

50376  
1979  
154-1

N° d'ordre 453

50376  
1979  
154-1

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

# T H E S E

présentée à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I  
pour l'obtention du grade de

Docteur ès Sciences Naturelles

par

Jean MALECHA

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA BIOLOGIE  
DE L'HIRUDINÉE RHYNCHOBDELLE

*Piscicola Geometra* L.



Présentée le 28 Juin 1979 devant la commission d'examen

**JURY :** Président, Directeur du Travail et Rapporteur :  
M. M. DURCHON, *Professeur*,  
Rapporteurs : Madame H. HERLANT-MBEWIS, *Professeur*,  
M. A. DHAINAUT, *Maitre de Conférences*  
Examineurs : M. R. JOLY, *Professeur*,  
M. J.-C. WISSOCQ, *Maitre de Conférences*

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit  
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique

M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. RACZY Ladislav	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés d'Enseignement)

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
M. COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUBRULLE Alain	Physique
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. JACOB Gérard	Informatique
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie
M. RIETSCH François	Chimie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SOMME Jean	Géographie

Mlle SPIK Geneviève  
M. STERBOUL François  
M. TAILLIEZ Roger  
M. TOULOTTE Jean-Marc  
M. TREANTON Jean-René  
M. VANDORPE Bernard  
M. WALLART Francis  
Mme ZINN-JUSTIN Nicole

Biochimie  
Informatique  
Biologie  
Automatique  
Sociologie  
Chimie Minérale  
Chimie  
Algèbre

# SOMMAIRE

INTRODUCTION	p. 1
I - MATÉRIEL ET TECHNIQUES	p. 3
A - MATERIEL	p. 3
B - TECHNIQUES	p. 3
1 - Elevage de <i>P. geometra</i>	p. 3
2 - Etude histologique	p. 4
a - Microscopie photonique	p. 4
b - Microscopie électronique	p. 4
$\alpha$ - à transmission	p. 4
$\beta$ - à balayage	p. 5
II - ETUDE DU CYCLE BIOLOGIQUE ET DE LA CROISSANCE DE <u>P. GEOMETRA</u>	p. 6
A - DEFINITION ET DISCUSSION DES PARAMETRES DE CROISSANCE	p. 6
1 - Masse	p. 6
2 - Taille	p. 7
3 - Relation longueur/masse	p. 8
B - ETUDE DU CYCLE BIOLOGIQUE DE <i>P. GEOMETRA</i>	p. 9
1 - Lieu de récolte	p. 9
2 - Ecologie de <i>P. geometra</i>	p. 10
a - Qualité de l'eau	p. 10
b - pH	p. 10
c - Conductivité de l'eau	p. 10
d - Vitesse du courant	p. 10
e - oxygénation de l'eau	p. 11
f - Température	p. 12
g - Caractéristiques de la station	p. 13
g - Nourriture	p. 13

3 - Méthode de prélèvement	p. 14
4 - Histogrammes des masses des <i>P. geometra</i> récoltées au cours de l'année 1970-1971	p. 15
5 - Histogrammes des masses des <i>P. geometra</i> récoltées d'octobre à décembre 1971	p. 15
6 - Durée de la période de reproduction	p. 16
7 - Epoque d'apparition de la maturité sexuelle	p. 17
8 - Durée du développement embryonnaire	p. 17
9 - Longévité	p. 18
10 - Cycle biologique de <i>P. geometra</i>	p. 18
11 - Comparaison du cycle biologique de <i>P. geometra</i> avec celui des autres espèces d'Hirudinées	p. 19
C - ETUDE DE LA CROISSANCE DE <i>P. GEOMETRA</i>	p. 20
1 - Conditions expérimentales	p. 20
2 - Etude expérimentale de l'influence de la lumière	p. 20
a - Résultats	p. 20
b - Discussion	p. 21
3 - Etude expérimentale de l'influence de la température	p. 22
a - Résultats	p. 22
b - Discussion	p. 22
4 - Etude expérimentale de l'influence de la maturation sexuelle	p. 23
5 - Etude expérimentale de l'influence de la nutrition	p. 25
6 - Analyse mathématique de la croissance	p. 27
a - Méthode d'étude	p. 27
b - Résultats	p. 28
7 - Conclusions	p. 30

III - ÉTUDE HISTOLOGIQUE DE LA MATURATION GÉNITALE	p. 32
A - ANATOMIE DE L'APPAREIL GENITAL DE <i>P. GEOMETRA</i>	p. 32
B - LA FONCTION FEMELLE	p. 32
1 - L'ovogenèse	p. 32
a - Résultats	p. 32
$\alpha$ - Evolution cytologique de l'ovocyte	p. 34
$\beta$ - Evolution des cellules nourricières	p. 35
$\gamma$ - Evolution des cellules folliculaires	p. 37
b - Discussion	p. 37
2 - Les glandes clitelliennes	p. 42
a - Différents types de glandes	p. 42
b - Répartition des orifices excréteurs des différents types de glandes au niveau du clitellum	p. 44
c - Formation du cocon	p. 44
d - Le cocon	p. 45
e - Discussion	p. 47
$\alpha$ - Rôle des différents types cellulaires	p. 47
$\beta$ - Evolution du cocon après le retrait de la sangsue	p. 50
$\gamma$ - Comparaison entre la ponte de <i>P. geo-</i> <i>metra</i> et celles des autres Hirudinées	p. 52
3 - L'aire copulatrice	p. 53
a - Etude de l'épiderme normal	p. 54
$\alpha$ - Les cellules épithéliales	p. 54
$\beta$ - Les cellules glandulaires	p. 55
$\gamma$ - Les cellules ciliées	p. 55
b - Etude de l'épiderme de l'aire copulatrice	p. 55
c - Discussion	p. 56
4 - Le tissu vecteur	p. 58
a - Les grandes cellules du tissu vecteur	p. 59
b - Les petites cellules du tissu vecteur	p. 60
c - Discussion	p. 60
5 - Conclusion	p. 62

C - LA FONCTION MÂLE	p. 63
1 - Les testicules	p. 63
a - La paroi testiculaire	p. 63
b - Les premiers stades de la spermatogenèse	p. 64
$\alpha$ - Les spermatogonies	p. 64
$\beta$ - Les spermatocytes I	p. 65
$\gamma$ - Les spermatocytes II	p. 66
c - La spermiogenèse	p. 66
$\alpha$ - Résultats	p. 66
$\beta$ - Discussion	p. 72
d - Etude comparative des spermatozoïdes d'Hirudinées	p. 77
$\alpha$ - Résultats	p. 77
$\beta$ - Discussion	p. 81
e - Le cytophore	p. 90
$\alpha$ - Résultats	p. 90
$\beta$ - Discussion	p. 91
2 - L'atrium génital mâle	p. 91
3 - Conclusion	p. 92
 IV - ÉVOLUTION DES CARACTÈRES SEXUELS AU COURS DE LA CROISSANCE ET DU CYCLE ANNUEL CHEZ <u>P. GEOMETRA</u>	 p. 95
A - DEFINITION DES STADES EVOLUTIFS DES CARACTERES SEXUELS	 p. 95
1 - Les ovaires	p. 95
2 - Les glandes clitelliennes	p. 95
3 - Les testicules	p. 96
B - EVOLUTION DES CARACTERES SEXUELS AU COURS DE LA CROISSANCE	 p. 96
1 - Résultats	p. 97
2 - Discussion	p. 97
C - EVOLUTION DES CARACTERES SEXUELS AU COURS DU CYCLE ANNUEL	 p. 98

1 - Résultats	p. 98
a - Les ovaires	p. 98
b - Les glandes clitelliennes	p. 99
c - La fonction mâle	p. 99
2 - Discussion	p. 100
D - CONCLUSION	p. 102
V - INFLUENCE DES FACTEURS EXTERNES SUR L'ACTIVITÉ REPRODUCTRICE DE <u>P. GEOMETRA</u>	p. 103
A - INFLUENCE DE LA LUMIERE	p. 103
1 - Résultats	p. 103
2 - Discussion	p. 104
B - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE	p. 106
1 - Résultats	p. 106
2 - Discussion	p. 107
C - INFLUENCE DE LA NUTRITION	p. 109
1 - Influence de la nutrition sur la ponte	p. 109
a - Conditions expérimentales	p. 109
b - Résultats	p. 110
2 - Influence du jeûne sur les caractères sexuels	p. 110
a - Conditions expérimentales	p. 110
b - Résultats	p. 110
3 - Discussion	p. 111
D - CONCLUSION	p. 112
VI - INFLUENCE DES FACTEURS INTERNES SUR LA MATURATION SEXUELLE DE <u>P. GEOMETRA</u>	p. 113
A - RESULTATS DES RECHERCHES CHEZ LES AUTRES HIRUDINEES	p. 113
1 - Rôle du cerveau chez <i>T. rude</i>	p. 113
2 - Rôle du cerveau chez <i>H. medicinalis</i>	p. 114

3 - Rôle des ganglions buccaux chez <i>E. octoculata</i>	p. 116
4 - Rôle du cerveau chez <i>T. tessulatum</i>	p. 116
5 - Origine de l'hormone cérébrale	p. 117
<b>B - RECHERCHES PERSONNELLES CHEZ <i>P. GEOMETRA</i></b>	<b>p. 118</b>
1 - Ovariectomie	p. 118
a - Mode opératoire	p. 118
b - Ovariectomies pratiquées sur des sangsues dont les glandes clitelliennes sont au stade 3	p. 118
c - Ovariectomies pratiquées sur des sangsues dont les glandes clitelliennes sont au stade 2	p. 121
d - Ovariectomies pratiquées sur des sangsues dont les glandes clitelliennes sont au stade 1	p. 121
e - Conclusion	p. 121
2 - Ablation de l'atrium génital mâle	p. 122
a - Conditions expérimentales	p. 122
b - Résultats	p. 122
c - Conclusion	p. 123
3 - Rôle du cerveau	p. 123
a - Expériences d'ablation des ganglions cérébroïdes	p. 123
$\alpha$ - Mode opératoire	p. 123
$\beta$ - Ablation des ganglions cérébroïdes de <i>P. geometra</i> à maturité sexuelle	p. 123
$\gamma$ - Ablation des ganglions cérébroïdes de <i>P. geometra</i> en période de repos reproducteur hivernal	p. 125
$\delta$ - Greffes de parties antérieures de <i>P.</i> <i>geometra</i> sur des sangsues en repos reproducteur hivernal et décérébrées	p. 125
b - Expériences d'ablation des cellules fuchsino-philes des ganglions cérébroïdes	p. 126
$\alpha$ - Caractéristiques de ces cellules	p. 126
$\beta$ - Mode opératoire	p. 126
$\gamma$ - Résultats	p. 127

c - Discussion	p. 127
d - Conclusion	p. 130
CONCLUSION GÉNÉRALE	p. 131
1 - ETUDE DE LA CROISSANCE	p. 131
2 - ETUDE HISTOLOGIQUE DE LA MATURATION SEXUELLE	p. 132
3 - L'ACTIVITE REPRODUCTRICE ET SON CONTRÔLE	p. 136
BIBLIOGRAPHIE	p. 140

## AVANT - PROPOS

Je suis profondément reconnaissant à Monsieur le Professeur DURCHON de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir proposé un sujet de recherches relatif aux Hirudinées. C'est grâce à l'ambiance stimulante de recherche et aux conditions de travail particulièrement favorables qu'il a créées au Laboratoire de Biologie Animale que cette thèse a pu être menée à bien. Qu'il veuille trouver ici l'expression de mon profond attachement et de ma sincère gratitude.

Madame HERLANT-MEEWIS, Professeur à l'Université Libre de Bruxelles, m'a fait le grand honneur de s'intéresser à mes recherches. Elle a accepté de juger ce travail et de participer à mon Jury de thèse. Je la prie d'accepter le témoignage de ma profonde et très vive gratitude.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur DHAINAUT pour la bienveillance qu'il m'a toujours témoignée et pour ses conseils amicaux. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Monsieur le Professeur JOLY de l'Université d'Amiens de s'intéresser à ce travail et de participer à mon Jury de thèse. Je l'en remercie vivement.

Il m'est agréable de remercier Monsieur le Professeur WISSOCQ, de l'Université de Rouen, tant pour sa participation à ce Jury que pour l'intérêt qu'il a porté à mes recherches.

Mes plus vifs remerciements vont également à Monsieur le Professeur RICHARD qui a apporté des critiques enrichissantes au deuxième chapitre de ce mémoire.

Enfin, je ne peux oublier mes amis du Laboratoire de Biologie Animale qui m'ont apporté une aide particulièrement efficace dans la préparation matérielle de ce travail. Monsieur MONTAGNE s'est occupé de l'entretien des élevages et des techniques de microscopie, Madame BONET a assuré la dactylographie de ce mémoire et a participé à son tirage et assemblage avec Mesdames HIMPENS, LEU et SLOMIANNY, Monsieur HIMPENS a réalisé la plupart des dessins, Monsieur PONCHEL m'a aidé pour les observations au microscope électronique à balayage, Madame AUGER et Monsieur LAZARECKI se sont chargés des reproductions photographiques. Je tiens à leur exprimer mon amicale reconnaissance.

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

Un travail entrepris sur *Hirudo medicinalis* L. (MALECHA, 1968) nous avait permis d'aborder l'étude expérimentale de l'influence des facteurs externes et internes sur la maturation génitale de cette espèce. C'est dans cette voie que nous avons poursuivi nos recherches en nous intéressant à l'une des plus importantes familles d'Hirudinées, celle des *Piscicolidae* (30 % des genres et 25 % des espèces).

Nous avons choisi une espèce d'eau douce, *Piscicola geometra* L. en raison de sa présence dans la région lilloise et des possibilités d'élevage.

L'interprétation de nos résultats expérimentaux nécessitait à la fois une meilleure connaissance du cycle biologique de cette sangsue et des bases histologiques solides.

. Le premier de ces objectifs a été atteint grâce aux élevages et aux relevés effectués régulièrement sur le terrain. C'est au cours de ces derniers que nous nous sommes attaché à dégager les exigences écologiques de cette espèce. L'existence de variations très importantes de la croissance au cours du cycle annuel nous a amené à étudier l'influence des facteurs externes et internes susceptibles d'intervenir.

. Le second nous a conduit, dans un souci de meilleure compréhension de nos observations, à aborder l'étude cytologique d'organes reproducteurs appartenant à d'autres Hirudinées : nous avons étudié l'ovogenèse et la spermatogenèse à la fois chez *P. geometra* et une autre *Piscicolidae* marine, *Branchellion torpedinis* (Sav.), et comparé les spermatozoïdes de

ces deux sangsues à ceux de neuf espèces appartenant à trois autres familles de la faune régionale. Chez *P. geometra*, l'étude des autres caractères sexuels : aire copulatrice, tissu vecteur, glandes clitelliennes, nous a amené à préciser leurs rôles. C'est ainsi qu'ont été suivies les principales étapes de l'élaboration du cocon et établie la part revenant aux différentes sécrétions clitelliennes dans cette formation.

Dans la dernière partie de ce travail nous envisagerons l'évolution des caractères sexuels au cours du cycle annuel et de la croissance, puis l'étude de l'action des facteurs externes sur la maturation génitale et les corrélations hormonales susceptibles d'intervenir dans le contrôle de la fonction reproductrice.

## I - MATÉRIEL ET TECHNIQUES

### A - MATERIEL

Une partie importante du travail présenté concerne *Piscicola geometra*. Cette espèce est récoltée près de Lille, à Verlinghem, ou provient de notre élevage.

*Hirudo medicinalis* L. est achetée aux Etablissements RICARD-DEBEST-BECHADE à AUDENGE dans la Gironde.

*Branchellion torpedinis* (Sav.) provient de la région d'Arcachon\*.

*Theromyzon tessulatum* (O.F.M.) est prélevée dans la réserve du Marais d'Harchies en Belgique\*\*.

Les autres sangsues : *Haemopsis sanguisuga* (L.), *Erpobdella octoculata* (L.), *E. testacea* (L.), *Glossiphonia complanata* (L.), *G. heteroclita* (L.), *Helobdella stagnalis* (L.), proviennent de diverses mares de la région lilloise où elles sont généralement abondantes, à l'exception de *Hemiclepsis marginata* (O.F.M.) qui est relativement rare, mais par contre bien représentée dans la retenue d'eau d'Eppes-Sauvage.

### B - TECHNIQUES

#### 1 - ELEVAGE DE P. GEOMETRA

Comme ces sangsues sont très sensibles à la qualité de l'eau, celle-ci provient toujours de l'étang de Verlinghem. Elles sont placées dans des aquariums en verre d'une contenance de 5 litres et nourries généralement sur carassins, plus rarement sur gardons. Le seul problème qui se pose est d'empêcher les poissons de dévorer les sangsues. On y parvient aisément en les reliant à un flotteur en liège par l'intermédiaire d'un fil souple passé dans une narine. Cette méthode utilisée par BRUMPT pour l'élevage de *H. marginata*, espèce transmettant *Trypanosoma granulorum* à l'anguille,

---

\* Nous tenons à remercier très vivement M. CAZAUX, sous-directeur de la Station Biologique d'Arcachon pour l'envoi de nombreux exemplaires de cette espèce.

\*\* Ces prélèvements ont été effectués avec l'autorisation de M. KESTELOOT, Chef de la section Ecologie et Conservation de la Nature de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique ; qu'il en soit ici remercié.

est préconisée par LANGERON (1949, p. 830-833). Nous avons également testé la méthode employée par TEREKHOV (1966) qui consiste à immerger le poisson dans une petite cage. Cette technique s'est révélée beaucoup moins commode que la précédente.

## 2 - ETUDE HISTOLOGIQUE

### a - Microscopie photonique

Les sangsues sont fixées (*in toto* pour les petites espèces comme *P. geometra*) au Bouin Hollande sans acide acétique, au Carnoy ou au Maximov. Par suite de la présence fréquente de sang dans le tube digestif, rendant le matériel très difficile à couper, les pièces sont éclaircies au benzoate de méthyle additionné d'1 % de celloïdine (2 fois 12 heures), puis passées dans du benzène (2 fois 20 mn) avant d'être imprégnées (2 fois 12 h) par un mélange de tissumat (3/4) et de paraplast (1/4). Les colorations, citées dans le texte, sont pratiquées selon les modes opératoires préconisés par GABE (1968). Nous avons également utilisé la fuchsine paraldéhyde avec coloration de fond de HALMI (1952) variante de R.B. CLARK (1955).

### b - Microscopie électronique

#### α - A transmission

\* Pour les coupes ultra-fines, les pièces sont fixées par le glutaraldéhyde à 3,5 % dans un tampon phosphate 0,4 M pendant 3 h à 4°C, puis postfixées par le tétroxyde d'osmium à 2 % dans le tampon phosphate 0,2 M. Elles sont incluses dans l'araldite.

Les coupes sont contrastées par passage dans l'acétate d'uranyle à 1 % dans une solution alcoolique à 50 % pendant 4 mn, puis dans le citrate de plomb selon REYNOLDS (1963) pendant 6 mn.

Les examens sont pratiqués au microscope électronique HITACHI HU 11 E.

La recherche des polysaccharides est effectuée par la technique à l'acide périodique - thiocarbohydrazide - protéinate d'argent (THIERY, 1967).

\* La technique de coloration négative a été utilisée pour l'étude morphologique des spermatozoïdes. Nous avons suivi le protocole mis au point par HUXLEY et ZUBAY (1960). Les grilles sont recouvertes par un film de parlodion ou de formvar. Les vésicules séminales ou les testicules sont dilacérés dans une solution de KCl 0,1 M. Une goutte de la suspension obtenue est déposée sur une grille et le liquide est absorbé à l'aide d'un petit morceau de papier filtre. Avant séchage, une goutte d'acétate

d'uranyle à 1 % dans l'eau est déposée sur la grille pendant 2 à 4 secondes, puis éliminée en touchant le bord de la préparation avec du papier filtre.

\* La mise en évidence d'une activité phosphatasique acide a été effectuée selon la méthode de MILLER et PALADE (1964). Une durée d'incubation de 30 mn nous a donné des résultats satisfaisants.

\* Le marquage des jonctions cellulaires a été obtenu en additionnant aux fixateurs et au liquide de lavage une solution contenant du lanthane, préparée selon la technique de REVEL et KARNOVSKY (1967).

#### $\beta$ - A balayage

Cette technique a été utilisée pour des études morphologiques et pour l'examen des cocons. Les animaux sont fixés par le glutaraldéhyde à 3,5 % dans le tampon phosphate 0,4 M pendant une heure, puis post-fixés par le fixateur de PARDUCZ (1967) 10 mn à 1 h. Après lavage les pièces sont lyophilisées puis métallisées sous vide par l'or-palladium. Les préparations sont examinées au Stéréoscan MK II a (Cambridge).

## II - ÉTUDE DU CYCLE BIOLOGIQUE ET DE LA CROISSANCE DE *P. GEOMETRA*

L'étude du cycle biologique de *P. geometra* a nécessité des prélèvements réguliers d'échantillons d'une population naturelle dont l'évolution a été suivie en se basant d'une part sur la croissance dont nous allons définir les paramètres, masse et taille, d'autre part sur des données relatives à la reproduction obtenues sur le terrain et grâce aux élevages. La croissance subit d'importantes variations au cours de l'année, ce qui nous a conduit à rechercher les facteurs la contrôlant. En outre, l'abondance anormale de cette espèce dans un étang du Nord de la France nous a incité à définir ses exigences écologiques.

### A - DEFINITION ET DISCUSSION DES PARAMETRES DE CROISSANCE

La croissance, chez les Hirudinées, peut être définie en se référant soit à la masse, soit à la taille (longueur) des animaux.

#### 1 - MASSE

C'est le paramètre le plus couramment utilisé chez les sangsues (MANN, 1953, 1957 a et b, 1961 ; TEREKHOV, 1966, 1967). Les animaux, séchés avec du papier Joseph, sont pesés individuellement sur une balance METTLER ou SARTORIUS "Selecta rapide" sensibles au 1/10 de mg, à l'exception des sangsues à l'éclosion dont la masse se rapproche de la limite de sensibilité de la balance et pour lesquelles la mesure est effectuée sur un ensemble de plusieurs dizaines d'individus. La valeur retenue est, dans ce cas, la moyenne arithmétique.

#### . Validité du paramètre masse

Ce paramètre donne une mesure précise dépendant uniquement de la balance utilisée mais est sujet, pour un même animal, à des variations brutales liées à la quantité de nourriture ingérée. En effet au cours d'un repas la masse de l'animal peut varier en très peu de temps et subir une augmentation qui est en moyenne de 40 % (Fig. 1). L'utilisation de ce paramètre se montre néanmoins très utile lorsqu'il s'agit d'animaux d'élevage et quand les mesures sont faites à un moment précis après ou avant la prise de nourriture. Cependant lorsque les mesures se répètent souvent elles ont pour conséquence une mortalité très importante par suite des manipulations inhérentes à la méthode. C'est pourquoi, pour les élevages à long terme, nous

Tableau I - Variations de longueur de *P. guamatra* mesurées 24 h après une prise de nourriture.

