologie des Grégarines parasites d'Annélides polychètes.
Thèse Faculté des Sciences - Lille.
- SCHREVEL (J.), 1969 b. - Etude ultrastructurale et cytochimique du paraglycogène, réserve glucidique des sporozoaires.
J. de Microscopie, 8, 83a.

- SCHREVEL (J.), 1970 a. - Etude de cytochimie ultrastructurale sur les polysaccharides des Grégarines.
Deuxième congrès international de Parasitologie, Washington, Sept 1970 (sous presse).
- SCHREVEL (J.), 1970 b. - Recherches ultrastructurales et cytochimiques sur le paraglycogène, réserve glucidique des Grégarines et Coccidies.
J. de Microscopie, vol. 9, n° 5, p. 593-610.
- SCHREVEL (J.), 1971. - Les polysaccharides de réserve chez les sporozoaires.
Année Biol., 10, fasc. 1 - 2, p. 31-51.
- SCHREVEL (J.) et VIVIER (E.), 1965. - Aspects ultrastructuraux et cytochimiques du mucron et de l'épimérite de quelques Grégarines parasites d'Annélides polychètes.
Progress in Protozoology - Second International Conference of Protozoology, p. 147-148.
- SCHREVEL (J.) et VIVIER (E.), 1966. - Etude au microscope électronique de la région antérieure des Grégarines : le mucron de Lecudina pellucida (Koll.) Müngazzini et l'épimérite de Sycia inopinata Leger.
Protistologica, 2, p. 17-28.
- SENAUD (J.), 1966. - L'ultrastructure du micropyle des Toxoplasmasida.
C. R. A. S., 262, p. 119-121.
- SENAUD (J.), 1967. - Contribution à l'étude des sarcosporidies et des toxoplasmes (Toxoplasmea).
Protistologica, 3, p. 170-216.
- SENAUD (J.), 1969. - Sur l'ultrastructure de kystes de Besnoitia jellisoni. Frenkel 1953 (Sporozoa - Toxoplasmea chez la souris) (mus musculus),
C. R. A. S., 268, p. 816-819.
- SENAUD (J.) et CERNA (Z.), 1969. - Etude ultrastructurale des mérozoïtes et de la schizogonie des coccidies (Eimeriina) : Eimeria magna (Ferard 1925) de l'intestin des lapins et E. tenella (Railliet et Lucet 1891) des coecums de poulets.
J. Protozool., 16, p. 155-65.
- SENAUD (J.) et PUYTORAC (P.) de, 1962. - Observations complémentaires sur l'ultrastructure de la "spore" de Sarcocystis tenella Rail (Sarcosporidie du mouton).
C. R. Soc. Biol., 141, p. 1360-1363.

- SHEFFIELD (H. G.), 1966. - Electron microscope study of the proliferative form of Besnoitia jellisoni.
J. Parasitol., 52, p. 583-594.

- SHEFFIELD (H. G.), 1968. - Observations on the fine structure of the Cyst stage of Besnoitia jellisoni.
J. Protozool., 15 (4), p. 685-695.

- SHEFFIELD (H. G.), GARNHAM (P. C. C.) et SHIROISHI (T.), 1971. - The fine structure of the sporozoite of Lankesteria culicis.
J. Protozool., 18 - 1, p. 98-105.

- SHEFFIELD (H. G.) et MELTON (M. L.), 1968 a. - The fine structure and reproduction of Toxoplasma gondii.
J. Parasitol., 54 (2), p. 209-225

- SHEFFIELD (H. G.) et MELTON (M. L.), 1968 b. - The fine structure and reproduction on four species of Sporozoa.
J. Parasitol., 54, p. 695-713.

- SPRAGUE (V.) et VERNICK (S. H.), 1968. - Light and electron microscope study of a new species of Glugea (Microsporida- Nosematidae) in the 4 - spined stickleback Apeltes quadracus.
J. Protozool., 15, p. 547-571.

- STANG VOSS (C.), 1970. - Zur Entstehung des Golgi Apparates Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Spermatiden von Eisenia foetida (Annelidae).
Z. f. Zellf., 109, p. 287-296.

- STEIN (O.) et STEIN (Y.), 1967 a. - Lipid synthesis, intracellular transport, storage and secretion. I) Electron microscopic radioautographic study of liver after injection of tritiated palmitate or glycerol in fasted and ethanol treated rats.
J. Cell Biol., 33, p. 319-340.