Nasse (mg)	0,9	1,8	1,9	2,4	2,5	2,5	3	3	4	5,2	6	6,5	9	5,5	6,8	7,6	8,5	9	11	10,8	10,7	14,1	13,8	29,2	38
Nombre de mesures	5	10	6	7	10	4	5	8	5	12	14	11	5	9	7	4	6	5	7	9	9	7	9	12	9
Longueur moyenne (mm)	7	9,20	9,33	10,14	10,60	10,75	11,20	11,25	12,50	14,08	14,75	15,14	17,60	14	15,21	16	16,83	17,60	18,43	18,56	18,78	19,93	20,06	27	30,1
écart-type $\bar{x}$	0	0,86	0,52	1,07	0,66	0,50	0,45	0,76	0,63	1,73	1,38	0,98	1,14	0,61	0,70	0,82	1,63	1,14	1,90	0,77	2,78	0,84	0,81	1,91	2,1
Plus petite longueur mesurée (mm)	7	8	9	8	10	10	11	10	12	12	14,5	14	16	13,5	14	15	15,5	17	17	17,5	17	19	19	25	26
Plus grande longueur mesurée (mm)	7	11	10	11	11,5	11	12,5	12	13,5	17	17	16,5	19	15	16	17	20	19	21	20	21	21	21	31	31



avons préféré une prise de mesures présentant moins de risques : celle de la longueur.

## 2 - TAILLE

Il s'agit de la longueur de l'animal prise du bord antérieur de la ventouse buccale au bord postérieur de la ventouse terminale.

Deux techniques ont été employées pour les Hirudinées : mesure de la longueur après anesthésie de l'animal, cette technique a notamment été utilisée par BECKER et KATZ (1965) dans leur étude sur *P. salmositica*. Des essais entrepris après anesthésie au chloréthane à 0,2 % nous ont montré un état de contraction très variable suivant les individus et nous avons préféré la méthode utilisée par TEREKHOV (1966, 1967) pour *P. geometra*. Ces sangsues à l'issue d'une prise de nourriture vont se fixer, dans la nature sur les végétaux immergés, en élevage sur les parois de l'aquarium, où elles digèrent leur repas de sang pendant quelques jours. Durant toute cette période elles restent parfaitement immobiles et il est aisé de les mesurer en utilisant un compas à pointes sèches dont l'écartement est reporté sur une règle graduée. Cette mesure se fait avec une précision de 1/2 mm. Elle est toujours réalisée pendant la période de 24 à 48 heures qui suit le repas. Cette immobilité ne persiste en effet que tant que la majeure partie du sang n'est pas digérée, soit pendant 72 à 96 h. A l'issue de cette période les animaux redeviennent actifs et se mettent en position de chasse à la moindre vibration de l'eau ou au passage d'une ombre, rendant de ce fait toute mesure impossible. Les sangsues récoltées dans la nature, qui sont plus ou moins gorgées de sang et dans un état d'activité variable, ne peuvent donc être mesurées de cette manière et nous avons, dans ce cas, recouru à la pesée.

Le problème se posait de savoir si une sangsue en position de digestion gardait ou non toujours la même longueur et c'est ce que nous avons essayé de vérifier en plaçant des animaux isolément dans des boîtes de Pétri et en les mesurant plusieurs fois au cours d'une même journée. Entre deux mesures nous faisons déplacer les sangsues. Le résultat est consigné dans le tableau 1.

L'examen de ce tableau nous montre que sur 25 mesures, 15 ont un écart type inférieur à 1, 4 entre 1 et 1,5, 4 entre 1,5 et 2 et 2 supérieur à 2 (2,1 et 2,78). Dans la majorité des cas les écarts avec la longueur moyenne sont peu importants mais néanmoins toujours supérieurs à l'erreur qui peut être faite sur la mesure. L'utilisation du paramètre longueur est commode mais il faut garder à l'esprit qu'il s'agit d'une mesure relativement peu précise.

3 - RELATION LONGUEUR/MASSE

Il est bien connu que la relation longueur/masse est donnée par la formule :

$$P = K l^b$$

où K est une constante égale à la masse P quand  $l = 1$ . Quand il n'y a pas modification de la forme du corps au cours de la croissance  $b = 3$ . Si la forme du corps change de manière que le rapport  $\frac{l}{P}$  diminue, b est  $> 3$  ; dans le cas contraire b est  $< 3$ . Cette formule est souvent utilisée sous sa forme logarithmique :

$$\log P = \log K + b \log l$$

Les coefficients K et b, déterminés à partir de 124 mesures, sont les suivants :  $K = 0,0055$  et  $b = 2,64$ , soit :

$$\log P = 2,64 \log l - 5,19$$

$$P = 0,0055 l^{2,64}$$

Le poids est exprimé en mg et la longueur en mm. Cette formule n'est valable que pendant la période de 24 à 48 h qui suit un repas. TEREKHOV (1967) a donné pour *P. geometra* un tableau des corrélations taille/masse qui est le suivant :

Tableau 2 : Corrélations longueur/masse chez *P. geometra* (TEREKHOV, 1967)

Longueur du corps (mm)	Masse moyenne (mg)	Ecart ±	Nombre de sangues mesurées
5 - 10	0,93	0,06	35
11 - 15	5,04	0,21	52
16 - 20	7,81	0,24	96
21 - 25	13,75	0,48	103
26 - 30	21,52	0,85	88
31 - 35	30,84	1,50	57
36 - 40	37,50	1,70	20

La formule calculée d'après ses données est la suivante :

$$\log P = 2,30 \log l - 4,61$$

Elle est très voisine de celle que nous trouvons pour la même espèce ; la différence peut être due à deux faits :

- d'une part la répartition par TEREKHOV des sangues en classes de 5mm de longueur ce qui rend la détermination de la formule imprécise puisque nous avons dû utiliser la médiane des classes ;

- d'autre part au fait que nos mesures contrairement aux siennes s'appliquent à un moment précis du cycle de l'animal soit 24 heures après une prise de nourriture ce qui explique que le rapport  $\frac{1}{P}$  soit légèrement inférieur dans notre cas et de ce fait le coefficient b plus élevé.

Pour *P. salmositica*, BECKER et KATZ (1965) ont trouvé des résultats très voisins : pour des sangsues à jeun :

$$\log P = 2,646 \log l - 1,833$$

et pour des sangsues gorgées

$$\log P = 3,292 \log l - 2,485$$

ces formules montrent évidemment que le rapport  $\frac{1}{P}$  diminue fortement quand les animaux sont nourris et d'autre part que *P. salmositica* apparaît beaucoup moins filiforme que *P. geometra*. Il ne faut cependant pas oublier que ces résultats ne sont pas tout à fait comparables puisque les *P. salmositica* ont été mesurées après anesthésie, donc théoriquement en extension maximale.

## B - ETUDE DU CYCLE BIOLOGIQUE DE *P. GEOMETRA*

### 1 - LIEU DE RECOLTE

Tous nos prélèvements ont été effectués à Verlinghem dans le Nord. La présence de *P. geometra* en ce lieu m'a été signalée par Monsieur le Professeur DURCHON en 1970, époque à laquelle des pêcheurs lui avaient apporté des exemplaires de cette espèce pour détermination. La pièce d'eau de Verlinghem est un étang selon la classification de DUSSART (1966), de forme rectangulaire (285 m de long sur 25 à 28 m de large). La plus grande profondeur dans l'axe de l'étang est de 1,5 m environ.

La présence de *P. geometra* en ce lieu peut surprendre pour deux raisons : d'une part il s'agit d'une espèce généralement considérée comme sténotope de lac, d'autre part à cause de son abondance. En effet c'est une sangsue relativement peu fréquente dans les relevés des auteurs qui se sont intéressés aux Hirudinées : ROUSSEAU (1912) ne la trouve commune qu'en Europe septentrionale et centrale ; elle ne représente cependant qu'un très faible pourcentage des récoltes effectuées en Pologne par SANDNER (1951) WOJTAS (1959) et WILKIALIS (1970b). Elle n'est pas plus abondante dans les relevés de BENNIKE (1943) au Danemark, PERRET (1952) en Suisse et MANN (1955) en Grande-Bretagne.

Il nous a donc semblé intéressant de dégager les facteurs pouvant expliquer cette abondance relative de *P. geometra* à Verlinghem.

## 2 - ÉCOLOGIE DE *P. GEOMETRA*

Nous passerons en revue les différents paramètres connus pour influencer la répartition des Hirudinées.

### a - Qualité de l'eau

Les sangsues évitent en général les eaux dystrophes (les seules eaux où on ne les rencontre pas sont les eaux acides des tourbières) ; elles sont peu abondantes dans les eaux oligotrophes et par contre très nombreuses dans les eaux eutrophes tant au point de vue nombre d'espèces que nombre d'individus (BENNIKE, 1943 ; LUKIN, 1962). A Verlinghem, c'est un étang de type eutrophe (détermination faite d'après la classification des étangs de WURTZ, 1958<sup>\*</sup>). L'eutrophisation est probablement due à la décomposition des feuilles mortes tombant des arbres entourant cet étang et à celle des nombreuses phanérogames aquatiques qui y croissent.

### b - pH de l'eau

C'est un facteur considéré comme important pour les Hirudinées par BENNIKE (1943). Cet auteur a trouvé *P. geometra* dans des eaux à pH > 7 et où la proportion de bicarbonates correspond à 20 mg de CaO/l et plus. Nos propres observations à Verlinghem s'échelonnant sur plusieurs années nous donnent toujours un pH supérieur à 7 et généralement compris entre 8 et 8,5. La dureté naturelle de l'eau est accrue d'une part par un apport annuel de chaux par les pêcheurs et d'autre part, par l'activité photosynthétique.

### c - Conductivité de l'eau

Ce paramètre donne une bonne appréciation de la concentration en matières dissoutes. Son influence sur la répartition des Hirudinées a été étudiée par SCUDDER et MANN (1968) et HERRMANN (1970).

Dans le cas de *P. geometra* ce facteur ne pourrait éventuellement jouer que par sa limite inférieure puisque cette espèce se rencontre également en milieu saumâtre. Elle peut supporter une salinité de 8‰. (HERTER, 1937).

### d - Vitesse du courant

La vitesse du courant intervient dans la répartition des Hirudinées, groupe constitué d'espèces bonnes nageuses (Gnathobdelles, Pharyngobdelles) et d'autres ne nageant pas ou à peine (*Glossiphoniidae*). Cependant ce facteur perd de son importance dans la mesure où les sangsues

---

\* La détermination du phytoplancton et du zooplancton ainsi que l'interprétation des données obtenues ont été réalisées par N. ANGELI. Je l'en remercie vivement.

trouvent un substrat convenable pour s'accrocher (pierres, rives durcies par la force du courant). Par exemple *G. complanata*, espèce incapable de nager, est assez fréquente dans des cours d'eau rapide.

WILKIALIS (1970) répartit les sangsues en trois groupes :

- . sangsues dont la présence est indépendante de la vitesse du courant : *H. marginata*, *E. testacea*, *H. sanguisuga* ;
- . sangsues dont le pourcentage par rapport aux autres espèces d'Hirudinées augmente au fur et à mesure que le courant devient plus lent : *T. tessellatum*, *T. maculosum*, *H. costata*, *G. complanata*, *G. heteroclita* et *H. stagnalis* ;
- . sangsues dont le pourcentage s'accroît quand la vitesse du courant augmente *E. octoculata* et *E. nigricollis*.

Cet auteur ne mentionne pas *P. geometra*, espèce qu'il n'a rencontrée qu'à quelques exemplaires dans deux relevés sur 40. Cependant MANN (1962) et WOJTAS (1959) la signalent comme préférant les eaux à courant rapide. Par contre, BENNIKE (1943) et PERRET (1952) la considèrent comme une forme sténotope de lac. SOOS (1964) et CRISTEA et MANOLELI (1977) signalent que cette espèce préfère les eaux stagnantes de très grande étendue ou des eaux à courant très faible. Nous rencontrons cependant dans le département du Nord *P. geometra* dans des pièces d'eau de faible surface : Verlinghem, Marchiennes, Lallaing\*, Coulsore du Nord\* et en eau stagnante. La vitesse du courant ne semble donc pas un facteur limitatif pour cette espèce. Cependant les données concordantes de nombreux auteurs en ce qui concerne la préférence de *P. geometra* pour les eaux agitées peuvent nous laisser supposer que ce facteur intervient éventuellement en assurant une meilleure oxygénation de l'eau.

#### e - Oxygénation de l'eau

*P. geometra* est connue pour être une des sangsues les plus exigeantes en oxygène (MANN, 1962) ; en effet elle déploie, contrairement à beaucoup d'autres espèces, une intense activité de chasse car elle doit s'alimenter régulièrement.

Dans les étangs du Nord où nous l'avons rencontrée existe un développement considérable des phanérogames aquatiques qui assurent pendant l'été une très bonne oxygénation des couches superficielles et notamment des eaux de la zone littorale où nous trouvons le plus souvent *P. geometra*.

Un autre facteur important pour les Hirudinées est la température.

---

\* La présence de *P. geometra* dans ces deux étangs nous a été signalée par Monsieur DUCROCQ, Garde-Chef de la Fédération Piscicole.

f - Température

Ce facteur intervient pour de nombreuses espèces par sa limite inférieure ; en effet BENNIKE (1943) estime que les sangsues ne vivent pas dans des eaux dont la température reste trop longtemps en dessous de 11°C, dans ce cas elles ne pourraient pas se reproduire. *P. geometra* semble être moins sensible que les autres espèces aux basses températures (nous avons obtenu des pontes à 8°C et 10°C) ; par contre BENNIKE (1943) pense que sa répartition est limitée aux grandes étendues d'eau parce qu'elle ne supporte pas des températures supérieures à 26°C. HERTER (1937) a en effet constaté qu'elle présente une activité anormale dès que cette température est atteinte. Nous avons fait la même constatation au cours du tournage du film "Biologie des sangsues"\*. Les *P. geometra* devenaient inactives dès que l'eau s'échauffait sous l'influence des projecteurs et que la température dépassait 30°C.

Les mesures de température faites à Verlinghem n'étaient pas assez fréquentes pour nous permettre de savoir si les eaux des étangs de la région pouvaient ou non atteindre cette température. C'est pourquoi nous avons dépouillé les relevés concernant diverses eaux du Nord qui nous ont été accessibles : ANGELI (1973, 1977), PARENTY (1977), relevés de l'Agence de Bassin Artois-Picardie. Des températures supérieures à 26°C sont exceptionnelles et ne sont apparues que pendant de courtes périodes notamment au cours de l'été chaud de 1976 où par exemple des températures de 27°C et 28,6°C ont été notées respectivement en juin et juillet au Bassin des Prés Duhem par ANGELI (1977). Cependant il s'agit là de températures de surface, les couches superficielles des étangs s'échauffant beaucoup plus que les zones plus profondes en raison de la turbidité de l'eau. Les écarts entre la température de surface et la zone plus profonde située à 0,50 m se situent entre 2 et 3°C. Comme la température maximale relevée en surface est 29°C, il apparaît que le degré thermique des eaux des étangs de la région est parfaitement compatible avec la survie de *P. geometra*, à condition que la profondeur soit suffisante pour que les animaux puissent gagner des couches plus froides en cas de période chaude prolongée. Il faut noter en outre que TEREKHOV (1967) a élevé cette espèce à 28°C sans signaler de difficultés particulières. En fait la température pourrait avoir une influence indirecte par l'intermédiaire de la concentration en oxygène ce qui expliquerait ces constatations un peu discordantes.

---

\* J. MALECHA (1976) ; Réalisation : M. GUILLON ; Distribution : Service du film de Recherche Scientifique (16 mm, durée 25 mn).

### g - Caractéristiques de la station

Les sangsues étant toutes pourvues d'une ventouse à chaque extrémité du corps, il paraît logique de penser qu'elles ont besoin d'un support solide (fond, végétaux) pour pouvoir s'accrocher et se déplacer (BENNIKE, 1943). De ce fait, elles éviteraient les sols sableux et vaseux. Elles ont en outre besoin de points d'attache pour la copulation et le dépôt des cocons, c'est pourquoi PAWLOWSKI (1936) et LUKIN (1962) pensent qu'elles se trouvent le plus souvent sur un fond pierreux. De même MANN (1962) rencontre le plus fréquemment *P. geometra* dans des rivières au fond couvert de pierres. Les observations de WILKIALIS (1970) montrent que cette condition n'est pas nécessaire et que seules certaines espèces dominent sur ce type de fond alors que d'autres sont plus nombreuses sur un sol d'une autre nature. Il remarque en outre que l'on rencontre fréquemment des sangsues dans des eaux différentes mais dans des zones d'aspect identique, dans les parties couvertes par des joncs et dans les "baies" et les vieux lits de rivières où s'amoncellent de grandes quantités de détritrus, où elles trouvent un milieu favorable pour s'attacher. Dans le cas des étangs de la région et notamment de Verlinghem, *P. geometra* trouve facilement des zones de refuge dans la végétation très abondante de la zone littorale. Si tous ces facteurs abiotiques jouent un rôle dans la répartition des sangsues c'est parce qu'ils conditionnent la répartition des animaux qui constituent des proies pour elles. En effet, la nourriture apparaît comme étant un facteur essentiel pour expliquer la présence ou l'absence de certaines espèces.

### h - Nourriture

*P. geometra* n'est pas inféodée à une seule espèce et parasite tous les poissons d'eaux douce et saumâtre. Il est évident qu'on ne la trouvera que dans des eaux hébergeant ses hôtes. Le travail de WILKIALIS (1970) montre très nettement que l'on ne rencontre en nombre les différentes espèces de sangsues que dans les zones où leur nourriture abonde : mollusques pour *G. complanata*, oies et canards pour *Theromyzon*, bétail allant s'abreuver pour *H. costata*. MANN (1955) estime que la régression des populations d'*H. medicinalis* en Grande-Bretagne est due, non pas à des modifications du biotope favorable, mais à celles des techniques d'élevage, le bétail n'allant plus s'abreuver dans les mares naturelles. En ce qui concerne *P. geometra* dans la région, nous ne l'avons rencontrée en abondance que dans des étangs de pêche recevant un réempoissonnement régulier. Ce fait semble avoir deux conséquences essentielles pour *P. geometra* :

- d'une part c'est vraisemblablement lui qui est à l'origine de l'extension de l'espèce dans le Nord. Nous avons pu vérifier ce phénomène à Marchiennes lors de la création de l'étang des Evoïches : en 1972 élargissement d'un fossé de drainage où l'espèce était absente, peuplement par déversement de poissons en automne de la même année, présence de *P. geometra* dès l'été 1973, abondante en 1974. Ce transport de sangsues par l'hôte n'est pas un phénomène rare et c'est ainsi que l'on explique la présence de *P. geometra* sur la côte Est de l'Amérique du Nord où elle aurait été introduite d'Europe par un transport de carpes (MEYER, 1940).
- d'autre part, il provoque la présence régulière, mais surtout à la fin de l'hiver et au début du printemps, d'un contingent quelquefois important de poissons malades (saprolégniose) offrant des proies faciles aux piscicoles alors en pleine reproduction.

En conclusion, il apparaît que le facteur le plus important conditionnant le peuplement en *P. geometra* de certains étangs du Nord est leur mode d'exploitation (étangs de pêche intensive soumis à un réempoissonnement régulier). D'autres facteurs interviennent pour assurer la prolifération et le maintien de l'espèce comme la qualité de l'eau, le pH, l'oxygénation. La température de l'eau, sa conductibilité, la vitesse du courant, les caractéristiques de la station ne semblent pas jouer un rôle essentiel.

### 3 - METHODE DE PRELEVEMENT

*P. geometra* se rencontre soit sur son hôte, un poisson, lorsqu'elle se nourrit, soit sur un corps immergé lorsqu'elle digère, se reproduit ou chasse. Dans ce dernier cas nous l'avons toujours recueillie dans les plantes aquatiques de la zone littorale où encore sur les végétaux flottants. Notre observation confirme celles de SAPKAREV (1967, 1968) pour d'autres espèces qu'il trouve pour la plupart dans cette zone. Il est en contradiction sur ce point avec DUSSART (1966) qui les situe dans la zone sublittorale. Des variations saisonnières existent cependant à Verlinghem : en automne elles se fixent de préférence sur les feuilles mortes immergées, tombées des arbres bordant l'étang ; en hiver, elles s'éloignent des berges pour aller vers les zones les plus profondes. Leur répartition dépend probablement de l'importance de la pièce d'eau puisque dans les lacs, BENNIKE (1943) la trouve entre 2 et 3 m et l'a même pêchée à 10 et 15 m de profondeur où elle a certainement été entraînée par un poisson.

La récolte des sangsues se fait en prélevant des plantes aquatiques avec un troubleau. Ces dernières sont déposées dans un bac en plastique blanc où elles sont minutieusement examinées. Les *P. geometra*,

strictement aquatiques, sorties de leur élément, attirent l'attention malgré leur petite taille, par des torsions du corps.

Les prélèvements se font pendant un temps fixe qui est de deux heures et à des intervalles d'un mois environ. C'est actuellement la seule méthode éprouvée, utilisée pour les Hirudinées. Elle a été employée par MANN (1953, 1955, 1957 a et b, 1961), TEREKHOV (1967) et DAVIES et REYNOLDSON (1975).

#### 4 - HISTOGRAMME DES MASSES DES *P. GEOMETRA* RECOLTEES AU COURS DE L'ANNEE 1970-1971

L'étude des histogrammes de la figure 2 met en évidence les faits suivants :

- de janvier à avril la majorité des sangsues sont d'une masse supérieure à 10 mg, certaines pouvant même atteindre 60 à 70 mg ;
- apparition en mai de *P. geometra* néonates et disparition des plus grosses. Seul subsiste un faible pourcentage d'individus d'une masse supérieure à 10 mg qui vont disparaître : ils sont absents du relevé effectué en juin.
- en juin les sangsues nées en mai atteignent une masse de 4 à 6 mg.
- en juillet, août et septembre, on constate toujours la présence en assez grand nombre de très jeunes sangsues, mais aussi l'apparition d'animaux d'une masse plus élevée (surtout en août) mais ne dépassant jamais 20 mg. Ces individus proviennent vraisemblablement de la génération éclosée en mai.
- le nombre des jeunes diminue à partir d'octobre, époque où l'on constate un accroissement de la masse d'une partie de la population, ce qui se manifeste par un plus grand pourcentage d'animaux de 10 à 20 mg. Cette augmentation de masse va s'accroître à partir de janvier.

En novembre 1970 une importante montée des eaux ayant rendu l'étang inaccessible nous n'avons repris l'étude de la population de *P. geometra* qu'en 1971 durant la période s'étendant d'octobre à décembre. Cette étude a été faite d'une part pour combler une lacune dans nos relevés, d'autre part pour essayer de mettre en évidence le moment où apparaît l'accroissement important de masse des sangsues récoltées en début d'année.

#### 5 - HISTOGRAMMES DES MASSES DES *P. GEOMETRA* RECOLTEES D'OCTOBRE A DECEMBRE 1971 (Fig. 3)

Ils montrent essentiellement une grande stabilité de la population durant toute cette période. La phase d'accroissement ne se situe donc pas pendant cette période mais bien en début d'année civile comme le montre la figure 2. Les sangsues de petite taille (moins de 2 mg) sont encore fréquentes jusqu'en début novembre et disparaissent en décembre. L'examen

histologique de *P. geometra* au cours de son cycle annuel nous a permis de voir que les deux phases de croissance pondérale hivernales étaient liées à des activités de synthèse différentes. La première qui a lieu en octobre se caractérise par l'accumulation de réserves dans des cellules adipeuses. La seconde qui a lieu en janvier coïncide avec l'apparition de l'activité sécrétrice des glandes clitelliennes (Fig. 225). L'accroissement de volume de ces glandes et leur importance dans le corps de ces sangsues est certainement en rapport avec l'augmentation très importante de masse constatée à cette époque.

De l'étude des histogrammes des figures 2 et 3 il est possible de tirer les conclusions suivantes :

- la pérennité de l'espèce est assurée par des individus de grande taille qui passent la mauvaise saison en subissant deux phases d'accroissement, la première en octobre, la seconde en janvier.
- la génération d'hiver meurt en mai après s'être reproduite.
- les jeunes issus de cette ponte éclosent massivement en mai.

Un certain nombre de questions permettant d'élucider le cycle biologique de cette espèce restent en suspens, notamment, la durée de la période de reproduction, l'époque d'apparition de la maturité sexuelle, la durée du développement embryonnaire et la longévité.

Pour y répondre, nous avons fait des observations sur le terrain et au laboratoire sur des animaux nouvellement récoltés ou en élevage

#### 6 - DUREE DE LA PERIODE DE REPRODUCTION

Les observations faites sur le terrain de 1970 à 1976 montrent que des pontes s'observent régulièrement dans la deuxième quinzaine de mars et deviennent très abondantes en avril. TEREKHOV (1967) observe des pontes dès fin février et nous avons également obtenu au laboratoire une ponte immédiate des animaux récoltés à cette époque comme le montre le tableau 3.

Tableau 3 - Ponte des animaux récoltés dans la nature au cours des 24 heures qui suivent leur arrivée au laboratoire.

Date	30 VI 70	22 VII 70	31 VIII 70	29 IX 70	27 X 70	21 XI 70	15 XII 70	19 I 71	23 II 71	30 III 71	27 IV 71	18 V 71
Ponte	+	+	+	seuls quelques animaux déposent des cocons	-	-	-	-	+	+	+	+

Tableau 4 - Epoques de reproduction des principales espèces d'Hirudinées européennes.

Ordre	Famille	Espèce	Forme	Dates de reproduction	Pays	Auteurs	
GNATHOBDELLES	<i>Hirudidae</i>	<i>Hirudo medicinalis</i> (L.)		Juillet-août	Danemark	BENNIKE (1943)	
		<i>Haemopis sanguisuga</i> (L.)		Début juin à fin septembre	Danemark	BENNIKE (1943)	
PHARYNGOBDELLES	<i>Erpobdellidae</i>	<i>Erpobdella octoculata</i> (L.)		Début mai à fin octobre.	Danemark	BENNIKE (1943)	
				Dépôt des cocons en juin et juillet ; éclosion août-septembre.	Grande-Bretagne	MANN (1953)	
				Mi-mars à mi-juin.	Yougoslavie	SAPKAREV (1969)	
		<i>Erpobdella testacea</i> (Sav.)		Début mai à fin octobre.	Danemark	BENNIKE (1943)	
			Début mars	Grande-Bretagne	MANN (1961)		
RHYNCHOBDELLES	<i>Glossiphoniidae</i>	<i>Glossiphonia complanata</i> (L.)		Début mai à début juillet.	Danemark	BENNIKE (1943)	
				Mars à juin.	Grande-Bretagne	MANN (1957a)	
				Avril à juin.	Pologne	WILKIALIS (1970a)	
				24 avril au 17 octobre.	Suisse	PERRET (1952)	
		<i>Glossiphonia heteroclita</i> (L.)	<i>hyalina</i> (O.F.M.)		Mi-juin à mi-octobre.	Danemark	BENNIKE (1943)
				Juin, juillet et août (oeufs et jeunes).	Pologne	WILKIALIS (1970a)	
			<i>papillosa</i> (Braun)		Oeufs en juin, juillet et août ; jeunes seulement en juillet et août.	Pologne	WILKIALIS (1970a)
		<i>Hemiclepsis marginata</i> (O.F.M.)			Début juin à mi-août.	Danemark	BENNIKE (1943)
					Début mai à mi-août.	Europe Centrale	HERTER (1937)
					Mai à fin septembre.	Pologne	WILKIALIS (1970a)
<i>Helobdella stagnalis</i> (L.)			Mai à septembre.	Pologne	WILKIALIS (1970a)		
			Mi-mai à fin août (oeufs)	Danemark	BENNIKE (1943)		
			Avril à fin août.	Grande-Bretagne	MANN (1957b)		
<i>Theromyzon tessulatum</i> (O.F.M.)			Mai à fin août	Pologne	WILKIALIS (1970a)		
			Avril à août	Europe Centrale	HERTER (1937)		
			Oeufs du 22 juin au 18 juillet ; jeunes jusqu'au 24 août.	Danemark	BENNIKE (1943)		



Dans la nature elle cesse d'octobre à fin février (tableau 3). La présence de jeunes sangsues dans les relevés effectués en octobre et novembre est certainement liée aux pontes tardives et, les eaux se refroidissant, au développement plus lent des embryons (comme nous le verrons ultérieurement).

L'ensemble de ces données nous permet d'affirmer que la reproduction de *P. geometra* dans le Nord de la France s'étend de fin février à septembre inclus ce qui confirme les résultats de TEREKHOV (1967) et allonge cette période située par BENNIKE (1943) d'avril à juillet au Danemark, et par HERTER (1937) de mars à début mai en Europe Centrale. C'est la durée la plus longue observée chez les Hirudinées européennes (tableau 4).

#### 7 - EPOQUE D'APPARITION DE LA MATURITE SEXUELLE

L'observation de la figure 2 montre que dans la nature les sangsues écloses en mai se reproduisent très vite. Nous constatons un léger déficit en naissances en juin, dû au fait qu'il y a disparition des hivernantes et que les sangsues filles n'ont pas encore un taux de reproduction important. Il se comble progressivement et les éclosions sont très nombreuses en août et septembre.

En élevage la maturité sexuelle survient très rapidement : 19 jours après l'éclosion chez un individu élevé à 26°C (généralement entre le 19e et le 26e jour) (TEREKHOV, 1967). A 15°C, nous notons la ponte des sangsues un à deux mois après la naissance. Nous avons constaté la première ponte au cours de la 4e semaine d'élevage, à un rythme d'éclairement de 18h sur 24, pour des *P. geometra* placées à 25°C, de la 6e semaine à 20°C et de la 12e semaine à 10°C.

Nous discuterons, dans un autre chapitre de l'influence des facteurs externes sur la ponte, mais nous pouvons retenir dès à présent le fait qu'une température élevée accélère l'apparition de la maturité sexuelle.

#### 8 - DUREE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

D'après TEREKHOV (1966) l'éclosion survient au bout de 13 à 20 jours lorsque la température se situe entre 15 et 26°C, de 13 à 15 jours entre 24 et 28°C. A une température constante de 15°C, nous observons régulièrement les naissances au bout de 24 jours et à 25°C au bout de 14 jours. Chez *P. geometra*, comme chez la plupart des Invertébrés, la vitesse du développement embryonnaire est sous la dépendance de la température, des températures élevées l'accélérant, et au contraire, des températures basses la freinant.

## 9 - LONGEVITE

La longévité des animaux hivernants est facile à établir en se référant à la figure 2. Ce sont les animaux éclos à partir de septembre qui hivernent et cette population caractérisée par sa grande taille disparaît totalement entre avril et juin. Ce qui nous donne une durée de vie de 8 à 9 mois pour ce groupe. La même observation a été faite en élevage par TEREKHOV (1967). BRUMPT (1900b) s'est également étonné de voir mourir toutes ses *P. geometra* après la ponte. La longévité des sangsues écloses en été est beaucoup plus difficile à établir d'après les observations dans la nature. Les pontes des sangsues sont échelonnées dans le temps et chaque cocon ne donne naissance qu'à un seul individu. De ce fait les générations sont intriquées les unes dans les autres, rendant très délicate une estimation de la longévité d'après les histogrammes représentatifs de la croissance de la population (Fig. 2). En élevage, chez des sangsues en ponte et nourries régulièrement (Fig. 4), elle semble sous la dépendance directe de la température et est au maximum de 97 jours à 25°C, 127 jours à 20°C et 200 jours à 10°C. Cette longévité est d'autant plus intéressante à connaître que nous n'avons pas pu mettre en évidence de phase de sénescence chez cette espèce comme il en existe dans d'autres groupes et notamment chez les Oligochètes (MICHON, 1954). De ce fait la période de ponte de ces sangsues s'achève avec leur mort.

L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer un cycle biologique pour *P. geometra*.

## 10 - CYCLE BIOLOGIQUE DE P. GEOMETRA

Ce cycle biologique est représenté sur la figure 5a. La pérennité de l'espèce pendant la mauvaise saison est assurée par des individus de grande taille dont la ponte débute fin février. Cette population disparaît entre avril et juin. Elle est remplacée par des sangsues écloses en majorité début mai et qui vont commencer à se reproduire en juin. La reproduction cesse en septembre, époque où apparaît la génération d'hiver. En prenant comme bases pendant l'été les résultats d'élevage soit : 15 à 20 jours pour le développement embryonnaire, 1 à 2 mois pour l'apparition de la maturité sexuelle et une durée de survie de 3 à 4 mois, nous pouvons proposer le schéma de la figure 5b pour les générations d'été.

Ce cycle biologique est sous la dépendance des facteurs externes : lumière, température, nutrition, dont nous étudierons l'influence dans le chapitre V. Ils pourront intervenir pour modifier notamment le nombre des générations d'été.

11 - COMPARAISON DU CYCLE BIOLOGIQUE DE P. GEOMETRA  
AVEC CELUI D'AUTRES ESPECES D'HIRUDINEES

Plusieurs types de cycles ont été décrits.

a - Sangsues ayant une vie longue et se reproduisant  
tous les ans

Il s'agit des espèces de grande taille du groupe des Gnathobdelles. La maturité sexuelle est atteinte pendant l'année civile qui suit l'éclosion et l'animal se reproduit tous les ans pendant sa vie qui peut être assez longue, par exemple 27 ans pour *H. medicinalis* (KORSCHOLT, 1924). La période de reproduction est assez courte (tableau 4).

b - Sangsues vivant plus d'une année et dont la  
longévité n'atteint pas celle des précédentes

Exemple : *G. complanata*. MANN (1957) constate deux périodes de reproduction, l'une en mars-avril, l'autre en mai-juin. La première concerne les animaux âgés de deux ans et plus, la deuxième ceux d'un an. Un petit nombre d'individus survivent et se reproduisent la troisième année et quelques rares spécimens la quatrième. 70 % seulement des animaux d'un an se reproduisent, en général les plus lourds et les plus âgés (12 mois) et 40 % seulement des plus légers (10 à 11 mois).

c - Animaux vivant un an ou moins

Chez eux deux types de cycles existent :

- les sangsues ne se reproduisent pas pendant l'année civile de leur naissance, mais la suivante et meurent après la ponte ; c'est le cas d'*E. testacea* (MANN, 1961) et probablement le cas de nombreuses *Glossiphoniidae* comme *T. tessulatum* (MANN, 1951) et *H. marginata*.

- les jeunes de la première génération d'été se reproduisent l'année même, c'est le cas d'*H. stagnalis* (MANN, 1957). La population hivernante A<sub>1</sub> pond en avril des oeufs déposés dans un cocon transparent que porte la mère ; les jeunes formant la génération B<sub>1</sub> sont libérés en juin, époque où meurent les adultes. En juillet 72 % des B<sub>1</sub> sont en reproduction. En août, il y a autant de B<sub>1</sub> reproducteurs que de non reproducteurs et apparition des jeunes C<sub>1</sub> issues de B<sub>1</sub>. En septembre, octobre et novembre la population hivernante est composée d'un tiers de B<sub>1</sub> n'ayant pas pondu pendant l'été et de deux tiers de C<sub>1</sub>. Des cycles différents ont cependant été décrits pour cette espèce en Amérique du Nord par TILLMAN et BARNES (1973) et DAVIES et REYNOLDSON (1975).

L'examen de ces différents cycles montre que celui de *P. geometra* est très voisin de celui d'*H. stagnalis*. Des différences existent cependant : d'une part, le nombre des générations d'été est plus important chez *P. geometra* ; d'autre part, chez cette dernière espèce, du fait d'un mode de reproduction très différent, les générations ne sont pas aussi nettement discernables dans la nature. En effet, chez *H. stagnalis*, comme chez toutes les *Glossiphoniidae*, la ponte, 7 à 37 oeufs (BENNIKE, 1943 ; WILKIALIS, 1970), se fait en une seule fois. Par contre, *P. geometra*, à partir de la maturité sexuelle jusqu'à sa mort, va déposer régulièrement des cocons qui ne donneront naissance chacun qu'à une seule sangsue.

L'existence d'animaux beaucoup plus grands en hiver qu'en été nous a incité à rechercher les facteurs responsables de cette différence de croissance.

### C - ETUDE DE LA CROISSANCE DE *P. GEOMETRA*

Au cours de cette étude nous envisagerons successivement l'influence de la lumière, de la température, de la nutrition et de la maturation génitale sur la croissance ainsi que son interprétation mathématique.

#### 1 - CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les élevages ont été conduits dans les salles climatisées d'un volume de 8 m<sup>3</sup> de l'Unité de Recherches sur la Cellule. L'éclairage est obtenu au moyen de lampes Philips 40 watts type "lumière du jour". Elles fournissent une énergie de l'ordre de 3 000 ergs/cm<sup>2</sup>/s (mesure prise à l'emplacement des aquariums et dans l'air). La photopériode est réglée de manière à ne présenter qu'une seule phase de lumière et d'obscurité dans un cycle de 24 heures. La régulation thermique a été prévue par le constructeur au 1/10° de degré. En fait les variations peuvent être plus importantes mais n'excèdent jamais 1°C. Les animaux sont nourris sur carassins selon le mode opératoire exposé dans le chapitre "Matériel et Techniques".

#### 2 - ETUDE EXPERIMENTALE DE L'INFLUENCE DE LA LUMIERE

##### a - Résultats (Figs 6 à 9)

La comparaison de ces différentes courbes montre que :  
- quelle que soit la durée de la photophase, on observe une croissance initiale rapide, puis après le 5e ou 6e repas un ralentissement. La courbe tend vers un palier qui est la taille maximale qu'atteignent les animaux dans les conditions de l'expérience.

- la taille atteinte semble fonction de l'éclairément. Plus la durée de la scotophase est longue, plus les animaux grandissent (tableau 5). Le test de Student (tableau 5) appliqué aux échantillons représentés par les animaux en fin d'expérience, montre qu'ils diffèrent significativement.

Tableau 5 - Influence de la lumière sur la croissance de *P. geometra*.

Durée quotidienne d'éclairément	12 h	18 h	24 h
Nombre de sangsues à la fin de l'expérience	40	22	31
Taille moyenne, en mm, à la fin de l'expérience	23,8	21,3	16,6
Ecart type $\pm$	4,44	4,27	4,22
Valeur de t.		2,15	3,98

#### b - Discussion

En fait, l'interprétation de ces trois courbes doit faire intervenir d'autres éléments que la durée de la période d'éclairément. Ces trois lots (Figs 6, 7, 8) sont en effet placés dans des conditions très différentes :

- 24 h d'éclairément sur 24 : cette situation est physiologiquement anormale et se répercute sur le comportement des animaux qui sont presque continuellement en mouvement. Si nous pouvions nous permettre une comparaison anthropomorphique, nous dirions qu'ils sont perpétuellement inquiets. Cette attitude est tellement caractéristique qu'il n'est pas nécessaire de vérifier le tableau de commande des chambres climatiques pour constater qu'un lot a été soumis accidentellement à ce type d'éclairément. Ces sangsues pondent et la croissance s'arrête très vite comme le montre la figure 6.

- 18 h d'éclairément sur 24 : cette situation semble parfaitement convenir aux piscicoles. Elles commencent à pondre après un mois d'élevage.

- 12 h d'éclairement sur 24 : ce lot diffère des deux précédents du fait que la ponte est inhibée. En conclusion, il nous semble vraisemblable que la faible taille du lot placé à 24 h d'éclairement sur 24 est liée aux conditions anormales d'éclairement et que par contre, la différence mise en évidence entre les deux autres lots pourrait être simplement due à la présence ou à l'absence d'activité reproductrice. Des expériences complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer l'influence réelle de la lumière sur la croissance.

### 3 - ETUDE EXPERIMENTALE DE L'INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

Les sangsues sont placées dans des conditions identiques d'éclairement : 18 heures de lumière sur 24. Ce paramètre a été choisi pour permettre une reproduction normale de chacun des lots en expérimentation. Les animaux sont nourris régulièrement tous les 7 jours. Un lot a été placé à un éclairement différent (8 h).

#### a - Résultats (Figs 10 à 14)

L'examen de ces différentes courbes nous montre :

- que la vitesse de croissance est d'autant plus importante que la température est élevée ;
- que la température la plus favorable à la croissance est de 20°C ;
- qu'à 25°C la taille moyenne atteinte par les sangsues est d'un tiers inférieure à celle des piscicoles maintenues à 20°C ;
- qu'à une température inférieure à 20°C, la taille maximale atteinte diminue avec la température mais d'une manière beaucoup moins spectaculaire qu'à 25°C.

#### b - Discussion

Dans cette série expérimentale il n'a pas été possible d'empêcher la ponte puisqu'à une température supérieure à 17,5°C environ, *P. geometra* dépose des cocons quelle que soit la durée d'éclairement. Nous avons donc placé les différents lots à un rythme nycthémeral tel que la ponte apparaît normalement dans chacun d'eux (sauf le lot à 8 h d'éclairement où elle est retardée). Comme il est bien connu que chez de nombreuses espèces la maturité sexuelle coïncide avec un arrêt plus ou moins rapide de la croissance somatique, la question qui se pose est de savoir si dans notre expérience les différences observées sont dues à l'activité reproductrice ou à la température. Nous constatons que, dans les mêmes conditions d'éclairement, la ponte apparaît d'autant plus rapidement que la température est élevée (Figs 10,

11 et 12). Si la croissance était uniquement influencée par ce facteur, nous devrions avoir une corrélation inverse entre la température et la taille, or ce n'est pas ce que nous observons. La longueur maximale s'observe à 20°C et est accompagnée d'une activité reproductrice précoce et importante. La température apparaît donc comme un des facteurs influençant la croissance. Une température trop élevée, tout en accélérant la croissance, n'est cependant pas favorable à l'acquisition d'une taille importante ce qui pourrait expliquer la plus faible longueur des générations d'été. Par contre, une température basse, bien que permettant l'apparition d'animaux de taille relativement élevée, n'est certainement pas le facteur essentiel expliquant la croissance importante atteinte par les piscicoles en hiver puisque cette dernière est favorisée à 20°C.

Nos résultats confirment certaines observations faites par SSYNEWA (1940) chez *T. maculosum* (= *Protoleipsis maculosa*). Cet auteur observe qu'une température élevée (24°C) exerce une action négative sur l'augmentation de la biomasse et que par contre les meilleurs résultats s'observent à une température moyenne de 13 à 18°C. Cependant c'est à 5°C que la croissance est la plus importante ; mais dans ce cas sa vitesse est très faible et la maturité sexuelle est retardée. SSYNEWA conclut de ses expériences que pour obtenir un accroissement rapide et maximal de la biomasse ainsi qu'une accélération de l'époque d'apparition de la maturité sexuelle il faut placer *T. maculosum*

- à température moyenne (13 à 18°C) pendant et après les 1<sup>e</sup> et 2<sup>e</sup> repas ;
- à basse température (5°C) après le 3<sup>e</sup> et dernier repas pendant un certain temps ;
- de nouveau à température moyenne.

Cette observation confirme le fait bien connu (KÜHNELT, 1969) que les variations de température sont en général bénéfiques. L'utilité d'une période froide dans le cycle biologique de *T. maculosum* est peut-être due au fait qu'il s'agit d'une espèce à répartition septentrionale. Des résultats de cet auteur, il est difficile de faire la part de l'influence de la température sur la croissance et celle de la maturation sexuelle, facteur dont nous allons aborder l'étude dans le paragraphe suivant.

#### 4 - ETUDE EXPERIMENTALE DE L'INFLUENCE DE LA MATURATION SEXUELLE

Dans son étude sur *P. geometra*, TEREKHOV (1967) estime que la reproduction est l'un des facteurs les plus importants régissant la croissance de cette espèce. Il pense en effet que les animaux atteignent une grande taille en hiver parce qu'ils ne se reproduisent pas et évidemment qu'ils sont de plus petite taille en été, période de ponte active. L'examen des

figures 6 à 9 et 10 à 14, nous montre que dans chacune de ces deux séries expérimentales, les sangsues pondent lorsqu'une certaine taille est atteinte ; elle est de l'ordre de 14 mm pour les séries des figures 6 et 7, et de 19 à 20 mm pour les lots des figures 10, 11 et 12. Cette observation nous laisse supposer que chez *P. geometra* la ponte commence lorsqu'une masse critique est atteinte, cette dernière dépendant essentiellement, dans des conditions optimales d'éclaircissement, de la nutrition comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. La taille maximale dépend elle, pour des animaux en ponte, et à conditions de nutrition égales, soit de la température, soit de l'éclaircissement (si l'on tient compte de l'éclaircissement constant, biologiquement anormal). La température agit-elle toujours directement, ou intervient-elle par le biais de l'activité reproductrice ? L'examen du tableau 6 montre que la durée de ponte est d'autant plus courte que la température est élevée.

Tableau 6 - Influence de la température d'élevage sur la production de cocons chez *P. geometra*.

Température d'élevage	25°C	20°C	10°C
Nombre d'animaux	25	26	55
Nombre de cocons déposés	1338	1408	2461
Nombre moyen de cocons par sangsue	53,52	54,15	44,75
Nombre de semaines de ponte	11	13	19
Nombre moyen de cocons déposés par une sangsue en une semaine	4,87	4,17	2,36

Il paraît évident qu'à taux de reproduction égal, plus courte sera la durée de ponte, plus grande sera la part de nourriture assimilée, utilisée en sa faveur et donc plus petite celle employée pour la croissance somatique ; à la limite, elle ne couvrira plus que les pertes métaboliques, l'accroissement de longueur devenant nul. A 25°C et 20°C, les taux de reproduction étant très voisins (tableau 6), il est vraisemblable que la durée de ponte intervient pour diminuer la taille du lot à 25°C, mais pas suffisamment cependant pour expliquer le très grand écart de taille avec les sangsues à 20°C, écart

que nous attribuons essentiellement à la température. A 10°C, le problème se pose différemment, le taux de reproduction est plus faible et la ponte répartie sur un temps plus long ; dans ce cas nous pouvons concevoir qu'une plus grande part de la nourriture assimilée est utilisée pour la croissance somatique et donc expliquer ainsi la grande taille finale. Dans cette hypothèse, le blocage de la ponte serait très favorable à l'accroissement de taille. C'est ce que montre l'examen des figures 7 et 8. Les lots dont les croissances linéaires sont représentées par les figures 15 à 18, apportent un argument dans le même sens, bien que le résultat final ne soit pas statistiquement significatif, l'élevage n'ayant pu être conduit au-delà du début de la ponte. En outre, des différences d'ordre métabolique interviennent très certainement sur la croissance somatique et la maturation génitale.

L'ensemble de ces observations nous incite à penser, comme TEREKHOV, que la grande croissance hivernale est sous la dépendance du blocage de l'activité reproductrice, blocage contrôlé par la durée d'éclairement et la température.