- STEIN (O.) et STEIN (Y.), 1967 b. - Lipid synthesis, intracellular transport and secretion. II) Electron microscopic radioautographic study

of the mouse lactating mammary gland.

J. Cell Biol., 34, p. 251-263.

- STEIN (O) et STEIN (Y.), 1968. - Lipid synthesis, intracellular transport and storage. III) Electron microscopic radioautographic study of the rat heart perfused with tritiated oleic acid.
J. Cell Biol., 36, p. 63-77.

- STELLY (N.), STEVENS (B. J.) et ANDRE (J.), 1970. - Etude cytochimique de la lamelle dense de l'enveloppe nucléaire.
J. Microscopie, V. 9, n° 8, p. 1015-1028.

- TERZAKIS (J.A.), SPRINZ (H.) et WARD (R. A.), 1967. - Transformation of the Plasmodium gallinaceum oocysts in Aedes aegypti mosquitoes.
J. Cell Biol., 34, p. 311-326.

- TERZAKIS (J. A.), 1968. - Uranyl acetate, a stain and a fixative.
J. Ultrastruct., Res, U. S. A., 22, n°^S 1, 2, p168-184.

- THIERY (J. P.), 1967. - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en Microscopie électronique.
J. Microscopie, 6, 7, p. 987-1018.

- TOSHIO NAGANO (M. D.), 1963. - Fine structural changes in the flagellum of the spermatid in experimental cryptorchidism of the rat.
J. Cell Biol., vol 18, p. 337-344.

- TROTTER (N. L.), 1961. - Electron opaque bodies and fat droplets in mouse liver after fasting : a glucose injection.
J. Cell Biol., 34, p. 703-711.

- VANDERBERG (J.), RHODIN (J.) et YOELI (M.), 1967. - Electron microscopic and histochemical studies of sporozoites formation in Plasmodium berghei.
J. Protozool., 14, 1, p. 82-103.

- VAVRA (J.) et MC LAUGHLIN (R. E.), 1970. - The fine structure of some developmental stages of Mattesia grandis Mc Laughlin (Sporozoa - Neogregarinida), a parasite of the boll weevil (Anthonomus grandis Boheman).
J. Protozool., 17, 3, p. 483.

- VINCKIER (D.), BEVAUCHELLE (G.) et PRENSIER (G.), 1971. - Etude ultrastructurale du développement de la Microsporidie Nosema vivieri V. D. P. (Sporogonie).
Protistologica. Sous presse.

- VINCKIER (D.) et VIVIER (E.), 1968. - Organisation ultrastructurale corticale de la Grégarine Microcystis herculea.
C. R. A. S., 266, p. 1737-9.

- VIVIER (E.), 1961. - Principaux stades évolutifs coelomiques d'une Grégarine parasite du Polychète Perinereis cultrifera Grube.
C. R. Soc. biol., 155, p. 1946-1949.

- VIVIER (E.), 1965. - Sur quelques particularités de certains organites cytoplasmiques (Mitochondries et appareil de Golgi).
Coll. Micr. elect. Marseille.
J. Microscopie, 4 (2), p. 168-169.

- VIVIER (E.), 1967. - Observations ultrastructurales sur l'enveloppe nucléaire et ses "pores" chez les sporozoaires.
J. de Microscopie, vol. 6, n° 3, p. 371-390.

- VIVIER (E.), 1968. - L'organisation ultrastructurale corticale de la Grégarine Levinsina pellucida, ses rapports avec l'alimentation et la locomotion.
J. Protozool. U. S. A., vol. 5, n° 2, p. 230-246.

- VIVIER (E.), 1969. - L'ultrastructure des formes végétatives des sporozoaires. Progress in Protozoology, 3rd Internat. Congress of Protozool. Leningrad., p. 47-49.

- VIVIER (E.), 1970 a. - Les relations micropores- vacuoles alimentaires chez l'Hématozoaire Anthemiosoma garnhami, étude en microscopie électronique avec reconstitution tridimensionnelle.
IXe réunion annuelle des Protistologues de langue française.

- VIVIER (E.), 1970 b. - Observations nouvelles sur la reproduction asexuée de Toxoplasma gondii et considérations sur la notion d'endogenèse.
C. R. A. S., t. 271, p. 2123-2126.