#### 5 - ETUDE EXPERIMENTALE DE L'INFLUENCE DE LA NUTRITION

*P. geometra*, comme beaucoup d'autres sangsues, est connue pour sa grande résistance au jeûne (plus de 6 mois, KEYSSELITZ, 1906). L'influence du jeûne total sur la croissance n'a pas été étudié ; par contre, le problème qui se pose en élevage est le risque d'une éventuelle sous-alimentation. En effet, nous ne mettons en général qu'un seul poisson par aquarium et l'importance numérique de la population (25 environ) pourrait jouer un rôle en limitant la part de chacun.

Les figures 19 à 22 montrent que dans les conditions d'élevage, ce facteur ne semble pas jouer de rôle, les différences de taille entre les trois lots en fin d'expérience n'étant pas significatives.

Un autre problème se posant en élevage est celui de l'influence de la fréquence de l'alimentation sur la croissance. Après différents essais, il nous a semblé préférable, dans un but de simplification, de ne pas laisser en permanence un poisson dans l'aquarium contenant les sangsues. Nous avons essayé de trouver un compromis entre la fréquence optimale pour les animaux et les nécessités expérimentales. Une fréquence de l'ordre de 3 à 4 jours a l'inconvénient de ne pas permettre un synchronisme de la nutrition des sangsues, certaines d'entre elles n'ayant pas fini de digérer le repas précédent et de nous donner par conséquent des animaux à des stades variés d'activité, rendant toute mesure impossible. Nous avons pris comme repère pour une réalimentation, l'arrêt de la ponte (Figs 6 et 7) ; dans ce cas, les animaux subissent une période de jeûne d'un minimum de 24 à 48 heures. Ce jeûne est

supprimé en nourrissant les piscicoles régulièrement tous les sept jours (Figs 10 à 13) ; la ponte ne cesse que pendant la durée du repas. La comparaison des résultats de ces deux séries expérimentales, réalimentation après arrêt de la ponte (Fig. 9) et nutrition tous les 7 jours (Fig. 14) montre que les tailles maximales sont plus élevées dans la deuxième. Une différence de nutrition pourrait expliquer d'une part que la taille atteinte par les individus du lot de la figure 13 soit plus élevée que celle des sangsues maintenues à la même température (Fig. 8) et chez lesquelles la ponte est bloquée ; d'autre part, que la taille critique à atteindre pour la ponte soit plus faible dans la série ou l'arrêt du dépôt des cocons conditionne la réalimentation. Cette hypothèse demanderait cependant une étude expérimentale plus complète. Par contre, chez *P. geometra*, l'allure générale de la courbe de croissance est conditionnée par le mode de nutrition. En effet, comme nous l'avons vu précédemment (Fig. 1), cette espèce ne prélève en moyenne que 40 % de son poids initial ce qui est peu comparativement à d'autres sangsues hématophages. Par exemple, *H. medicinalis* prend 6 à 10 fois son poids (DALES, 1963), *T. tessulatum*, parasite d'oiseaux aquatiques, 10 fois (Fig. 23) ; de ce fait la croissance se fait par bonds successifs (Fig. 24), un temps très long pouvant séparer les repas qui sont peu nombreux (3 au cours de la vie de *T. tessulatum*). Chez *P. geometra*, la digestion est rapide et les repas très nombreux. De ce fait la croissance est plus régulière que celle des sangsues précédentes. Deux hypothèses pourraient être émises pour expliquer cette différence, d'une part le pouvoir nutritif du sang de poisson peut être moindre par rapport à celui des vertébrés supérieurs, d'autre part, une adaptation à une plus grande facilité de rencontre d'un hôte adéquat. Autant il semble aisé en effet de trouver un poisson dans un étang, autant il est aléatoire pour *Theromyzon* d'avoir la possibilité de s'introduire dans les voies respiratoires supérieures d'un oiseau, ou encore pour *H. medicinalis* de faire un repas de sang de Mammifère (cette sangsue peut s'attaquer cependant à d'autres Vertébrés, comme les Batraciens ; mais il semble qu'un repas de sang de Mammifère soit nécessaire pour qu'elle puisse se reproduire (HERTER, 1937).

Ce mode de nutrition inhérent au groupe parasité semble confirmé par l'examen de la croissance d'*H. marginata* (Fig. 25), sangsue appartenant à la famille des *Glossiphoniidae* et s'attaquant également aux poissons. L'animal se nourrit en effet chaque fois qu'il en a la possibilité, avec cependant des prises de nourriture pouvant quelquefois atteindre deux fois le poids du corps.

## 6 - ANALYSE MATHÉMATIQUE DE LA CROISSANCE

L'intérêt que présentent les données quantitatives relatives à la croissance dans l'estimation de la productivité des populations animales, nous a incité à rechercher les règles mathématiques régissant celle de *P. geometra*. Peu de données existent actuellement à notre connaissance sur l'importance des Hirudinées dans la productivité secondaire des eaux douces. Elle n'est cependant pas négligeable comme le montrent les deux résultats suivants :

- BENNIKE (1943) trouve 695 sangsues par m<sup>2</sup> dans un ruisseau avec prédominance des espèces suivantes : *G. heteroclita* (148), *H. stagnalis* (267) et *E. octoculata* (245), alors que sur la même surface les autres Invertébrés sont représentés par 1964 individus (Oligochètes, 170 ; Turbellariés, 415 ; Gastropodes, 126 ; Aselles, 897 ; *Hydracnidae*, 30 ; Insectes, 316) soit 35 % des organismes du milieu.

- DADIKYAN (*in* WINBERG, 1971) estime la biomasse annuelle des Invertébrés du Lac Sevan à 2998 t pour les Oligochètes, 976 t pour les larves de chironomides, 383 t pour les sangsues (dont 45 t consommées par les poissons), 56,1 t pour les Trichoptères et 16,4 t pour les Mollusques.

### a - Méthode d'étude

Nous nous sommes référé pour cette étude aux manuels de GULLAND (1969) et WINBERG (1971)\*. Deux équations de croissance ont été testées, celle de Gompertz et celle de Von Bertalanffy. Elles sont connues pour leur adaptation à de nombreuses données de croissance. La première donne pour *P. geometra* une courbe ne se superposant aux données expérimentales que pour les valeurs les plus élevées de la taille. C'est avec la deuxième que s'observe la meilleure superposition entre les données théoriques et expérimentales. Cette équation de Von Bertalanffy s'appliquant à la taille s'écrit de la façon suivants :

$$l_t = l_{\infty} [1 - e^{-K(t-t_0)}]$$

t = âge exprimé en jours

t<sub>0</sub> = temps hypothétique auquel l'animal aurait une longueur nulle

l<sub>∞</sub> = taille maximale atteinte quand le taux de croissance est nul

K = constante expérimentale de la croissance, indiquant la vitesse à laquelle la taille se rapproche de la valeur l<sub>∞</sub>.

Nous n'avons pas jugé utile de rechercher une autre équation de croissance que celle de Von Bertalanffy car elle donne un bon modèle

---

\* Monsieur A. SOUPLET, chercheur contractuel à Lille I (Equipe CNEXO-Wimereux) nous a apporté une aide particulièrement efficace pour cette partie de notre travail. Nous l'en remercions très vivement.

d'étude de la dynamique d'une population dans une optique de recherche de la productivité des eaux du même type que pour les poissons (GULLAND, 1969). L'estimation des constantes de croissance a été faite en partant soit de valeurs mesurées sur les courbes précédentes (Figs 6 à 8) à intervalles de temps réguliers de 7 jours, soit à partir de valeurs réelles (Figs 10 à 13). Les calculs sont faits avec le calculateur programmable Hewlett-Packard 65.

$l_{\infty}$  et  $K$  sont déterminés graphiquement par analyse de la courbe de Ford-Walford qui est l'expression de  $l_t + l$  en fonction de  $l_t$ . C'est une droite de pente  $e^{-K}$  qui coupe la bissectrice des axes de coordonnées (quand  $l_t = l_t + l$ ) au point d'abscisse  $l_{\infty}$ .

$t_0$  est calculé à partir de la formule suivante :

$$t_0 = t + \frac{1}{K} \cdot \text{Log} \frac{(l_{\infty} - l_t)}{(l_{\infty})}$$

comme il s'agit dans le cas présent d'une étude expérimentale, la date de naissance est connue et est prise comme origine des temps. La taille à la naissance a pu également être mesurée (elle est de 4 mm pour une sangsue au repos).

#### b - Résultats

L'analyse des données expérimentales nous a fourni les résultats consignés dans les tableaux 7 et 8.

Tableau 7 - Courbes de Ford-Walford

Durée quotidienne de la photophase	température	Equation de la droite $l_t + l = F (l)_t$	Coefficient de corrélacion
12 h	15°C	$l_t + l = 0,903 l_t + 2,727$	0,995
18 h	15°C	$l_t + l = 0,859 l_t + 3,262$	0,997
24 h	15°C	$l_t + l = 0,841 l_t + 2,786$	0,987
18 h	25°C	$l_t + l = 0,852 l_t + 4,567$	0,960
18 h	20°C	$l_t + l = 0,915 l_t + 3,925$	0,974
18 h	10°C	$l_t + l = 0,959 l_t + 1,899$	0,992
8 h	15°C	$l_t + l = 0,893 l_t + 3,480$	0,988

Tableau 8 - Constantes de l'équation de croissance.

Durée quotidienne de la photophase	Température	$l_{\infty}$ (mm)	K	$t_0$
12 h	15°C	28,120	0,102	- 1,504
18 h	15°C	23,085	0,152	- 1,252
24 h	15°C	17,555	0,173	- 1,045
18 h	25°C	30,792	0,161	- 0,864
18 h	20°C	46,370	0,088	- 1,025
18 h	10°C	45,940	0,042	- 2,157
8 h	15°C	32,480	0,113	- 1,163

La représentation simultanée des courbes théoriques et expérimentales (Figs 26 à 32) montre que l'équation de Von Bertalanffy donne une bonne expression mathématique de la croissance de *P. geometra* notamment en ce qui concerne les basses températures (15°C et 10°C). Pour les températures plus élevées (20°C et 25°C, Figs 29 et 30) la courbe de Von Bertalanffy se superpose manifestement à une courbe expérimentale qui n'a pas la même allure puisqu'elle a une forme en S (partie gauche d'une parabole). Bien qu'il n'y ait aucune raison biologique de ne pas rechercher une formule mathématique cadrant mieux avec les résultats expérimentaux, il ne nous a pas semblé utile de le faire puisque toute utilisation ultérieure, notamment dans les calculs de productivité, passe par l'emploi d'une formule simple comme celle de Gompertz ou Von Bertalanffy. La comparaison des constantes à signification biologique met en évidence :

- en fonction de la durée de la photophase une corrélation négative pour  $l_{\infty}$  (Fig. 33) et positive pour K (Fig. 34). Les vitesses de croissance étant très voisines au début, ce sont les lots pour lesquels la taille maximale est la plus faible qui l'atteindront le plus vite. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, ces résultats sont probablement à attribuer à d'autres facteurs que la durée de la photophase.

- en fonction de la température, une corrélation positive pour K (Fig. 36). La vitesse de croissance augmente avec la température. Par contre, la taille maximale (Fig. 35) est très voisine pour les températures de 20°C et 10°C et beaucoup plus faible à 25°C, ce qui indique bien un effet inhibiteur des températures élevées sur la croissance.

## 7 - CONCLUSIONS

La croissance de *P. geometra* est soumise à l'influence de nombreux facteurs :

- la température intervient en accélérant la croissance. La taille atteinte par les sangsues à 20°C et 10°C est sensiblement la même, par contre elle est beaucoup plus faible à 25°C.

- la lumière interviendrait soit en perturbant le métabolisme (24 h d'éclairage) soit en agissant sur l'activité reproductrice. Les sangsues ne se reproduisant pas atteignent des tailles supérieures à celles qui déposent des cocons.

- la fréquence de l'alimentation pourrait intervenir sur la taille maximale, une répétition de jeûnes de faible durée pouvant la diminuer.

L'ensemble de ces conclusions nous fait interpréter les variations de taille de *P. geometra* au cours du cycle annuel de la manière suivante :

- la génération d'hiver atteint une grande taille à la suite d'une part du blocage de la ponte dû à la photopériode, d'autre part au fait que les basses températures interviennent peu sur les croissances maximales.

- les générations d'été sont de plus petite taille sous l'action conjointe des températures élevées et d'une orientation du métabolisme vers la production de cocons.

Quel est l'intérêt biologique de ces variations de taille ?

L'hypothèse la plus vraisemblable est qu'une grande taille permet un taux de reproduction beaucoup plus élevé, ce qui est particulièrement avantageux pour l'espèce au sortir de la période difficile qu'est l'hiver. Il est en effet bien connu que chez la plupart des animaux, ce sont les femelles de plus grande taille qui ont le taux de reproduction le plus élevé (WINBERG, 1971). Nous avons en effet pu constater que les *P. geometra* récoltées en mars peuvent pondre entre 30 à 50 cocons entre deux repas consécutifs alors que dans les mêmes conditions les générations d'été n'en déposent que 5 à 10.

Une autre hypothèse, n'excluant pas la précédente pourrait cependant être émise. *P. geometra* est une espèce très exigeante en oxygène (MANN, 1956), or une plus petite taille est un avantage en été, période où les eaux peuvent être déficitaires en oxygène, la surface corporelle étant relativement plus importante. MANN (1961) explique de cette manière l'adaptation de *H. testacea* aux eaux stagnantes peu oxygénées, cette espèce se reproduit une seule fois au début de l'été ; les adultes meurent et les juvéniles de petite taille sont les seuls à subsister pendant cette saison défavorable.

Une expression satisfaisante de la croissance de *P. geometra* est donnée par l'équation de Von Bertalanffy.

### III - ÉTUDE HISTOLOGIQUE DE LA MATURATION GÉNITALE

Nous envisagerons successivement, l'anatomie de l'appareil génital, la fonction femelle et la fonction mâle.

#### A - ANATOMIE DE L'APPAREIL GENITAL DE P. GEOMETRA

Une bonne description a été donnée par BRUMPT (1900b) dont nous avons repris le schéma (Fig. 37). Les testicules, de forme sphérique, au nombre de 6 paires, sont répartis sur deux lignes ventrales de chaque côté du corps, à raison d'une paire par somite, dans les segments 13 à 18. De chaque côté ils sont tous reliés par un court canal efférent à un tube collecteur : le canal déférent qui, après un parcours dans la musculature de la paroi du corps devient libre dans la cavité générale à la limite des segments XII et XIII ; il y décrit plusieurs boucles et s'hypertrophie en période d'activité génitale pour former une longue vésicule séminale. Au niveau du segment XI il reçoit les produits de sécrétion des nombreuses glandes atriales. On lui donne alors le nom de canal éjaculateur. Les canaux éjaculateurs droit et gauche se réunissent pour former un court tube commun qui débouche à l'extérieur au niveau du pore génital mâle (segment XI) (Fig. 38). La fonction femelle est assurée par deux ovisacs, allongés, qui peuvent atteindre, dans leur plus grande dimension, la deuxième paire de testicules. Ils sont prolongés en avant par deux courts oviductes qui se réunissent en un canal commun s'ouvrant à l'extérieur à la face ventrale du XIIe somite. Au niveau du tiers antérieur, ils sont reliés par un court canalicule à une masse cellulaire compacte : le tissu vecteur, reposant lui-même sur une surface de l'épiderme ventral différenciée en aire copulatrice (Fig. 39).

Nous allons décrire plus en détail ces différents appareils dont l'étude histologique a été abordée par BRUMPT (1900b).

#### B - LA FONCTION FEMELLE

##### 1 - L'OVOGENESE

##### a - Résultats

Elle a été étudiée en microscopie photonique chez *P. geometra* par JØRGENSEN (1913). Les différentes phases ont été décrites et

représentées d'une manière remarquable par cet auteur. La microscopie électronique nous a permis d'apporter des éléments nouveaux en ce qui concerne les enveloppes folliculaires et la cytologie ovocytaire.

A la naissance, chaque ovaire est formé d'un amas de protogonies, facilement reconnaissables à leur noyau volumineux pourvu d'un nucléole important et de gros granules de chromatine (Figs 40 et 41). Elles sont entourées par l'enveloppe ovarienne. La multiplication très active des cellules de cette dernière conduit à l'apparition d'une cavité dans laquelle vont flotter les follicules en croissance, des phagocytes de très petite taille et, après la fécondation, de nombreux spermatozoïdes. Pendant toute la période de reproduction de la sangsue, il va persister à l'intérieur de l'ovaire un groupe d'ovogonies appelé cordon germinatif, au niveau duquel on observe des mitoses tant que les conditions sont favorables (nutrition essentiellement). Il donne naissance à des amas arrondis de 10  $\mu$  environ de diamètre formés de 5 à 10 cellules et qui seront libérés dans la lumière ovarienne (Fig. 42). Deux à cinq cellules externes de ce groupe enveloppent les autres qui seront à l'origine de l'ovocyte et des cellules nourricières (Figs 42, 43, 46).

Les 4 ou 5 ovogonies situées au centre du follicule se multiplient activement mais d'une manière asynchrone (Figs 43, 46) ; généralement une seule cellule (rarement deux) est en mitose par groupe. Cette multiplication donne naissance à 50-60 cellules qui entrent simultanément en prophase de méiose (Fig. 47), et qui ont donc les caractères cytologiques d'ovocytes I. Cependant une seule d'entre elles possède une destinée germinale ; c'est la seule que nous appellerons ovocyte. Les autres remplissent le rôle de cellules nourricières. Au stade de prophase de méiose, le groupe, y compris ses enveloppes, mesure 25 à 30  $\mu$  de diamètre. En microscopie électronique nous observons des complexes synaptonématiques classiques et un centriole dans chaque cellule (Figs 47, 49). L'ensemble du groupe subit alors une croissance rapide jusqu'au début du diplotène où il atteint un diamètre de 40  $\mu$ . C'est pendant cette phase qu'apparaît au centre du follicule une masse cytoplasmique anucléée : le cytophore. Il est formé par l'accroissement du volume cytoplasmique de la zone à laquelle se rattachent toutes ces cellules par des ponts caractérisés par la présence d'un anneau sous-membranaire de matériel dense (Fig. 48). L'une des cellules subit alors une croissance bien plus importante que les autres, c'est le futur oeuf. Il se distingue donc dès cet instant des autres cellules dites nourricières (Figs 42, 43). Il s'accroît et atteint un diamètre de 50  $\mu$  environ (Fig. 44). A

l'issue de cette augmentation de taille il perd ses enveloppes, les cellules nourricières et le cytophore dégénèrent (Fig. 44) ; la fécondation aura lieu et, bloqué en métaphase de première division de maturation (Fig. 45), il sera prêt à être pondu.

Nous envisagerons successivement l'évolution des différentes parties.

$\alpha$  - Evolution cytologique de l'ovocyte

Jusqu'au début de la phase d'accroissement, elle se confond avec celle des cellules nourricières.

\* Le cytoplasme

L'extrême abondance de ribosomes et la présence de nombreuses mitochondries caractérisent toute l'ovogénèse de *P. geometra*. En prophase de méiose quelques lamelles annelées apparaissent mais elles sont transitoires (Fig. 50). Le futur ovocyte se distingue très tôt des cellules nourricières par le fait qu'il se couvre de villosités d'une hauteur de 0,2  $\mu$  environ (Fig. 51). Son accroissement se fait essentiellement par l'augmentation du nombre des ribosomes et des mitochondries. L'appareil de Golgi est bien représenté et élabore des granules denses d'un diamètre de 0,2  $\mu$  qui migrent vers la surface de l'ovocyte ; ils forment les granules corticaux (Figs 51, 52). A la fin de la phase d'accroissement, ils sont disposés régulièrement sous l'enveloppe ovocytaire dont les villosités sont reliées entre elles par du matériel dense (Fig. 52). C'est à ce stade (diamètre de 50  $\mu$ ) qu'a lieu la fécondation. Les réactions en sont tout à fait classiques :

- formation d'une "membrane de fécondation" (Fig. 53) à partir des villosités soudées entre elles et donnant en coupe tangentielle l'aspect d'un puzzle (Fig. 54).

- disparition des granules corticaux dont le contenu a probablement contribué à la formation de l'espace périvitellin.

La fin de l'évolution du cytoplasme ovocytaire se caractérise par une ségrégation des organites cellulaires : le réticulum endoplasmique et les mitochondries se concentrent dans une couche corticale d'une épaisseur de 8  $\mu$  (Fig. 55), le centre est occupé par des ribosomes. Nous avons également observé en fin de croissance, dans la couche corticale, quelques rares globules de matériel de réserve dont l'origine reste inconnue.

\* Le noyau ovocytaire

Au stade des complexes synaptonématiques, le nucléole de type granulaire est rejeté sur un côté du noyau (Fig. 49) ; il

présente un aspect assez mal défini, soit allongé (Fig. 49), soit plus ou moins globulaire avec des petites vacuoles (Fig. 47). C'est au début de la phase d'accroissement que le nucléole devient annulaire, aspect qu'il conservera jusqu'à la fin de l'évolution de l'ovocyte. Il atteint un diamètre de 6  $\mu$ , celui du noyau est alors de 22  $\mu$ . L'importance de la vacuole, contenant quelques particules denses de 150 à 200 Å, varie légèrement et dans certains cas cet organite peut se fragmenter. Toutes ces modifications du nucléole ont été bien décrites (JÖRGENSEN, 1913). A la fin de la croissance ovocytaire, il diminue de volume (diamètre 3,6  $\mu$ ) et disparaît lorsque le noyau sera en métaphase de première division de maturation, probablement induite par la pénétration du spermatozoïde.

#### β - Evolution des cellules nourricières

A leur maximum de taille, c'est-à-dire au début de l'accroissement ovocytaire, les cellules nourricières ont un diamètre de 10  $\mu$ . Contrairement à l'ovocyte, elles ne portent jamais de villosités.

##### \* Le cytoplasme

Très riche en ribosomes et mitochondries, il donne naissance à des formations similaires aux granules corticaux de l'ovocyte. L'évolution des cellules nourricières diverge de celle de l'ovocyte à la fin de la phase d'accroissement, stade à partir duquel nous allons observer leur dégénérescence progressive dont les premiers signes résident dans une importante vacuolisation (Fig. 59).

##### \* Evolution nucléaire

L'évolution du nucléole des cellules nourricières est très différente de celle de l'ovocyte. Au début de la phase d'accroissement il est annulaire (Fig. 56), puis vers la fin il prend un aspect réticulé (Fig. 57) et enfin commence sa désagrégation tout d'abord par émission de bras plus ou moins importants (Fig. 58) puis par dislocation en 3 ou 4 nucléoles fils d'aspect très ramifié (Fig. 59). Ce nucléole est très riche en matériel granulaire d'un diamètre de 150 Å environ.

#### γ - Evolution des cellules folliculaires

Nous étudierons séparément les 2 à 5 cellules folliculaires externes, de structure et d'évolution identiques, et la cellule folliculaire interne très différente.

##### \* Cellules folliculaires externes

Elles sont en nombre variable, 2 à 5, et sont issues des cellules les plus externes de l'amas qui s'est isolé au sein des ovogonies. Dès le début de l'évolution du follicule, elles sont reconnais-

sables à leur cytoplasme clair et à l'absence de gros nucléole (Fig. 46). Elles sont emboîtées les unes dans les autres sans liaisons particulières. Une couche de matériel dense se différencie sur leur surface externe ; son épaisseur s'accroît en direction centripète (Figs 60 et 63) : 300 Å sur la cellule la plus externe et 1200 Å sur la plus interne. Chacune de ces cellules folliculaires a une épaisseur de 0,5 à 0,6  $\mu$ . Leur cytoplasme contient de nombreux ribosomes, des mitochondries et un appareil de Golgi actif. Leur noyau, très allongé, peut atteindre une longueur de 20  $\mu$  pour une largeur de 3  $\mu$  (Fig. 61). Ces cellules dégénèrent précocement au cours de la croissance ovocytaire, en commençant par la plus externe. Nous observons une disparition totale du contenu cellulaire (Fig. 63). Ne subsiste finalement que la couche dense externe. La dégénérescence est complète quand l'ovocyte a atteint les trois quarts environ de sa taille définitive. La croissance ultérieure de l'ovocyte se fait en l'absence de ces cellules folliculaires.

\* La cellule folliculaire interne

Dès le début de la formation du follicule, l'une des cellules a une évolution très particulière. Elle se manifeste tout d'abord par une croissance rapide du noyau qui acquiert une taille de 25  $\mu$  x 15  $\mu$  (Figs 47 et 60), dimensions qui ne seront atteintes et dépassées que par celles du noyau de l'ovocyte. Dans cette cellule folliculaire le noyau est très riche en matériel nucléolaire disséminé en amas plus ou moins importants (Fig. 60). A partir du moment où commence la croissance ovocytaire proprement dite il régresse progressivement. Cette cellule est également remarquable par son cytoplasme. Très réduit autour du noyau, il forme une couche continue épaisse de 2 à 3  $\mu$  autour de l'ovocyte et des cellules nourricières entre lesquelles il envoie des prolongements (Fig. 47). Cette cellule montre comme les autres cellules folliculaires, une assez grande richesse en ribosomes, mitochondries et dictyosomes (Fig. 61). Sa caractéristique essentielle réside dans le fait qu'elle paraît traversée par tout un réseau de canalicules (Figs 60, 61 et 62). Ces derniers de diamètre très variable s'ouvrent par une portion rétrécie de 800 Å au sommet de villosités de 0,8  $\mu$  environ de hauteur, au contact de la cellule folliculaire contiguë (Fig. 62). Vers l'intérieur, leur développement donne un aspect très vacuolisé (Fig. 60) au cytoplasme, ce qui explique certaines figures observées en microscopie photonique où le noyau paraît isolé de la cellule folliculaire comme sur la figure 43. Nous n'avons pu cependant établir avec certitude la continuité de ce réseau. C'est dans cette cellule que l'on rencontre le plus souvent des globules de matériel de réserve à la fin de la croissance ovocytaire (Fig. 64).

b - Discussion

Les Hirudinées se séparent en deux grands groupes en ce qui concerne l'ovogenèse :

- Hirudinées de la famille des *Glossiphoniidae* chez lesquelles le développement de l'embryon se fait uniquement aux dépens des réserves vitellines de l'oeuf qui est de grande taille. Les oeufs sont généralement pondus dans un cocon à parois minces, transparentes, sécrété par les glandes clitelliennes et qui ne joue qu'un rôle protecteur.

- Toutes les autres Hirudinées (Gnathobdelles, Pharyngobdelles et Rhynchobdelles *Piscicolidae*) pondent de petits oeufs ne contenant pas ou peu de vitellus. L'embryon se développe en utilisant les sécrétions des glandes clitelliennes déversées dans le cocon.

Seul le premier type d'oeuf a été l'objet de recherches en microscopie électronique. Une seule espèce a été étudiée : *G. complanata* (DAMAS, 1977 ; EISENSTADT, 1964, 1965, 1967). GINZBURG (1966, 1967) y a suivi l'incorporation de produits marqués au cours de la croissance ovocytaire.

Pour le deuxième type, notre étude est la première qui ait été effectuée en microscopie électronique. Des observations ont cependant été faites sur *H. sanguisuga* (MANN, 1954), *B. torpedinis* (PEREZ, 1907), *P. geometra* (JÖRGENSEN, 1913) et une *Piscicolidae* non déterminée parasite de *Gadus macrocephalus* (HEATH, 1925) en microscopie photonique. Par rapport aux autres familles d'Hirudinées, l'ovogenèse des *Piscicolidae* se caractérise par une libération précoce des follicules par le cordon germinatif. Elle ne s'observe qu'à la fin de la croissance chez *G. complanata* (DAMAS, 1977) et *E. octoculata* (VAN DAMME, 1974). Une autre différence réside dans l'absence de polarisation du cordon germinatif alors qu'il en existe une, longitudinale, chez *E. octoculata* (VAN DAMME, 1974). Cet auteur observe chez cette espèce, à partir de la zone apicale, des ovogonies en multiplication, puis des ovocytes en préméiose et enfin la zone d'accroissement ovocytaire. Il signale en outre la présence dans l'ovaire d'une cellule multipolaire dont le rôle reste inconnu. JÖRGENSEN (1908) lui attribue un rôle de soutien et la compare à la cellule de Verson des Insectes.

En ce qui concerne l'ovogenèse elle-même, plusieurs points retiennent l'attention chez *P. geometra* :

- . La formation du follicule et la multiplication des ovogonies,
- . la cytologie ovocytaire,
- . la fécondation,

- . les cellules nourricières,
- . les cellules folliculaires.
- Formation du follicule et multiplication des ovogonies

La formation des follicules de *P. geometra* comparée à celle de *B. torpedinis* (PEREZ, 1907 ; observations personnelles en microscopie électronique) montre les différences suivantes :

- Chez *P. geometra*, isolement à partir du cordon germinatif d'un groupe important de cellules dont 3 à 5 contribueront à la formation des cellules folliculaires ; la multiplication des autres donnera naissance à l'unique ovocyte et aux cellules nourricières. Chez *B. torpedinis*, deux cellules seulement s'isolent ; l'une enveloppe l'autre, c'est la cellule folliculaire unique, l'autre sera la cellule mère de l'ovocyte et des cellules nourricières.

- Chez *B. torpedinis* l'ovocyte et les cellules nourricières issues d'une seule cellule forment un groupe isogénique dans lequel elles sont reliées à une masse cytoplasmique centrale anucléée : le cytophore ; elles se divisent d'une manière synchrone. Chez *P. geometra* la division des ovogonies est asynchrone. Par contre tous les ovocytes I (ovocyte proprement dit et cellules nourricières) entrent en prophase de méiose en même temps. Comment expliquer ce comportement différent dans le temps des cellules germinales femelles ? Il est actuellement admis que c'est la présence de ponts cytoplasmiques reliant entre elles toutes les cellules d'un groupe qui est à l'origine du synchronisme des divisions cellulaires. De tels ponts existent et nous les avons observés à partir du stade ovocyte I (Fig. 48). Ils peuvent expliquer le synchronisme de la prophase de méiose. Par contre, jusqu'à ce stade, toutes les ovogonies, probablement issues d'une même cellule mère, restent attachées les unes aux autres mais présentent des divisions asynchrones. Une telle évolution asynchrone des noyaux de cellules nourricières toutes reliées entre-elles a été observée chez *Drosophila melanogaster*. KING et BURNETT (1959) ont montré que la replication de l'ADN au cours des endomitoses successives n'a pas lieu en même temps pour toutes les cellules.

- L'ovocyte

Il est pratiquement alécithe. Un tel aspect est relativement rare dans le règne animal et ne se comprend ici que par l'existence d'un apport nutritif exogène pour l'embryon. Ce fait a une conséquence importante sur le développement embryonnaire puisque la larve développe très précocement un tube digestif rudimentaire lui permettant d'absorber les réserves nutritives du cocon (MANN, 1962).

La croissance de l'ovocyte comparée à celle des autres espèces ne comprend donc que le stade de prévitellogenèse. La vitellogenèse est pratiquement inexistante (les globules de matériel de réserve sont cependant nettement plus nombreux chez *B. torpedinis*). Le cytoplasme contient essentiellement des ribosomes et des mitochondries. Ces dernières se concentreront après la fécondation dans la couche corticale de l'oeuf. Une telle ségrégation n'est pas rare parmi les oeufs de *Spiralia* (HUEBNER et ANDERSON, 1976). Elle est particulièrement nette chez *B. torpedinis*. Chez cette espèce, le centre de l'ovocyte est essentiellement formé de ribosomes. Cette richesse en ribosomes est fréquente dans le règne animal. Les oeufs en sont pourvus d'une quantité énorme dotant ainsi l'embryon d'importants moyens desynthèse protéique et d'un stock de matériaux qu'il n'aura pas besoin de renouveler avant une étape très tardive de l'embryogenèse (DENIS, 1977).

Les résultats d'études d'incorporation de produits marqués chez *G. complanata* ont montré que le noyau de l'ovocyte était très actif pendant la croissance (GINZBURG, 1967) et que celle-ci était accompagnée d'une intense accumulation d'ARN (GINZBURG, 1966). Cette activité de synthèse d'ARN du noyau ovocytaire est soulignée :

- par l'existence pendant toute la durée de la croissance d'un nucléole annulaire. BERTOUT (1972, 1973) a montré en effet chez l'Annélide Polychète *Nereis diversicolor* que la vacuolisation du nucléole était corrélative de synthèses ribonucléiques intenses ;

- par l'abondance des granules denses nucléolaires précurseurs probables de l'ARN ribosomal.

La membrane ovocytaire développe des villosités comme chez tous les *Spiralia*. Chez *P. geometra* et *B. torpedinis* elles sont particulièrement serrées; corrélativement, le matériel fibrillaire caractéristique de la membrane vitelline est peu abondant (Figs 52, 54).

#### - La fécondation

Chez *P. geometra* elle a lieu à l'intérieur de l'ovaire où l'on observe un grand nombre de spermatozoïdes après la copulation. Ils y constituent un véritable feutrage autour des follicules en évolution. La pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte I pourrait déclencher deux processus : 1) le soulèvement de la membrane vitelline et la formation d'un vaste espace périvitellin où le contenu des granules corticaux est déversé ;

2) la poursuite de la méiose jusqu'au stade de métaphase de 1ère division de maturation, où elle restera bloquée jusqu'à la ponte.

La fécondation chez *P. geometra* paraît donc très classique et du même type que celle de l'oursin. Nous la retrouvons chez la plupart des oeufs de *Spiralia* et notamment chez les Néréidiens (FALLON et AUSTIN, 1967 ; PASTEELS, 1966) avec cependant ici une différence importante : un blocage en métaphase de 1ère division de maturation.

#### - Les cellules nourricières

Ce sont des cellules qui ont des potentialités d'ovocytes I comme le montre le fait qu'elles entrent en prophase de méiose. Mais nous ignorons toujours pourquoi elles ne subissent pas toutes la même évolution ; seule l'une d'entre elles (exceptionnellement deux) donnera l'oeuf. Leur rôle est de produire de l'ARN et des mitochondries qui sont déversées dans le cytoplasme ovocytaire par l'intermédiaire du cytophore (HUEBNER et ANDERSON, 1976). Ces cellules permettraient à l'ovocyte d'accumuler des quantités considérables de ribosomes et d'ARN de transfert. D'autres groupes zoologiques ont résolu ce problème soit par amplification des gènes ribosomiques du RNA 28S et 18S (DENIS, 1977) dans l'ovocyte même chez les Amphibiens et les Poissons Téléostéens, soit par endomitoses des cellules nourricières chez *D. melanogaster* (KING et BURNETT, 1959). Dans ce dernier cas les ribosomes de l'ovocyte sont produits presque exclusivement par les cellules nourricières (DAPPLES et KING, 1970). L'évolution des cellules nourricières est pendant une période importante de leur croissance superposable à celle de l'ovocyte qui ne s'en différencie que par la taille et la présence de microvillosités. Leur destinée est cependant différente puisqu'elles sont appelées à disparaître. C'est ainsi que le nucléole montre un cycle d'activité bien caractéristique :

- . nucléole annulaire pendant les premiers temps de la croissance ovocytaire ;
- . nucléole globuleux mais vacuolaire ensuite ;
- . dissociation nucléolaire pendant la phase de dégénérescence. Une telle évolution à été observée chez *Nereis pelagica* (Annélide Polychète) par DHAINAUT (1972) et correspond à une orientation bien définie de la physiologie ovocytaire. Les premières phases correspondent certainement à une activité synthétique importante d'ARN, visualisée notamment par la présence du matériel granulaire ; les autres à une réduction de cette activité puis à une dégénérescence.

#### - Le cytophore

Il n'a probablement pas d'activité de synthèse. Son rôle pourrait se borner à recevoir les productions des cellules nourricières,

mitochondries et ribosomes et à les transmettre à l'ovocyte. Il n'y a pas lieu d'envisager un rôle actif du cytophore dans ce transfert. Chez les Oligochètes toutes les cellules attachées au cytophore évoluent en ovocytes ; il n'y a donc pas ou peu de passages d'organites d'une cellule à l'autre par son intermédiaire comme le montre son contenu très pauvre en mitochondries et ribosomes (CHAPRON et RELEXANS, 1971).

Le cytophore dégénère en même temps que les cellules nourricières.

#### - Les cellules folliculaires

Leur rôle est vraisemblablement de puiser les éléments nutritifs du liquide ovarien dans lequel elles baignent et de les céder ensuite à l'ovocyte et aux cellules nourricières. L'aspect très particulier des cellules folliculaires externes avec leur couche dense et l'absence de figures d'endocytose laisse supposer que l'absorption se fait par toute la surface et ne concerne que de très petites molécules. Ces produits, après avoir probablement subi des transformations au cours de leur passage de cellule en cellule, arrivent à la plus interne chargée de les répartir aux cellules germinales centrales du follicule. Un argument en faveur d'un tel rôle des cellules folliculaires externes est fourni par l'absence de villosités sur la cellule folliculaire interne au niveau d'une zone située en face d'un noyau où un passage de substances est peu probable (Fig. 61). Nous n'avons pas observé, d'autre part, d'autres possibilités pour le cheminement des éléments nutritifs de l'ovocyte comme par exemple des passages inter-cellulaires. Comme nous l'avons décrit précédemment, les cellules folliculaires externes dégénèrent avant la fin de la croissance ovocytaire. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette disparition :

1) changement des besoins nutritifs de l'ovocyte. La croissance nécessiterait à ce stade des produits moins élaborés et ceux-ci pourraient être puisés directement dans le liquide ovarien par la cellule folliculaire interne.

2) la croissance ovocytaire ne nécessite plus d'apport exogène et se fait grâce à l'utilisation des matériaux contenus dans la cellule folliculaire interne et les cellules nourricières devenues inutiles. Cette deuxième hypothèse nous semble la plus vraisemblable : d'une part, nous n'avons observé aucun changement dans l'activité synthétique de l'ovocyte ; d'autre part, la dégénérescence des cellules nourricières et folliculaires se fait manifestement au profit de l'ovocyte.

Le nombre élevé de cellules folliculaires observé chez *P. geometra* semble être courant chez les *Piscicolidae* puisque BRUMPT (1900b) l'a également remarqué chez *Pontobdella muricata* et *Cystobranchus*

*mammillatus*, *B. torpedinis* et l'espèce étudiée par HEATH (1925), avec une seule cellule folliculaire font figure d'exception.

Les cellules folliculaires existent chez toutes les Hirudinées étudiées mais leur importance est variable. Chez *G. complanata*, c'est une simple portion du revêtement péritonéal qui ne recouvre que partiellement l'ovocyte tant qu'il est attaché au cordon ovarien. Elles sont entraînées par l'ovocyte quand il est libéré dans la cavité ovarienne. Là elles finissent par l'entourer complètement (DAMAS, 1977).

Ce faible développement des cellules folliculaires est peut-être lié au fait que le rachis ovarien intervient d'une manière importante dans la croissance ovocytaire (DAMAS, 1964a, b, 1965a).

## 2 - LES GLANDES CLITELLIENNES

Chez *P. geometra* les glandes clitelliennes sommairement décrites par BRUMPT (1900b) sont unicellulaires et se répartissent sur toute la longueur du corps de l'animal. Leurs conduits peuvent atteindre quelques centimètres pour les glandes les plus postérieures et débouchent dans la zone clitellienne où les sécrétions qu'ils contiennent participent à l'élaboration des cocons.

### a - Différents types de glandes (MALECHA et PRENSIER, 1974)

Nous avons distingué quatre types de glandes débouchant dans la zone clitellienne.

Type 1 : Ce sont des glandes de faible taille ayant généralement 35  $\mu$  de diamètre, mais pouvant atteindre parfois 60  $\mu$  sur 45  $\mu$  (Fig. 67) dont la répartition déborde légèrement la zone clitellienne en arrière jusqu'au niveau de la 1ère paire de testicules (Fig. 72). Leur sécrétion est généralement uniformément dispersée autour du noyau, central, et se présente sous l'aspect d'amas de granules jointifs à l'intérieur d'une trame cytoplasmique. L'affinité de ces granules pour le bleu alcian laisse supposer l'existence d'un composé riche en mucopolysaccharides acides. L'étude en ultrastructure de ces granules d'un diamètre de 1,05  $\mu$  et de très faible densité aux électrons, révèle la présence d'un réseau fibrillaire très lâche (Fig. 73).

Type 2 : Ce type est représenté par des cellules particulièrement abondantes dans la région testiculaire, de 125  $\mu$  sur 55  $\mu$ , APS positives et fixant la fuchsine paralaldéhyde après oxydation permanganique (Fig. 68). De légères différences d'affinités tinctoriales, ainsi qu'une fonction différente, comme nous le verrons ultérieurement, nous ont amené à distinguer les glandes de type 2a, colorées en violet par la fuchsine paralaldéhyde, de celles de type 2b, bleues. Les premières se rencontrent de la ré-

gion préclitellienne au dernier segment testiculaire (Fig. 72). Les secondes sont essentiellement concentrées dans les métamères 9 et 10, leur nombre est par contre peu élevé dans les premiers métamères post-clitelliens.

En microscopie électronique, la sécrétion de type 2a, formée de granules pouvant atteindre  $1,7 \mu$  de diamètre, présente une structure fibrillaire très nette et des zones plus denses aux électrons se répétant avec une périodicité de  $1\ 500 \text{ \AA}$  environ (Figs 73, 75, 76).

Type 3 : Cellules glandulaires de grande taille ( $180 \mu$  sur  $110 \mu$ ) (Fig. 69) se répartissant sur toute la longueur de l'animal (Fig. 72). Leur sécrétion est formée de gros granules ( $1,9 \mu$ ) très légèrement APS positifs et très denses aux électrons (Fig. 73), pouvant présenter quelquefois une zone externe beaucoup moins dense (Fig. 79). Ces deux types de granules rencontrés dans des cellules différentes expliquent certainement la légère différence d'affinité tinctoriale scindant chez certains individus le type 3 en deux. Ces deux catégories de granules se retrouvent au niveau de la zone clitellienne. Il ne semble donc pas qu'il s'agisse de deux étapes dans l'élaboration d'un même type de sécrétion.

Type 4 : Cellules ayant la même taille que les précédentes et la même répartition (Fig. 72) avec cependant une densité de plus en plus faible au fur et à mesure que l'on progresse de la partie postérieure vers la partie antérieure de l'animal. En microscopie photonique leur sécrétion est homogène (Fig. 70) et APS fortement positive. L'étude au microscope électronique révèle cependant sa structure granulaire. Ce sont des granules de taille variable, les plus gros ayant  $0,4 \mu$  de diamètre et étant formés d'une à trois couches concentriques plus ou moins bien individualisées de matériel dense (Figs 73, 80, 99). L'étude de leur formation montre qu'il s'agit de vésicules remplies de sécrétion s'enroulant les unes autour des autres. L'utilisation de la technique à l'acide périodique - thiocarbohydrazide - protéinate d'argent (THIERY, 1967), révèle l'existence d'hydrates de carbone qui réagissent assez rapidement avec la T.C.H. (début de marquage après 1 h de traitement).

La taille des types 2, 3 et 4 se réduit progressivement au fur et à mesure que l'on s'approche du clitellum où arrivent leurs très longs canaux groupés en 4 paires de faisceaux disposés contre la musculature pariétale et séparés par les muscles dorso-ventraux (Fig. 65). Chacun de ces faisceaux est formé par les canaux de tous les types cellulaires. Nous n'avons jamais observé de corps cellulaires des types 2, 3 et 4 au niveau du clitellum où débouchent leurs canaux excréteurs. Ils commencent seulement à être représentés en très petit nombre sur la ligne médiodorsale du 12e métamère.

Outre les quatre types cellulaires dont les canaux aboutissent à la région clitellienne, nous avons observé, dans la zone préclitellienne, des glandes dont le cycle d'activité se superpose aux précédentes et qui débouchent directement au niveau de l'épiderme de cette partie du corps. Ces cellules, de taille voisine de celle de type 1 (40  $\mu$  sur 30  $\mu$ ) (Fig. 71), s'en distinguent par une sécrétion formée de granules bien séparés en microscopie photonique, de 0,75  $\mu$  de diamètre et moyennement denses aux électrons (Fig. 81).

Leur nature chimique semble varier légèrement suivant leur position topographique ; en effet, on passe, après utilisation de la méthode au bleu alcian - APS, d'une coloration rouge près du clitellum à une teinte bleu violacé dans la région antérieure.

Tous les différents types cellulaires précédents possèdent, outre les caractères spécifiques de leur localisation et de leur sécrétion, un certain nombre de points communs qui sont d'ailleurs propres à la majorité des cellules glandulaires exocrines :

- d'une part l'existence d'un cytoplasme très riche en réticulum endoplasmique de type granulaire (Fig. 77), présentant très fréquemment des zones de dilatation importantes (Fig. 78). Ce réticulum doit participer avec l'appareil de Golgi (Fig. 80) à l'élaboration de granules de sécrétion tous entourés d'une membrane selon un schéma devenu maintenant classique.
- d'autre part, la présence, dans les conduits très longs de ces cellules, d'un manchon de microtubules (Figs 74 et 81) comme cela a déjà été observé par A.W. CLARK (1965) chez *Helobdella stagnalis* et *Macrobdella decora*. Cet auteur formule plusieurs hypothèses pouvant expliquer la présence de ces structures. Celle qui nous paraît la plus vraisemblable est la liaison entre l'activité des microtubules et la migration des granules de sécrétion. Comme on l'admet généralement, ces microtubules régulent en effet les mouvements intracytoplasmiques.

#### b - Répartition des orifices sécréteurs des différents types de glandes au niveau du clitellum

Les conduits des glandes de type I à IV débouchent au niveau du clitellum par des pores de structure très caractéristique (Figs 83, 84, 85). Ils ont un diamètre de 1  $\mu$  environ et un diaphragme très net, formé, comme le montre la figure 85, par une évagination de l'épicuticule. La disposition des pores n'est pas quelconque et nous avons observé :

- une association pratiquement constante d'un orifice sécréteur d'une glande de type 2a avec celui d'une glande de type 3.

- l'absence de pores sur une bande ventrale s'étendant de l'orifice génital femelle (Fig. 82 et 86) jusqu'en avant de l'orifice génital mâle. C'est seulement en avant du 11e métamère, et peut-être au niveau de la partie postérieure du 10e, qu'ils forment un anneau complet (Fig. 86).

- la répartition suivante des orifices glandulaires (Fig. 86) .
- . bord antérieur et postérieur du clitellum : type 2.
- . de chaque côté de la bande ventrale dépourvue de pores et bande dorsale : types 2a et 3.
- . parties latérales : types 2a, 3 et 4.
- . sur tout le clitellum (sauf la bande ventrale) pour le type 1.
- . entre le clitellum et la ventouse antérieure pour le type 5.