- VIVIER (E.), DEVAUCHELLE (G.), PETITPREZ (A.), PORCHET (HENNERE (E.), PRENSIER (G.), SCHREVEL (J.) et VINCKIER (D.), 1970a. - Observations de cytologie comparée chez les sporozoaires. I - Les structures superficielles chez les formes végétatives.
Protistologica, t. VI, fasc. 1, p. 127-150.

- VIVIER (E.), HENNERE (E.) et SCHREVEL (J.), 1965. - Etude de quelques caractères ultrastructuraux communs à diverses Grégarines et Coddies.
2nd Int. Conf. Protozool. London, Research in Protozoology. Excerpta Medica. Intern. Congr. série n° 91, p. 151-152.

- VIVIER (E.), LEGRAND (B.) et PETITPREZ (A.), 1969a. - Recherches cytochimiques et ultrastructurales sur des inclusions polysaccharidiques et calciques du Spirostome. Leurs relations avec la contractilité.
Protistologica V, f. 1, p. 145-159.

- VIVIER (E.), ORMIERES (R.) et TUZET (O.), 1964a. - Observations sur le cycle et affinités des Grégarines parasites du polychète Perinereis cultrifera Grube.
Arch. de Zool. exp. et gén., t. 103, Notes et revues n° 1, p. 20-29.

- VIVIER (E.), PETITPREZ (A.), 1968 a. - Les ultrastructures superficielles et leur évolution au niveau de la jonction chez les couples de Diplauxis hattii parasite de Perinereis cultrifera.
C. R. A. S., 266, p. 491-493.

- VIVIER (E.) et PETITPREZ (A.), 1968 b. - Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus fils chez Toxoplasma gondii.
J. Cell Biol., vol. 43, n° 2, p. 329-342.

- VIVIER (E.) et PETITPREZ (A.), 1969 b. - Observations ultrastructurales sur l'Hématozoaire Anthemiosoma garnhami et examen de critères morphologiques utilisables pour la taxonomie chez les Sporozoaires.
Protistologica, 1969, t. V, fasc. 3.

- VIVIER (E.) et PETITPREZ (A.), 1970 b. - Etude par la technique des coupes sériées du système vacuolaire chez un Hématozoaire Anthemiosoma garnhami.
7ème Congrès international de Microscopie électronique, Grenoble
p. 413-414.

- VIVIER (E.), PETITPREZ (A.) et LEGRAND (B.), 1969 c. - Etude cytochimique des polysaccharides du Spirostome et importance physiologique de leur localisation.
J. de Microscopie (abstract) 8, n° 4, p. 91 a.

- VIVIER (E.), PETITPREZ (A.) et PRENSIER (G.), 1969 d. - Recherches sur les polysaccharides et les lipides chez la Grégarine Diplauxis hatti ; observations en microscopie électronique.
C. R. A. S., t. 268, p. 1197-1199.

- VIVIER (E.) et SCHREVEL (J.), 1964 b. - Etude au microscope électronique, d'une Grégarine du genre Selenidium parasite de Sabellaria alveolata.
J. de Microscopie, vol. 3, n° 6, p. 651-670.

- VIVIER (E.) et SCHREVEL (J.), 1966. - Les ultrastructures cytoplasmiques de Selenidium hollandei, n. sp., Grégarine parasite de Sabellaria alveolata L.
J. de Microscopie, 5, p. 213-228.

- VIVIER (E.), SCHREVEL (J.) et HENNERE (E.), 1964. - L'ultrastructure de la paroi de quelques Sporozoaires, ses rapports avec certains organites cytoplasmiques, son rôle possible dans la nutrition.
Proceedings of the 1st Int. Congress of Parasitology - Tamburini Editore Milano, p. 290-291.

- VOLKMANN (B.), 1967. - Vergleichend Elektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Untersuchungen an verschiedenen Entwicklungsstadien von haossia helicina (Coccidia, Adeleidea).
Z. f. Parasit., 29, p. 159-208.

- WARNER (F. D.), 1968. - The fine structure of Rhynchocystis pilosa. (Sporozoa - Eugregarinidae).
J. Protozool., 15, p. 59 - 73.

- WESCHENFELDER (R.), 1938. - Die Entwicklung von Actinocephalus parvus Wellmer. - Arch. für Protist., T. 91, p. 2-60.