#### c - Formation du cocon

Elle a été décrite par BRUMPT (1900a, b) :

"L'individu qui va pondre se reconnaît de suite : son clitellum est turgescent, ses allures particulières, on voit qu'il cherche un endroit où il pourra effectuer sa ponte tranquillement. Cette place une fois choisie, la Piscicole se fixe par ses deux ventouses et s'applique contre les parois du bocal. La cuticule blanche formée par sa ceinture se détache peu à peu de la peau comme une vaste phlyctène annulaire. Elle la fait alors adhérer contre le verre et, lâchant son point d'appui antérieur, roule sur son axe en faisant des efforts qui semblent avoir pour but de décoller les adhérences de cette membrane au corps. De temps à autre elle se repose et laisse pendre son extrémité antérieure avec un air tout à fait épuisé. Quand l'animal juge que sa capsule est suffisamment fixée, il se retire de la façon suivante. Une onde de gonflement se produit d'arrière en avant et dilate l'orifice postérieur du cocon par où se dégage d'abord le clitellum ; l'extrémité antérieure du corps se retire alors en arrière, mais, au lieu de traverser simplement le cocon, elle entraîne avec elle l'extrémité correspondante de celui-ci qui s'invagine de façon que son orifice antérieur vienne au contact du postérieur ; à ce moment seulement le ver se dégage complètement. Ces phénomènes durent environ de cinq à six minutes et peuvent se suivre facilement, même à un examen superficiel. Au moment de l'invagination, la longueur du cocon est réduite de moitié et on voit une petite trace blanche persister au point qu'il a quitté. En trente ou quarante secondes il reprend spontanément sa forme et cela sans aucun secours de l'individu producteur. Après avoir pondu, la Piscicole s'éloigne de sa capsule et ne s'en inquiète plus."

L'utilisation du cinéma (film : "Biologie des sangsues")

nous a permis de vérifier cette description et d'en constater l'exactitude sauf sur un point. Au moment du dépôt du cocon, ce n'est pas l'extrémité antérieure de ce dernier qui s'invagine mais la postérieure à la suite du gonflement du corps qui apparaît dans cette région. Nous avons tenté de déterminer le rôle des glandes clitelliennes dans la formation du cocon et pour cela nous avons comparé en microscopie photonique et électronique ses différents constituants aux sécrétions des glandes.

d - Le cocon (Figs 87 à 92)

Oblong, il mesure 1,5 mm environ pour une masse de 0,2 mg (masse moyenne de 21 échantillons). Sa paroi externe est pourvue d'un réseau d'expansions foliacées (Fig. 90) d'où émergent des crêtes longitudinales caractéristiques de l'espèce (Fig. 88). Cette ornementation est parfaitement bien mise en évidence par la microscopie électronique à balayage. La face adhérent au support est lisse (Fig. 87). La région antérieure du cocon est caractérisée par la présence d'un opercule (Figs 89 et 91) qui tombera lors de l'éclosion (Fig. 92). Au centre de cet opercule, peu de temps après le dépôt du cocon, il est possible de voir la trace de l'orifice, maintenant oblitéré, par où le parent s'est dégagé (Fig. 89). A la naissance cette trace a disparu (Fig. 92).

L'examen de cocons en cours de formation (Fig. 93) et fraîchement pondus (Figs 94 à 95) nous renseigne sur l'origine des différentes parties. A l'extérieur nous trouvons une couche continue de nature muqueuse bien mise en évidence après coloration par le bleu alcian. Elle correspond aux sécrétions des glandes de type 1. En dessous, la paroi est formée de deux constituants, d'une part des amas irréguliers de 2 à 3  $\mu$  sur 0,5 à 1  $\mu$  dont les affinités tinctoriales et l'ultrastructure (Figs 94, 95, 97) indiquent qu'il s'agit des sécrétions des glandes de type 3. Ces amas sont cimentés par de fins tubules d'un diamètre de 200 Å (Figs. 97, 98). Ces derniers forment en outre une couche continue sur la face interne de la paroi (Fig. 97). Ils proviennent du déploiement ou de la réorganisation du contenu des granules de type 2a. Les enveloppes des granules participant à la formation de la paroi sont incorporées, mais en très petit nombre, dans celle-ci et contribuent à former une partie du contenu de ce cocon, par ailleurs essentiellement constitué par les sécrétions des glandes de type 4 (Figs 97, 99). A l'intérieur du cocon ces dernières présentent un aspect plus lâche que dans les cellules dont elles sont issues, ce qui confirme leur constitution à partir de deux ou trois vacuoles golgiennes superposées. L'opercule est formé de granules polyédriques, moyennement denses aux élec-

trons, de taille variable (jusqu'à  $1,7 \times 0,6 \mu$ ) et séparés les uns des autres par un espace clair de  $175 \text{ \AA}$  environ (Fig. 100). Il apparaît donc comme étant de nature très différente du reste de la paroi. Nous observons toujours au niveau de ses faces antérieure et postérieure une participation du matériel de la paroi à sa constitution.

#### e - Discussion

Il n'existe jusqu'à présent aucune étude sur l'ultrastructure des glandes clitelliennes des Hirudinées et leur rôle dans la formation du cocon. Quelques travaux ont été faits récemment chez les Oligochètes par FARNESI et VAGNETTI (1973), HESS et VENA (1974), RICHARDS (1977) et SUZUTANI (1977). C'est donc généralement avec les résultats obtenus dans ce groupe zoologique que nous confronterons les observations faites chez *P. geometra*.

#### α - Rôle des différents types cellulaires

\* Cellules de type 1 : elles sécrètent une substance riche en mucopolysaccharides acides et la structure des granules est très voisine des sécrétions muqueuses décrites dans d'autres groupes et notamment dans certaines cellules à mucus des Oligochètes (RICHARDS, 1975). Le manchon muqueux qu'elles forment autour du clitellum semble avoir un triple rôle : . permettre l'adhérence du cocon au support. Ce rôle est cependant généralement dévolu aux glandes de la ventouse antérieure chez les sangsues. Chez *E. octoculata* (BRUMPT, 1900b) et *Cystobranchus respirans* (HOFFMANN, 1956) la zone où sera déposé le cocon est nettoyée par la ventouse buccale qui y dépose ses sécrétions au rôle adhésif bien connu. Un tel comportement existe également chez *T. tessulatum* (observation personnelle). Nous ne l'avons pas observé chez *P. geometra*, mais s'il est très rapide, il nous a peut-être échappé.

. éloigner du clitellum toutes les souillures qui le recouvriraient. Elles se retrouveront dans la couche la plus externe du cocon. La partie interne de ce dernier sera au contact d'un clitellum rendu ainsi aseptique. KNIGHT et HUNT (1974) trouvent à la surface du cocon d'*Eryobdella* une couche dense flocculeuse de  $600 \text{ à } 800 \text{ \AA}$  contenant des bactéries mais ils l'attribuent à une production de ces organismes.

. réaliser un sac extensible dans lequel seront déversés les granules produits par les autres glandes.

\* Cellules de type 2a : elles donnent naissance aux fibrilles de la paroi du cocon. L'aspect de ces fibrilles est très voisin de celui observé chez *Enchytraeus* (HESS et VENA, 1974). Chez cette espèce,

comme chez *Lumbricillus rivalis* (RICHARDS, 1977), elles sont déjà bien visibles dans les granules où elles sont nettement séparées contrairement à ce qu'on observe chez *P. geometra* (Fig. 75). Le seul cocon étudié en microscopie électronique chez les Hirudinées est celui d'*E. octoculata* (KNIGHT et HUNT, 1974). Sa paroi, d'une épaisseur de  $0,7 \mu$ , est formée de fibrilles d'un diamètre de  $400 \text{ \AA}$  disposées parallèlement à la surface, généralement orientées longitudinalement et noyées dans un ciment moins dense. Chaque fibrille est formée de 2 à 6 unités de  $160 \text{ \AA}$  environ de diamètre et pourvues d'un centre dense de  $60 \text{ \AA}$ . Longitudinalement, elles présentent une alternance périodique ( $260 \text{ \AA}$ ) de bandes sombres et claires. Quand elles sont sectionnées transversalement le ciment paraît formé d'unités d'un diamètre de  $140 \text{ \AA}$  s'organisant en hexagones. Chez cette espèce la paroi est donc beaucoup plus dense et homogène que celle de *P. geometra* dans laquelle nous observons deux composants : des fibrilles issues des cellules de type 2a, cimentant des amas denses provenant de celles de type 3.

Le type 2a est l'équivalent du type G1 de *Branchiobdella pentodonta* (FARNESI et VAGNETTI, 1973), du type 1 de *Enchytraeus fragmentosus* (HESS et VENA, 1974) et des cellules granulaires de *L. rivalis* (RICHARDS, 1977).

\* Cellules de type 2b : l'observation en microscopie photonique de sangsues fixées au cours de l'élaboration du cocon nous montre qu'elles sécrètent un anneau au niveau du bord antérieur du clitellum. Cet anneau, placé entre le corps de la sangsue et la paroi, a les mêmes affinités tinctoriales que l'opercule. Cette observation, jointe à la localisation très précise des orifices excréteurs de ces glandes (Fig. 86) nous conduit à émettre l'hypothèse que l'opercule est formé par ces dernières. NAGAO (1957) pense que chez *E. lineata* les sécrétions de la ventouse buccale interviennent dans la fermeture du cocon.

\* Cellules de type 3 : elles donnent les amas denses de forme variable de la paroi (Fig. 97). Ceux de grande taille proviennent certainement de la coalescence de plusieurs granules cellulaires. Ce type de sécrétion ne semble pas avoir d'équivalent chez *E. octoculata*. L'existence au niveau du clitellum d'une bande ventrale dépourvue de pores glandulaires explique la nécessité des rotations du corps qu'effectue la sangsue au cours de la formation de la paroi du cocon. HOFFMANN (1956) note chez *C. respirans* le contact prolongé de la partie dorsale de la sangsue avec le support au cours de la ponte. Du côté ventral la paroi reste cependant beaucoup plus mince. Cette disposition nous apparaît comme un processus permettant une économie de matériel sur la face où le cocon est naturellement protégé par le support.

\* Cellules de type 4 : cette sécrétion constitue les réserves du cocon et est l'équivalent de celle des cellules à petits granules des Lumbricidés (GROVE, 1925 ; GROVE et COWLEY, 1927), du type G2 de *B. pentodonta* (FARNESI et VAGNETTI, 1973), du type 2 de *E. fragmentosus* (HESS et VENA, 1974) et des cellules globuleuses de *L. rivalis* (RICHARDS, 1977). La forme très particulière des granules observés chez *P. geometra*, ne se retrouve cependant pas chez ces espèces. Le contenu du cocon de la piscicole est vraisemblablement très riche au point de vue nutritif puisque l'oeuf est dépourvu de vitellus comme nous l'avons vu précédemment. Il réagit très fortement au PAS comme chez *E. foetida* (HERLANT-MEEWIS, 1958 - 1959). La rapidité du marquage par le PATAg (1 h) peut laisser supposer que c'est un corps relativement simple et facilement hydrolysable. Il s'agirait par contre d'un mucopolysaccharide acide chez *E. fragmentosus* (HESS et VENA, 1974) et chez *L. rivalis* (RICHARDS, 1977). La faible valeur nutritive du contenu du cocon de ces deux dernières espèces est compensée par l'abondance des réserves vitellines des oeufs (RICHARDS, 1977).

Dès que la paroi du cocon est achevée, la sécrétion des cellules de type 4 est déversée très rapidement. En même temps se fait la ponte d'un unique oeuf. BRUMPT (1900b) observe qu'*E. octoculata* expulse très brusquement le matériel nutritif dans le cocon ce qui lui fait admettre la possibilité d'une participation du liquide ovarien à sa constitution. Chez *P. geometra* l'examen histologique d'animaux sécrétant leur cocon montre très nettement que les conduits des glandes de type 4 sont distendus et remplis de matériel pendant que se façonne la paroi. Cette mise en attente au niveau du clitellum explique très facilement une expulsion rapide.

\* Cellules de type 5 : leur cycle d'activité se superpose à celui des autres glandes clitelliennes ce qui confirmerait l'hypothèse de BRUMPT (1900b) faisant intervenir la région préclitellienne dans l'élaboration de l'opercule du cocon. L'étude cinématographique de la ponte ne nous apporte aucun élément permettant d'étayer cette hypothèse. Cet échec peut évidemment s'expliquer par une sécrétion translucide invisible sur les images obtenues. Cependant l'étude histologique du cocon et de la ponte laisse supposer que l'opercule est essentiellement formé par les glandes de type 2b avec une faible participation de celles de types 2a et 3. Le fait que leur cycle d'activité soit identique à celui des glandes clitelliennes laisse prévoir une intervention au cours de la reproduction. L'hypothèse qui nous paraît la plus vraisemblable est celle de la sécrétion d'une phéromone intervenant peut être dans la reconnaissance des individus en vue de

la copulation. Des phéromones existent dans le mucus des Oligochètes ; elles ont soit une fonction d'alarme (RESSLER *et al.*, 1968 ; KRISHNAN et RAJULU, 1969 ; RATNER et BOICE, 1971), soit de répulsion vis-à-vis des prédateurs (RATNER et BOICE, 1971). RICHARDS (1974) émet l'hypothèse que les cellules muqueuses orthochromatiques des Lumbricidés sécrètent une phéromone sexuelle attractive.

Cette étude chez *P. geometra* met en évidence cinq types cellulaires intervenant dans l'élaboration du cocon. Ce chiffre est important si on le compare à celui enregistré chez les Oligochètes. Dans ce groupe il n'est généralement formé que de deux types cellulaires, l'un donnant la paroi, l'autre le contenu (GROVE, 1925 ; GROVE et COWLEY, 1927 ; FARNESI et VAGNETTI, 1973 ; HESS et VENA, 1974 ; RICHARDS, 1977). Le cocon est toutefois élaboré par trois sécrétions différentes chez *Tubifex* (HIRAO, 1965 ; SUZUTANI, 1977) comme chez l'Hirudinée *G. complanata* (GONDRAN, 1954).

$\beta$  - Evolution du cocon après le retrait de la sangsue

Lorsque *P. geometra* se retire du cocon, elle l'abandonne sans plus de soins. Il est alors le siège de plusieurs modifications :

\* fermeture des orifices antérieur et postérieur par resserrement des parois du cocon encore élastiques à ce stade. La trace de l'un d'entre eux est bien visible au centre de l'opercule (Fig. 96).

\* rétablissement de la longueur primitive. Elle était réduite de moitié et redevient spontanément normale en moins d'une minute. Ce phénomène est très important puisqu'il permet d'expliquer par un moyen mécanique le fait que le contenu semble imputrescible. L'hypothèse émise par BRUMPT (1900b) est la suivante : le clitellum est débarrassé de ses souillures par les premières sécrétions des glandes clitelliennes, sa formation se fait donc dans des conditions aseptiques, puis l'accolement des anneaux antérieur et postérieur isole son contenu lors du retrait de la sangsue. La deuxième partie de cette hypothèse est confirmée par l'observation de la ponte chez *P. geometra* et *E. octoculata* (BRUMPT, 1900b ; film "Biologie des sangsues") et par l'existence d'un cocon annulaire chez *B. torpedinis*. Chez les Oligochètes, la ponte se fait différemment et AVEL (1959) émet deux hypothèses pour expliquer la résistance aux actions bactériennes du contenu des cocons. Elle pourrait être "due à la composition propre de cette substance, ou à des sécrétions antibiotiques de l'épiderme de l'adulte". Comment se fait le retour à la longueur primitive du cocon ?

A ce stade, sa paroi est encore très élastique et lorsque le gonflement de la région post-clitellienne provoque l'accolement des deux anneaux, ce processus entraîne un étirement important de sa partie latéro-postérieure reliée à la face ventrale fixe car adhérent au support. Nous pouvons supposer que cette tension constitue un rappel mécanique suffisant pour provoquer la séparation des deux anneaux après le retrait de la sangsue. Chez *B. torpedinis* les cocons ne sont pas fixés à un support ce qui expliquerait leur forme annulaire.

\* Brunissement de la paroi du cocon : le cocon blanchâtre à l'origine subit dans les heures qui suivent son dépôt un brunissement intense. Il serait dû à la présence de fer (KNIGHT et HUNT, 1974).

\* Durcissement du cocon. Il est probablement dû à la réaction des granules entre eux et au contact de l'eau. Rien n'est connu en ce qui concerne ce mécanisme. La paroi est imputrescible comme celle des cocons des autres Hirudinées et des Oligochètes. On a admis pendant longtemps que sa nature était chitineuse. L'étude de KNIGHT et HUNT (1974) a montré chez *E. octoculata* que sa composition chimique était voisine des kératines. Ces auteurs ne confirment donc pas les observations de ZICK (1933) qui chez *H. medicinalis* avait conclu à une substance proche de la fibroïne du ver à soie.

\* Ornementation du cocon : elle est spécifique. Chez *C. respirans*, au lieu de présenter des lignes longitudinales marquées comme chez *P. geometra*, s'observe un véritable réseau (HOFFMAN, 1955). Le cocon des *Eripobdellidae* et des *Glossiphoniidae* est lisse. Un aspect spongieux se retrouve chez les *Gnathobdellae*. Dans ce groupe, cette structure pourrait jouer un rôle dans la rétention d'eau et empêcher ainsi la dessiccation de ces cocons pondus dans la terre (MANN, 1962). Un tel rôle ne semble pas devoir s'envisager pour *P. geometra* et les *Piscicolidae* en général qui les déposent dans l'eau. Comment se forme cette ornementation ? Elle ne peut s'expliquer simplement par une réaction des sécrétions au contact de l'eau, car si tel était le cas, sa disposition serait quelconque. L'examen de sangsues en ponte montre qu'elle est décelable dès le début de la formation de la paroi (Fig. 93). Les crêtes que l'on observe correspondent vraisemblablement à des lignes de pores excréteurs très serrés de glandes clitelliennes. L'expulsion brusque des sécrétions formerait au-dessus de chaque pore un dôme dont le sommet serait à l'origine d'une expansion et dont la base se souderait à celles des dômes voisins pour former une couche continue. Le retrait de la sangsue du cocon entraîne une diminution de sa surface et par conséquent accentue cette

ornementation. Des expériences de section des canaux excréteurs des glandes clitelliennes au niveau du 13e métamère (voir chapitre VI), entraînent des perturbations importantes de l'aspect du cocon. Ceux obtenus à partir d'une section unilatérale des faisceaux sont pratiquement lisses (Fig. 232, 233). Ce résultat souligne la nécessité soit d'une sécrétion abondante, soit d'un mélange dans des proportions bien définies des sécrétions de type 2 et 3 pour la formation des crêtes.

L'ensemble de ces observations nous permet de donner une interprétation du mécanisme de la ponte chez *P. geometra* (Figs 101 à 107). L'ordre dans lequel sont déversées les sécrétions au cours de la formation du cocon demande un contrôle très précis. Ce dernier est vraisemblablement sous la dépendance du système nerveux. LENT (1973) a en effet montré que l'émission de mucus chez *H. medicinalis* était contrôlée par les cellules de Retzius.

γ - Comparaison entre la ponte de *P. geometra* et celle des autres Hirudinées

Chez la plupart des espèces où le cocon est pondu au contact d'un support, les mécanismes sont très voisins de ceux décrits chez *P. geometra* ; c'est le cas par exemple de *C. respirans* (HOFFMANN, 1956), *E. octoculata* (BRUMPT, 1900a, b ; PAWLOWSKI, 1955), *E. punctata* (SAWYER, 1970), *G. complanata* (BRUMPT, 1900b), *T. tessulatum* (observation personnelle). Cependant l'aspect du cocon est propre à chaque famille. Chez les *Eripobdellidae*, le cocon est lisse et chez les *Glossiphoniidae* ce n'est qu'une simple enveloppe protectrice translucide ; les oeufs sont très riches en vitellus et un apport nutritif exogène n'est pas nécessaire au développement embryonnaire. Le nombre d'oeufs dans le cocon varie avec les espèces ; la famille des *Piscicolidae* est la seule à n'en pondre qu'un.

Quelques pontes sont cependant exceptionnelles :

- Chez *B. torpedinis*, les individus matures ne quittent pas leur hôte pour effectuer la ponte. Les cocons formés autour du clitellum caché par un repli tégumentaire de la région post-clitellienne sont simplement rejetés autour de la sangsue par un mouvement brusque de la région antérieure du corps.\*

- Chez *G. lata* (NAGAO, 1958) la zone occupée par les orifices externes des glandes clitelliennes se réduit à une petite surface entourant le pore génital femelle. Le cocon apparaît comme une poche

---

\* Une séquence prise à Arcachon par M. GUILLON et montrant la ponte de cette espèce, existe dans les archives du Service du Film de Recherche Scientifique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille.

placée devant ce dernier. Elle augmente de volume au fur et à mesure que les oeufs y sont pondus pour finalement se pédiculiser et se détacher.

- Chez *H. stagnalis*, les cocons sont déposés sur la face ventrale du parent. BRUMPT (1900b) estime que ce dépôt se fait de la même manière que chez *P. geometra*. Une récente étude de SAWYER (1972) décrit les mouvements de l'animal mais ne donne aucune explication sur la formation des cocons.

Il existe en outre chez les Hirudinées toute une gradation dans les soins apportés aux oeufs et aux jeunes (SAWYER, 1971). En ce qui concerne les modifications ultérieures du cocon, le seul travail qui en traite est celui de DAVIS (1968). Cet auteur, travaillant sur des Hirudinées non déterminées d'Amérique Centrale et de l'Ohio, fait les observations suivantes au moment de l'éclosion : les opercules qui étaient fermés après la ponte deviennent mous ; le jeune à l'intérieur du cocon pousse avec la ventouse antérieure sur les parois d'une part et aspire le contenu d'autre part. L'action conjuguée des poussées et des aspirations libère le passage lorsque l'opercule est suffisamment ramolli. Chez *P. geometra*, il garde sa fermeté et sa forme (Fig. 92). Dans ce cas, c'est la jonction entre l'opercule et le reste de la paroi qui cède à la pression exercée par le jeune. Celle-ci est vraisemblablement provoquée par l'ensemble du corps en mouvement puisqu'une boucle du corps jaillit toujours avant la ventouse antérieure (voir film "Biologie des Sangsues").

### 3 - L'AIRE COPULATRICE

C'est une zone de forme losangique dépourvue de cellules pigmentaires (Figs 39 et 109). De ce fait, elle apparaît blanche sur l'animal vivant ou fraîchement fixé (Fig. 108). Prenant naissance un peu en dessous du pore génital femelle, elle s'étend en arrière sur le 12e et une partie du 13e somite. C'est sur la petite fossette qui la déprime en son centre que sont toujours déposés les spermatophores lors de l'accouplement (Fig. 110). A l'exception d'*Acanthobdella peledina*, il n'existe d'aire copulatrice que dans la famille des *Piscicolidae*, que BRUMPT (1900b) subdivise en cinq groupes :

1er groupe : pas d'aire copulatrice et de tissu vecteur : *Trachelobdella lubrica*, *Platybdella soleae* (espèce non répertoriée par SOOS (1965) dans sa revue des *Piscicolidae*).

2ème groupe : ébauche de tissu vecteur et pas d'aire copulatrice : *Platybdella scorpii* (= *Malmiana scorpii*), *Fontobdella muricata*.

3ème groupe : tissu vecteur et aire copulatrice situés sous l'orifice génital femelle : *P. geometra*, *Cystobranchus respirans*, *C. fasciatus*.

4ème groupe : les sacs ovariens sont reliés par le tissu vecteur à l'aire copulatrice située à l'intérieur de l'atrium génital mâle : *Trachelobdella nodulifera* (= *Calliobdella nodulifera*), *T. lophii* (= *C. lophii*) et *Cystobranchus mammillatus*.

5ème groupe : l'aire copulatrice est placée sous le pore génital femelle mais il n'existe pas de tissu vecteur : *Branchellion torpedinis*.

Afin de pouvoir comparer l'aire copulatrice à l'épiderme normal, nous avons entrepris l'étude de ce dernier.

#### a - Etude de l'épiderme normal

Il est constitué d'un épithélium unicellulaire recouvert à l'extérieur d'une cuticule, pourvue de nombreuses cellules glandulaires piriformes et d'organes sensoriels ciliés (Fig. 112). Nous étudierons successivement ces différents composants.

##### α - Les cellules épithéliales

Largement séparées du côté basal, elles s'accrochent les unes aux autres du côté apical pour former une couche continue de 1,2 à 2,7  $\mu$  d'épaisseur (Figs 113 et 125). Elles sont bordées, au contact du collagène dermique, par une lame basale de 500 Å environ d'épaisseur. Leur volumineux noyau possède un ou deux nucléoles granulaires (Fig. 113). Le cytoplasme riche en ribosomes comporte de nombreuses mitochondries, un réticulum granulaire bien développé et un appareil de Golgi très actif dont les vésicules de sécrétion contribuent à la formation de deux types de granules. Les uns d'un diamètre de 0,45  $\mu$  sont très clairs et à contenu flocculeux. Les autres, de 0,2 à 0,4  $\mu$ , de forme irrégulière montrent des parties très denses aux électrons (Fig. 115). Il ne nous est pas possible de préciser s'il s'agit de deux sécrétions simultanées différentes ou de deux étapes dans l'élaboration d'un même produit. Du côté du pôle basal les invaginations de la membrane cytoplasmique sont nombreuses (Fig. 113) traduisant vraisemblablement de grandes possibilités de variation rapide de volume.

L'apex de ces cellules montre une répartition régulière d'hémi-desmosomes prolongés vers l'intérieur par des faisceaux de tonofilaments (Fig. 113). Elles sont recouvertes de la cuticule qui se subdivise en deux parties :

- Une partie basale, d'une épaisseur de 0,55 à 0,65  $\mu$ , formée de 3 à 4 couches de faisceaux de fibres de collagène traversées par les villosités épithéliales (Fig. 114). L'utilisation du microscope électronique à balayage nous a permis de bien mettre en évidence l'orientation dans des directions orthogonales des faisceaux de fibres de collagène de deux plans successifs (Fig. 83).

- Une partie apicale, l'épicuticule, comportant une bande homogène et continue de matériel dense de 300 Å d'épaisseur, surmontée de microvillosités d'une hauteur de 0,25  $\mu$  pour un diamètre de 300 Å environ.

#### $\beta$ - Les cellules glandulaires piriformes

Elles possèdent un noyau basal aplati entouré d'une couche de cytoplasme dans lequel s'élabore le produit de sécrétion sous l'aspect de granules de taille variable (jusqu'à 1  $\mu$ ), hétérogènes, avec quelques globules ou une frange très denses aux électrons. Ces granules s'hydratent vraisemblablement vers le pôle apical où ils sont repoussés avant d'être excrétés (Fig. 116). Ces cellules sécrètent le mucus recouvrant le corps de la sangsue. Leur étude a été faite en microscopie photonique chez *G. complanata* (GONDRAN, 1954).

#### $\gamma$ - Les cellules ciliées

Une dizaine de cellules fusiformes, ciliées, beaucoup plus hautes que l'épithélium avoisinant, s'associent pour former un bouton sensoriel (Fig. 112). Les cils, de structure classique (9 doublets périphériques et deux tubules centraux), sont insérés sur des centrioles se prolongeant à l'intérieur de la cellule par des racines ciliaires (Fig. 117). Ils traversent la cuticule et sont partiellement logés dans une dépression du pôle apical des cellules sensorielles (Fig. 118). Ces dernières sont beaucoup plus claires que celles de l'épithélium banal environnant. Leur cytoplasme contient peu de ribosomes, du réticulum généralement lisse et des mitochondries allongées.

#### b - Etude de l'épiderme de l'aire copulatrice

Il est caractérisé chez l'animal adulte, outre son aspect macroscopique, par une abondante sécrétion occupant la totalité du pôle apical (Figs 111 et 119). En microscopie électronique cette sécrétion d'origine golgienne apparaît formée de granules homogènes de forme arrondie ou allongée de 0,25 à 0,55  $\mu$  environ et moyennement denses aux électrons. Ils peuvent comporter quelquefois une petite vacuole claire (Fig. 120). Les cellules constituent un épithélium très épais de type prismatique et sont reliées les unes aux autres par un complexe jonctionnel comprenant une *zonula adhaerens* apicale et une jonction septée s'étendant sur

une profondeur de 1,6 à 2,5  $\mu$  environ (Fig. 119). L'espace intercellulaire de 200 à 250 Å comporte des liaisons transversales espacées régulièrement de 200 Å (Fig. 122). Il montre des dilatations pouvant atteindre un diamètre de 0,15  $\mu$  (Fig. 121). L'utilisation d'un traceur, le lanthane, a permis une meilleure étude de ces jonctions cellulaires. Nous n'avons constaté aucune différence entre celles des cellules épidermiques normales et celles de l'aire copulatrice. La pénétration se fait légèrement au delà de la zone des jonctions septées et est la même dans les deux cas, soit de 2,3  $\mu$  environ. Elle n'atteint jamais la lame basale (Fig. 125). Sur coupes transversales les septa apparaissent clairs entre les zones marquées au lanthane (Figs 127, 128). Sur coupes parallèles aux jonctions, ils forment un treillis en nid d'abeille dont le centre des alvéoles est occupé par le traceur (Fig. 126). Les dilatations de l'espace intercellulaire apparaissent très nettement avec une zone centrale moins opaque (Figs 126, 128, 129).

#### c - Discussion

La cuticule de *P. geometra* dont l'étude avait déjà été abordée par JUNG (1963) et RUTSCHKE (1970) est comparable à celles des autres Hirudinées étudiées : *E. octoculata*, *H. stagnalis*, *T. tessulatum*, *H. sanguisuga* (RUTSCHKE, 1970), *H. medicinalis* (RUTSCHKE, 1970 ; DAMAS, 1972), *G. complanata* (RUTSCHKE, 1970 ; DAMAS, 1973a, b) et *Batracobdella picta* (DESSER et WELLER, 1977). La différence essentielle réside dans le nombre de couches de faisceaux de collagène ; 7 par exemple chez *B. picta*, 4 à 5 chez *P. geometra*. RICHARDS (1974) a montré que ce nombre était proportionnel à la taille chez les Lumbricidés. Les données manquent pour tirer une conclusion en ce qui concerne les Hirudinées : une coloration normale ne permet pas d'observer correctement ces structures qui sont par contre bien mises en évidence par la technique de THIERY (Fig. 114). La faible épaisseur de la cuticule des sangsues expliquerait selon RICHARDS (1977) l'absence d'acide hyaluronique dans sa composition (DAMAS, 1969a). Ce dernier ne serait nécessaire que pour renforcer la viscosité de la matrice des cuticules épaisses comme par exemple celle des Lumbricidés et des Megascolecidés.

Le complexe jonctionnel observé chez *P. geometra* comprenant de l'extérieur vers l'intérieur une *zonula adhaerans* puis une jonction septée, se retrouve chez toutes les Annélides et a été particulièrement bien étudié et discuté par BASKIN (1976). Il est généralement admis que les jonctions septées permettent des échanges intercellulaires comme les "gap junctions". Il est probable qu'elles jouent un rôle dans

l'adhérence mécanique des cellules entre elles d'une part, de barrières aux échanges avec l'extérieur d'autre part. Les petites dilatations de l'espace intermembranaire que nous avons observées chez *P. geometra* se retrouvent sur de nombreuses micrographies de publications relatives à l'épiderme des Annélides. Elles sont particulièrement nettes chez *Mesenchytraeus solifugus* (GOODMAN et PARRISH, 1971). Les causes de leur apparition et leur rôle éventuel ne sont pas connus.

La présence d'organes sensoriels ciliés semble être générale parmi les Annélides. Ils sont connus depuis longtemps chez les Hirudinées (HARANT et GRASSE, 1959) et signalés en microscopie électronique par DAMAS (1973a, b) chez *G. complanata* et par DESSER et WELLER chez *B. picta* (1977). Nous n'avons observé qu'un seul type de ces organites chez *P. geometra*, alors que KNAPP et MILL (1971) en décrivent trois chez *Lumbricus terrestris*. Rien n'est connu jusqu'à présent en ce qui concerne leur rôle ; il pourrait s'agir d'organes sensoriels tactiles ou de barorécepteurs ou encore de chémorécepteurs. Les données physiologiques manquent à cause de leur petite taille. Comparée à l'épiderme normal, l'aire copulatrice en diffère par les points suivants :

- absence de cellules piriformes muqueuses,
- absence de boutons sensoriels,
- le fait qu'elle constitue un épithélium unicellulaire prismatique très serré et très épais (les cellules ont une hauteur de 25  $\mu$  environ, pour 5  $\mu$  dans l'épiderme normal),
- sa sécrétion,
- la faible densité des hémi-desmosomes et des tonofilaments.

Ce sont cependant des cellules épidermiques puisqu'elles sont recouvertes d'une cuticule d'apparence normale.

L'examen d'animaux sur lesquels un spermatophore a été implanté montre que les microvillosités épicuticulaires sont enrobées par une substance de densité électronique très voisine de celle des granules cellulaires (Figs 123 et 124). Il semble donc vraisemblable que la sécrétion déversée au contact du spermatophore serve à coller celui-ci à l'épiderme. L'hypothèse d'un rôle adhésif des sécrétions de l'aire copulatrice est en accord avec la fixation exceptionnellement puissante du spermatophore chez *P. geometra* et sa morphologie aplatie (Fig. 110). Ce fait expliquerait que la sangsue ne parvienne pas à s'en débarrasser malgré ses efforts. Un tel mode de fixation ne peut évidemment s'appliquer qu'aux

espèces pourvues d'une aire copulatrice. l'intervention d'une sécrétion issue de l'atrium mâle dans ce processus n'est pas à exclure puisqu'elle assure ce rôle pour toutes les autres espèces. Chez les *Glossiphoniidae* et les *Erpobdellidae*, les spermatophores sont déposés en un point quelconque du corps, généralement sur la face dorsale. Ils sont allongés et pourvus d'une plaque basale qui en assure l'adhérence (BRUMPT, 1900b ; MYERS, 1935).

Un rôle adhésif des sécrétions des glandes épidermiques s'observe également au cours de l'accouplement des Lumbricidés. Les glandes sétales annexées aux soies génitales de *L. terrestris* et *E. foetida* élaborent des substances qui participent aux dispositifs d'accrochage des deux partenaires (GROVE, 1925 ; GROVE et COWLEY, 1927). Le fait que l'épicuticule serve de système mécanique d'accrochage au spermatophore par l'intermédiaire des sécrétions de l'aire copulatrice entre, semble-t-il, dans les fonctions normales de cette structure. RICHARDS (1974) pense en effet qu'elle sert de piège et de stabilisateur mécanique au fin revêtement muqueux qui entourent les Oligochètes. La chute du spermatophore à l'issue de la fécondation semble se faire à la suite d'un décollement de l'épicuticule (Figs 123 et 124) qui serait ensuite régénérée par les cellules sous-jacentes selon un processus qui a été bien étudié par POTSWALD (1971) chez l'Oligochète *Aeolosoma bengalense*.

C'est au travers de l'épiderme plus mince de la fossette de l'aire copulatrice que s'effectue la pénétration des spermatozoïdes. Elle se fait grâce à l'érosion de l'épithélium sous l'action d'enzymes contenues dans le spermatophore (MYERS, 1935). DAMAS (1968 a, b, 1969b) a montré chez *G. complanata* qu'il contenait des protéases et des hyaluronidases. Après avoir traversé cette première barrière, les gamètes mâles parviennent, chez *P. geometra* dans le tissu vecteur.

#### 4 - LE TISSU VECTEUR

C'est une masse tissulaire compacte située entre l'aire copulatrice et les ovaires auxquels elle est reliée par deux courts canalicules (Fig. 37). De forme losangique, il s'étend de l'orifice génital femelle à la première paire de testicules. Du fait de son épaisseur, 160  $\mu$  environ chez l'animal mature, la chaîne nerveuse et les ovaires sont repoussés dorsalement (Fig. 65). Il est séparé de l'épiderme de l'aire copulatrice par la musculature circulaire. La musculature longitudinale n'est représentée que par quelques fibres (Fig. 130) au-dessus de la fossette,

réduisant ainsi le chemin que doivent parcourir les spermatozoïdes. Les muscles dorso-ventraux le traversent.

Comme l'avait observé BRUMPT (1900b), le tissu vecteur est formé de deux types cellulaires : des grandes cellules vacuolisées et des petites (Fig. 130).

a - Les grandes cellules du tissu vecteur

D'un diamètre de 20  $\mu$  environ, elles sont fréquemment accolées les unes aux autres. Elles entourent les muscles dorso-ventraux et forment des petites travées au sein des petites cellules (Fig. 130). Le tissu vecteur est limité par une couche formée de ces grandes cellules. Cette dernière est le prolongement de l'enveloppe ovarienne. Leurs caractéristiques essentielles en microscopie photonique sont leur aspect vacuolisé et le fait qu'elles sont toujours entourées d'une épaisse couche de collagène. En microscopie électronique, elles apparaissent séparées de ce dernier par une mince lame basale (250 Å). Les très nombreuses vacuoles peuvent atteindre une grande taille et contiennent un matériel flocculeux de densité variable (Figs 131 et 132). La zone corticale de ces grandes cellules est très riche en vésicules de deux types :

- Type 1 : ce sont de petites vésicules denses de forme variable (Figs 131, 132). Certaines sont arrondies, d'autres allongées, d'autres encore en forme de coupole (Fig. 133) montrant en coupe frontale un aspect caractéristique en anneau (Fig. 131). Elles sont produites en abondance par un appareil de Golgi comprenant plusieurs dictyosomes très actifs (Fig. 133). L'utilisation du phosphate de plomb (Fig. 134) apporte de fortes présomptions pour une localisation à leur niveau de l'activité phosphatasique acide.

- Type 2 : ce sont des vésicules rondes d'un diamètre de 1 000 à 1 500 Å, revêtues extérieurement d'un feutrage très net d'une épaisseur de 200 Å environ (Fig. 135). Leur contenu est moyennement dense aux électrons. Nous ne sommes par parvenu à une certitude quant à leur origine et leur évolution. Les images observées montrent une relation (Fig. 135) avec les invaginations particulièrement nombreuses de la membrane plasmique (Fig. 133).

Le réticulum endoplasmique est relativement abondant mais de forme très irrégulière avec des parties garnies de ribosomes et d'autres qui en sont dépourvues.

Le noyau est relativement petit (5 à 6  $\mu$ ) avec un nucléole central d'1,2  $\mu$  environ de diamètre.

b - Les petites cellules du tissu vecteur

Leur faible taille (8 à 10  $\mu$  de long sur 4 à 5 de large) rend leur étude très difficile en microscopie photonique. Elles sont caractérisées par :

- un taux mitotique très élevé,
- le fait que c'est entre elles que circulent les spermatozoïdes venant du spermatophore,
- la présence fréquente dans leur cytoplasme de volumineux corps résiduels après le passage des gamètes mâles.

La microscopie électronique révèle un aspect différent de ce tissu chez l'animal immature et mature. Chez la jeune sangsue, ces cellules montrent une très grande abondance de replis de la membrane plasmique à l'intérieur du cytoplasme (Fig. 137). Ceux-ci tendent à disparaître chez l'animal qui s'est déjà accouplé (Fig. 136). Un de leurs caractères le plus constant est la présence de granules denses, arrondis, d'un diamètre de 0,3  $\mu$  environ, d'origine golgienne. Cependant, ces derniers peuvent devenir plus rares et même quelquefois disparaître quand la cellule renferme une importante vacuole de phagocytose (Fig. 138).

Le noyau est de petite taille (3  $\mu$ ), pourvu d'un nucléole et de petites mottes de chromatine disposées généralement contre l'enveloppe nucléaire.

c - Discussion

Le problème qui se pose est celui du rôle de ces deux types cellulaires. Deux points nous semblent importants à souligner avant d'en discuter :

- d'une part il s'agit de deux types de cellules conjonctives dont on retrouve l'équivalent dans d'autres parties du corps de *P. geometra* : une cellule ayant les mêmes caractéristiques que les petites est visible sur la figure 73, entre les canaux excréteurs des glandes clitelliennes.

- d'autre part, le tissu vecteur ne constitue qu'une différenciation de la paroi ventrale de l'ovaire avec lequel il est toujours en communication par deux petits canalicules. Dans un cas nous y avons trouvé des cellules germinales.

La présence de nombreuses vésicules à activité phosphatasique acide et de vacuoles au sein des grandes cellules permet de leur attribuer un important rôle de digestion. Il est tentant de penser que ces cellules qui séparent le tissu vecteur du coelome constituent une barrière

pour les spermatozoïdes qu'elles pourraient éventuellement phagocyter. Mais, deux faits nous conduisent à rejeter cette hypothèse. D'une part, nous n'avons jamais observé de gamètes dans leurs vacuoles et très rarement des corps résiduels ; d'autre part, elles participent à la constitution de la paroi ovarienne. En outre, cette hypothèse n'explique pas leur présence un peu partout dans l'organisme. Le fait qu'elles sont toujours entourées de collagène peut laisser penser à un rôle dans la synthèse de ce composé. Il serait stocké dans les vacuoles et rejeté de la cellule par les vésicules de type 2 dont le contenu a la même densité en microscopie électronique. Elles ont de nombreuses caractéristiques communes aux fibroblastes d'Invertébrés et de Vertébrés.

C'est au travers du tissu formé par les petites cellules que progressent les spermatozoïdes pour gagner les cellules germinales femelles. L'examen de la figure 137 pourrait laisser supposer une grande cohésion de ce tissu avec des cellules imbriquées les unes dans les autres par des interdigitations. En fait, il s'agit vraisemblablement d'un accroissement de la surface cellulaire permettant de brusques variations de forme et notamment un allongement (Fig. 136) facilitant peut-être le transit des spermatozoïdes. Les fonctions essentielles qui nous semblent dévolues à ces cellules sont :

- d'une part, la phagocytose des spermatozoïdes n'atteignant pas les ovaires. Elles contiennent des granules qui peuvent peut-être être assimilés à des lysosomes comme le suggère la diminution de leur nombre dans celles pourvues d'une large vacuole de phagocytose. Le fait que nous n'y avons pas détecté d'activité phosphatasique acide peut s'expliquer soit par une concentration trop basse en hydrolase, soit parce qu'elle se trouve sous une forme inactive (HOURDRY, 1974). Les petites cellules du tissu vecteur peuvent certainement être assimilées aux phagocytes intraovariens dont elles ont la taille.

- d'autre part, la formation d'un bouchon cicatriciel au niveau de la plaie produite par la pénétration des spermatozoïdes. La cicatrisation chez les Hirudinées commence toujours par un recouvrement de la lésion par de petites cellules conjonctives comme l'ont montré MYERS (1935) chez *Placobdella parasitica*, MALECHA (1968) chez *H. medicinalis*, CORNEC (1971) chez *E. octoculata* et LEGORE et SPARKS (1971) chez *P. salmositica*. Le tissu vecteur constituerait donc un dispositif permettant d'accélérer la fermeture de la plaie.

## 5 - CONCLUSION

Chez *P. geometra*, la croissance ovocytaire se fait dans un follicule formé :

- de 2 à 5 cellules folliculaires externes,
- d'une cellule folliculaire interne très différente des précédentes,
- d'un groupe central, vraisemblablement isogénique, de 50 à 60 cellules réunies entre-elles par l'intermédiaire du cytophore. Une seule aura une destinée germinale, les autres auront un rôle nourricier.

La fonction probable des cellules folliculaires est de puiser dans le liquide ovarien les éléments nutritifs nécessaires à la croissance ovocytaire.

Les cellules nourricières fournissent à l'ovocyte, par l'intermédiaire du cytophore, des mitochondries et des ribosomes, l'aidant ainsi à se doter d'importants moyens de synthèse protéique. L'oeuf est par contre dépourvu de vitellus et sera pondu dans un cocon dont le contenu, produit par les glandes clitelliennes, assurera la croissance embryonnaire.

La fécondation rappelle celle de l'oursin, mais présente la particularité d'un blocage en métaphase de première division de maturation jusqu'à la ponte.

L'étude des glandes clitelliennes a permis de les classer en quatre types qui diffèrent par la structure de leur sécrétion et leur rôle dans la constitution du cocon :

- les cellules de type 1 produisent des mucopolysaccharides acides dont l'émission marque la première étape de la formation du cocon. Elles serviraient à coller le cocon au support, à aseptiser le clitellum et à former un sac extensible dans lequel seront déversées les autres sécrétions.
- les cellules de type 2 se divisent en deux sous types, les unes (type 2a) donnent la partie fibrillaire de la paroi du cocon, les autres (type 2b) l'opercule.
- les cellules de type 3 fournissent les amas denses de la paroi.
- les cellules de type 4 sont à l'origine des réserves nutritives entourant l'unique embryon.

Nos observations nous ont permis de proposer une hypothèse expliquant les différentes étapes de la formation du cocon.

Les glandes de type 5 se déversent dans la région préclitellienne et ne semblent pas participer à la formation du cocon. Elles pourraient sécréter une phéromone intervenant lors de l'accouplement.

L'étude de l'aire copulatrice nous a montré qu'elle était formée de cellules épidermiques caractérisées par la synthèse d'un matériel dont le rôle pourrait être de faciliter l'adhésion du spermatophore.

C'est dans une zone différenciée de la paroi ventrale de l'ovaire appelée tissu vecteur que se fait le passage des spermatozoïdes issus du spermatophore. Il comporte deux types cellulaires : des petites cellules qui sont vraisemblablement des phagocytes et des grandes qui possèdent des caractéristiques cytologiques de fibroblastes et qui synthétiseraient du collagène. Ce sont des cellules conjonctives banales qui se rencontrent partout dans le corps de *P. geometra*.

## C - LA FONCTION MÂLE

### I - LES TESTICULES

Lorsque nous avons commencé ce travail, la spermatogenèse des Hirudinées avait déjà fait l'objet de nombreuses études en microscopie photonique. Parmi les plus importantes il faut citer celles de BRUMPT (1900b) chez plusieurs espèces, SCRIBAN et AUTRUM (1934), HARANT et GRASSE (1959), BRAKE (1958), NEKHAEV (1957, 1959) chez *H. medicinalis*, DAMAS (1964c, 1965a, c, 1968c) chez *G. complanata*. Les études en microscopie électronique étaient plus rares et concernaient essentiellement *H. medicinalis* dont avaient été étudiés les spermatides (BARADANY, 1961), les spermatozoïdes (PASTISSON, 1965, 1966 ; LECHENAULT et PASTISSON, 1973) et les réserves en glycogène du flagelle (ANDERSON et PERSONNE, 1970). En même temps que paraissaient nos résultats sur le spermatozoïde de *P. geometra* (WISSOCQ et MALECHA, 1974), la spermiogenèse (MALECHA, 1975), les différents types de gamètes mâles d'Hirudinées (WISSOCQ et MALECHA, 1975), d'autres articles étaient publiés sur le spermatozoïde de *G. complanata* (DAMAS, 1974), d'*H. medicinalis* et *E. octoculata* (CARAVAGLIA *et al.*, 1974), ainsi que sur la spermiogenèse de ces deux dernières (LORA LAMIA DONIN et LANZAVECCHIA, 1974). Par contre, l'autre groupe de Clitellates, les Oligochètes, a donné lieu à de nombreux travaux en microscopie électronique comme par exemple ceux de ANDERSON *et al.* (1967, 1968), BRADKE (1963), CAMERON *et al.* (1963), FERRAGUTI *et al.* (1971), GATENBY *et al.* (1959), LANZAVECCHIA (1972), REGER (1967), SHAY (1972), STRANG VOSS (1970).

#### a - La paroi testiculaire

Elle est constituée d'une couche de collagène de 4 à 5  $\mu$  d'épaisseur limitée par une mince enveloppe de matériel dense (200 Å) au contact des cellules conjonctives externes et de l'endothélium (Fig. 139). Les cellules conjonctives externes, très aplaties, forment, grâce à leurs

prolongements, un revêtement pratiquement continu de 500 Å environ d'épaisseur tout autour du testicule (Figs. 139 et 140). Elles sont caractérisées par un noyau très allongé et par de nombreux replis de la membrane cellulaire. Le revêtement interne est constitué d'une part de cellules ayant les mêmes caractéristiques que les précédentes et qui tapissent la majeure partie du testicule (Fig. 139), d'autre part, de cellules ciliées formant entonnoir et ayant pour rôle de véhiculer les spermatozoïdes vers le canal efférent. Ces dernières sont beaucoup moins aplaties et disséminées que les précédentes (Fig. 141). Elles sont reliées entre elles par des desmosomes et des jonctions septées. Elles portent des replis perpendiculaires à la surface cellulaire et à l'aisselle desquels se trouvent les cils (Figs 141 et 142). Dans l'épaisseur de la couche de collagène se rencontrent des cellules conjonctives et musculaires éparses (Fig. 140).

La paroi testiculaire de *G. complanata* a été étudiée récemment en microscopie photonique par DAMAS (1965 a, b, 1968c). Chez cette espèce les cellules tapissant l'intérieur du testicule sont toutes ciliées et contiennent constamment de l'orthophosphatase alcaline. L'auteur émet l'hypothèse que cette enzyme jouerait un rôle dans le transfert au travers de la paroi testiculaire d'éléments nutritifs puisés dans le contenu coelomique voisin. A côté de ce rôle nutritif, certaines de ces cellules perdraient leur ciliature, subiraient quelques divisions pour donner naissance, aussitôt après l'accouplement, aux cellules souches mâles à l'origine des spermatogonies. Un tel rôle de l'endothélium testiculaire n'a pu être mis en évidence chez *P. geometra* où toutes les spermatogonies semblent dériver du stock de cellules souches existant dans le testicule à la naissance. La même observation a été faite par VAN DAMME (1974) chez *E. octoculata*. Cet auteur attribue cette différence au fait qu'*Erypobdella* ne vit généralement qu'un an, contrairement à *G. complanata*.

#### b - Les premiers stades de la spermatogenèse

##### α - Les spermatogonies

A la naissance, le contenu testiculaire est uniquement formé de spermatogonies souches. Il s'agit de cellules isolées, d'un diamètre de 4 à 5 μ, et contenant un noyau volumineux caractérisé par la présence d'un gros nucléole et de chromatine en mottes régulièrement réparties contre l'enveloppe (Fig. 40). Ces cellules vont se multiplier rapidement au cours des premières étapes de la vie post-embryonnaire tout en restant isolées les unes des autres. Puis certaines d'entre-elles présenteront une cytotélière incomplète et donneront naissance à des sperma-

togonies filles reliées à une masse cytoplasmique centrale : le cytophore (Fig. 143). Ces cellules ont les mêmes caractéristiques que les spermatogonies décrites dans d'autres groupes zoologiques (BRUSLE, 1971) : gros noyau avec un nucléole très net, cytoplasme peu abondant, riche en ribosomes avec un peu de réticulum et quelques petites mitochondries éparses. Le cytophore, très réduit au cours des premières mitoses, devient plus net au stade 64 cellules et affecte une forme irrégulière au stade 128 constitué de spermatogonies de dernière génération évoluant en spermatoctes I (Fig. 144).

#### $\beta$ - Les spermatoctes I

Ils présentent les mêmes caractéristiques cytoplasmiques (Figs 147 et 150) que les spermatogonies décrites précédemment, mais vont subir des modifications caractéristiques. L'une des premières est une légère croissance avec apparition fréquente de nucléoles annulaires (Fig. 149). Cette structure a été observée chez de nombreuses espèces (voir BERTOUT, 1973, pour la bibliographie) et est considérée comme le signe d'une intense activité métabolique. Les échanges nucléo-cytoplasmiques sont facilités par la présence d'invaginations (Fig. 149) de l'enveloppe nucléaire qui amènent le cytoplasme au sein même du noyau, au contact du nucléole. Les stades de prophase de méiose sont caractérisés par l'existence, à l'intérieur du noyau, de complexes synaptonématiques s'attachant par un petit pédicule (Fig. 148) à l'enveloppe nucléaire. Cette association est très fréquente (voir BRUSLE, 1971, pour la bibliographie). Une telle attache des chromosomes a été observée dès le stade pro-chromosomes par FELLUGA et MARTINUCCI (1975) chez *E. foetida*. Les complexes synaptonématiques apparaîtraient chez la plupart des espèces au stade zygotène (BRUSLE, 1971), cependant, CHAPRON et RELEXANS (1971) les décrivent dans les ovocytes d'*E. foetida* dès le stade leptotène. L'appareil de Golgi se montre particulièrement actif comme en témoigne la présence de nombreuses vésicules (Fig. 150). L'élaboration de vésicules acrosomiennes a été observée dès ce stade chez de nombreuses espèces et notamment chez le lombric (GATENBY, 1959).

Si l'on compare le spermatoctes I de *P. geometra* à celui d'une autre *Piscicolidae* : *B. torpedinis* (PRENSIER et MALECHA, 1974) on constate chez cette dernière espèce un certain nombre de différences :

- l'existence d'un plus grand nombre d'invaginations de l'enveloppe nucléaire. Elles persistent pendant toute la durée de la prophase (Fig. 155). Ces invaginations, toujours pourvues de nombreux pores, sont fréquemment au contact de la chromatine située de part et d'autre des complexes synaptonématiques (Fig. 156).

- la migration fréquente de l'un ou des deux nucléoles dans une évagination de l'enveloppe nucléaire donne l'impression, sur certaines coupes, d'un rejet du nucléole dans le cytoplasme (Fig. 152). Cependant, comme on peut le voir sur la figure 153, ce nucléole est toujours en liaison avec le noyau.

Ces deux types de modifications de la structure nucléaire peuvent certainement être interprétés comme des indices d'échanges nucléo-cytoplasmiques.

- l'apparition précoce d'ébauches de flagelles au nombre de quatre par cellule (Fig. 151). Des observations identiques ont été faites chez *Asterina* (DELAVAUULT et BRUSLE, 1967 et 1968) et chez *Ciona* (GEORGES, 1969).

- l'association constante d'un système de vésicules à l'un des complexes synaptonématiques (Fig. 154). Nous ne connaissons pas la signification de cette structure.

Les autres caractéristiques cytoplasmiques sont très voisines chez ces deux espèces et notamment l'activité golgienne.

#### γ - Les spermatocytes II

La durée de ce stade doit être très brève et nous ne l'avons observé qu'une seule fois en microscopie électronique. Les caractères cytoplasmiques sont peu différents de ceux des spermatocytes I, par contre, le cytophore a subi une très forte augmentation de volume.

#### c - La spermiogenèse (MALECHA, 1975)

Nous l'avons étudiée à la fois chez *B. torpedinis* et *P. geometra* qui possèdent des spermatozoïdes morphologiquement très voisins (Figs 185 et 186) ce qui explique la grande similitude de leur spermiogenèse. Nous décrivons celle de *P. geometra* et indiquerons au fur et à mesure les différences existant chez *B. torpedinis*.

#### α - Résultats

Chez *P. geometra*, les 512 spermatides d'un même groupe isogénique (Fig. 145) sont attachées à un cytophore volumineux (Fig. 146) par des ponts cytoplasmiques caractérisés par une densification interne de la membrane plasmique et par un "fuzzy coat" (Fig. 157) comme chez les Oligochètes (ANDERSON *et al.*, 1967 ; REGER, 1967 ; STRANG VOSS, 1970). Cette différenciation membranaire n'est pas propre aux spermatides mais existe depuis l'apparition des groupes isogéniques les plus précoces (Figs 152 et 155). La jeune spermatide (Figs 157 et 187) est caractérisée par :

- un flagelle bien développé à la base duquel on

n'observe qu'une seule structure centriolaire ce qu'a confirmé l'examen de coupes sériées effectuées chez *P. geometra* et *B. torpedinis*. Deux centrioles existent cependant chez *E. octoculata* et *H. medicinalis* (LORA LAMIA DONIN *et al.*, 1974). Il en est de même pour l'Oligochète *Lumbricillus rivalis* (WEBSTER *et al.*, 1977).

- un noyau contenant une chromatine dispersée et une ou deux masses de matériel probablement nucléolaire, généralement situées près du pôle mitochondrial ;

- des mitochondries rassemblées à un pôle du noyau où on observe un accolement des membranes de l'enveloppe nucléaire (Figs. 188, 189).

- la présence près du centriole d'un dictyosome généralement en forme de coupole (Fig. 158) et au niveau duquel se forme l'acrosome.

- l'ébauche de l'acrosome (Figs 158, 159 et 188) formée par l'isolement d'un saccule golgien, que nous appellerons coiffe acrosomique, en forme de cloche ouverte vers le pôle de sécrétion du dictyosome. Dans le cytoplasme, contenu à l'intérieur de cette coupole, et contre la membrane interne de la coiffe, se dépose du matériel opaque aux électrons qui sera à l'origine de la substance acrosomique. Chez *B. torpedinis* (Figs 189, 190) se forment d'abord des gros granules qui fusionnent ultérieurement. De la base de ce matériel part un tube constitué de deux cylindres emboîtés qui sont, de l'extérieur vers l'intérieur, un cylindre d'un diamètre extérieur de 0,2  $\mu$ , à paroi épaisse qui donnera la gaine de l'acrosome, un cylindre central d'un diamètre de 0,07  $\mu$  relié au précédent par du matériel disposé en rayons.

La structure du spermatozoïde (Figs 185 et 186) ne sera acquise qu'après une évolution complexe de ces différentes parties et au cours de laquelle il restera relié au cytophore au niveau de la partie antérieure de l'acrosome. Nous envisagerons successivement l'évolution du noyau, de l'acrosome, de l'appareil mitochondrial.

#### \* Evolution nucléaire

La chromatine se condense dans certaines parties du noyau en filaments très courts (Fig. 160) puis de plus en plus importants et ramifiés (Figs 161, 165). Au fur et à mesure que s'effectue l'élongation nucléaire, elle constitue de véritables lames (Figs. 166, 167) plus ou moins parallèles au grand axe du noyau et anastomosées entre elles (Fig. 168). A ce stade se fait l'élimination, à la partie postérieure du noyau, d'une partie du nucléoplasme sous forme de vésicules plurimembranaires, observation comparable à celle faite chez *Lumbricus* (ANDERSON *et al.*,

1967). Les anastomoses chromatiniennes, de plus en plus nombreuses, finissent par réduire le nucléoplasme clair en de petites poches (Figs 169, 170, 171, 174) qui disparaissent dans le spermatozoïde submature (Fig. 182). La condensation nucléaire est corrélative d'un allongement et d'une torsion en hélice. Le noyau prend d'abord un aspect piriforme (Fig. 165) puis de plus en plus allongé (Fig. 168). C'est à ce stade que s'amorce la torsion, d'abord en une hélice très lâche (pas de  $0,8 \mu$ ) puis de plus en plus serrée (Figs. 172, 173, 174) pour aboutir à son aspect définitif qui est issu de la torsion d'un axe portant trois replis longitudinaux d'une largeur de  $700 \text{ \AA}$  et formant entre eux un angle de  $120^\circ$  (Fig. 182). Ces replis décrivent autour de l'axe un trajet hélicoïdal constitué de 20 tours de spire d'un pas de  $0,45 \mu$  environ (Fig. 185). La torsion semble progresser de la gaine acrosomique vers le noyau dont la partie basale est toujours de ce fait en retard sur la région post-acrosomique. Chez *B. torpedinis* le diamètre du noyau est légèrement plus élevé et le nombre de tours de spire, d'un pas de  $0,4 \mu$ , plus faible : 15 (Fig. 186). Ces transformations morphologiques sont accompagnées de l'apparition, dans la zone périnucléaire, de microtubules disposés selon un trajet hélicoïdal et formant deux bandes dont l'une, composée de 6 à 8 microtubules environ, est deux fois plus large que l'autre (12 à 16 microtubules) (Figs 198, 199). Vis-à-vis d'elles l'espace intermembranaire de l'enveloppe nucléaire se réduit (Figs 161, 165); c'est à ce niveau que se déposera une lame chromatinienne (Figs 166, 167, 168 et 169). En dehors de ces zones, les pores nucléaires sont particulièrement nombreux (Fig. 165). Les microtubules s'étendent d'abord de la base du centriole à l'extrémité antérieure de la gaine, puis sur une certaine longueur de l'extrémité acrosomique lorsque cette structure se formera. Ils disparaissent quand le noyau a acquis sa morphologie définitive et que la condensation nucléaire est terminée. Le noyau mesure alors environ  $10 \mu$  de long sur  $0,22 \mu$  de large ( $6,3 \mu$  sur  $0,28 \mu$  chez *B. torpedinis*).

\* Evolution de l'acrosome

L'ébauche de l'acrosome s'accroît par augmentation du dépôt de substance acrosomique et par élongation de la gaine (Figs 162, 191, 192, 193). La coiffe s'étend latéralement pour venir enserrer l'extrémité antérieure de la gaine (Figs 163, 184a) et de ce fait forme une vésicule ouverte, remplie de substance acrosomique. L'acrosome en s'accroissant se glisse entre la membrane plasmique et le noyau (Fig. 162) pour se placer sur une petite surface plate de l'enveloppe nucléaire qui montre à ce niveau une disparition de l'espace intermembranaire (Fig. 163).

Ce positionnement de l'acrosome à l'apex du noyau est lié à d'importants mouvements intracellulaires amenant les différents constituants du spermatozoïde dans leur position définitive (Figs 165, 184a, 192). La modification de l'enveloppe nucléaire au contact de l'acrosome et de la mitochondrie a été considérée par LONGO et ANDERSON (1970) comme une différenciation due à l'association des membranes de l'enveloppe avec des structures spécialisées. Dès que l'acrosome a pris sa place à l'apex du noyau, les microtubules enserrant complètement la future gaine acrosomique ; l'observation de sections transversales (Figs 164, 166, 167) ou tangentielles (Figs 171, 172) pratiquées à ce niveau met nettement en évidence leur trajet hélicoïdal. A ce stade apparaît à l'intérieur de la gaine et relié à cette dernière un nouveau composant : le cylindre intermédiaire d'un diamètre de  $0,14 \mu$ , ayant le même aspect en microscopie électronique que le cylindre central et le matériel rayonnant (Fig. 164). Le trajet de la gaine, rectiligne à l'origine, devient hélicoïdal (Figs 171, 184b), modification qui gagne progressivement le noyau. La masse de substance acrosomique se place latéralement par rapport à l'axe de la gaine (Figs 175, 176, 184b) dans le prolongement de laquelle s'ébauche l'extrémité de l'acrosome. Celle-ci, d'abord rectiligne (Figs 175, 184b), puis hélicoïdale (Figs 177, 184c) possède une structure très opaque aux électrons (Figs 194, 195) où il est difficile de mettre en évidence des constituants nets. Les microtubules se prolongent à ce niveau (Figs 175, 176).

Dans une étape suivante, l'acrosome reprend son aspect rectiligne (Figs 172, 184c) après avoir subi de profonds remaniements : - séparation du cylindre intermédiaire de la gaine,

- différenciation de la structure de la gaine qui apparaît constituée par une seule couche de  $140 \text{ \AA}$  d'épaisseur, de tubules, de section quadrangulaire, juxtaposés et à trajet hélicoïdal. Ces tubules, tous identiques, comportent une lumière de  $75 \text{ \AA}$  de largeur ; une paroi opaque aux électrons de  $55 \text{ \AA}$  d'épaisseur sépare deux lumières consécutives. L'angle formé par le trajet de ces tubules et l'axe de la gaine peut atteindre  $50^\circ$ . Ce chiffre est très proche, sinon identique, à celui obtenu pour le noyau.

- apparition du bourrelet hélicoïdal. Son organisation est difficile à distinguer au début de sa formation (Fig. 172) ; sa différenciation résulte de l'extrusion d'un matériel opaque issu de la gaine et qui apparaît, sur les coupes transversales, disposé en deux demi-ellipses superposées et accolées à la gaine sur une longueur commune de  $300 \text{ \AA}$ . La

hauteur de la demi-ellipse externe est de 450 Å, celle de l'interne de 150 Å (Fig. 183). Le bourrelet décrit un trajet identique à celui des tubules de la gaine et pour une longueur de cette dernière de 16 µ, il comprend 35 tours de spire d'un pas de 0,47 µ, voisin de celui du noyau. Il est recouvert par la membrane cellulaire et paraît donc avoir une largeur de 450 Å sur des spermatozoïdes colorés négativement *in toto* (WISSOCQ et MALECHA, 1974) (550 Å chez *B. torpedinis*).

- apparition de la baguette axiale qui a l'aspect d'une tige pleine, de 1,5 µ de long, s'effilant dans sa partie antérieure et montrant une base convexe limitée partiellement par une mince couche de matériel très opaque aux électrons (Figs. 184d, 185). Cette baguette axiale est très courte chez *B. torpedinis* : 0,3 µ sur 0,15 µ (Fig. 186).

La dernière étape de l'évolution de l'acrosome est caractérisée par la migration de la substance acrosomique dans la gaine (Figs 178, 179, 184d). Ce déplacement est précédé par celui de la baguette axiale (Figs 180, 181). Lorsque la substance occupe sa position définitive (Fig. 185), sa limite antérieure se situe à la base de l'extrémité acrosomique. Dans cette zone où s'est faite son invagination, elle n'est séparée de l'extérieur que par la membrane cellulaire et c'est à ce niveau qu'elle peut éventuellement être rejetée comme on a déjà pu le constater après coloration négative des spermatozoïdes *in toto* par l'acétate d'uranyle (WISSOCQ et MALECHA, 1974, 1975).

Dans le spermatozoïde mature, la constitution de l'extrémité acrosomique est beaucoup plus nette et comprend :

- deux lames au trajet hélicoïdal (Figs. 183, 185, 196, 197) dont le pas est identique à celui des tubules de la gaine et du bourrelet. La lame externe, d'une largeur de 0,5 µ environ, est incontestablement un prolongement de la gaine où la structure en tubules ne s'est pas différenciée ; par contre, l'origine de la lame interne, d'une largeur de 0,08 µ, n'a pu être décelée.

- le prolongement du bourrelet hélicoïdal qui suit le bord antérieur de la lame externe. Sa différenciation est moins avancée qu'autour de la gaine (Figs. 183, 184d, 185).

L'axe de l'extrémité acrosomique est clair à ce stade, ce qui est peut-être dû au fait que le matériel qu'elle contenait a été utilisé pour l'édification de la baguette axiale ou a été incorporé à la substance acrosomique.

\* Evolution mitochondriale

La mitochondrie globuleuse qui se constitue à un pôle du noyau par fusion des petites mitochondries de la jeune spermatide (Figs 160, 161, 188, 189) est caractérisée par un espace intermembranaire clair et une matrice plus opaque aux électrons comme cela semble assez fréquent au cours de la spermatogenèse (ANDRE, 1962). Lors des mouvements des différents constituants de la spermatide, cette mitochondrie se place entre le noyau et le centriole (Figs. 165, 192). Elle subit une élongation (Fig. 168) mais ne semble pas affectée par la torsion des parties antérieures. Elle mesure alors 13  $\mu$  sur 0,23  $\mu$  (7  $\mu$  sur 0,28  $\mu$  chez *B. torpedinis*). Les crêtes prennent une disposition plus ou moins parallèle au grand axe et la membrane externe se couvre vers l'extérieur de matériel opaque aux électrons formant une couche pouvant atteindre une épaisseur de 100 Å (Figs 170, 173). Cette couche est beaucoup plus épaisse au niveau du contact de la mitochondrie avec le noyau (Fig. 173).

\* Le flagelle

Sa base se trouve dans une invagination de l'extrémité postérieure de la mitochondrie (Fig. 185) et est ainsi séparée du noyau comme chez la méduse *Nausithoe* (AFZELIUS *et al.*, 1971) et *Lumbricus* (ANDERSON *et al.*, 1967). Il est de type classique, à 9 doublets périphériques et un doublet axial. Le trajet des microtubules flagellaires est hélicoïdal. Toutefois, dans la région très antérieure, basale, du flagelle, se trouve un axe cylindrique d'un diamètre de 550 Å, constitué d'une substance relativement peu dense et qui pénètre dans l'invagination de la mitochondrie. A l'intérieur de cet axe on peut assez difficilement constater la présence, sur coupe transversale, de deux petits disques diamétralement opposés au contenu clair. Ces petits disques correspondent vraisemblablement à la racine des deux microtubules centraux qui parcourent la plus grande longueur du flagelle. Au niveau de la région basale du flagelle, on observe 9 rayons entre le cylindre axial et chacun des 9 doublets périphériques, rayons qui sont beaucoup moins nets lorsque les tubules centraux sont bien visibles. Ce flagelle, d'une longueur totale de 24  $\mu$ , présente à son extrémité une partie atubulaire que nous avons appelée pièce terminale, d'une longueur de 1  $\mu$  (WISSOCQ et MALECHA, 1975). Il existe en outre des particules de glycogène entre les microtubules et la membrane cellulaire dans la portion antérieure du flagelle, comme l'ont déjà observé ANDERSON et PERSONNE (1970) chez *H. medicinalis*. Chez *B. torpedinis* il est beaucoup plus long (47  $\mu$ ) ainsi que la pièce terminale (1,2 à 2,3  $\mu$ ).

Nos observations sur la spermiogenèse ont été confirmées par celles de LORA LAMIA DONIN *et al.* (1974) chez *E. octoculata* et *H. medicinalis*, et PASTISSON (1977) chez *H. medicinalis*.

### β - Discussion

Chez *P. geometra* et *B. torpedinis* se retrouvent des aspects très classiques de la spermiogenèse : condensation nucléaire, évolution mitochondriale et flagellaire (voir revue de BACETTI et AFZELIUS, 1976). Cependant, la complexité de la formation de l'acrosome et de la morphogenèse nucléaire méritent de retenir l'attention.

#### \* Morphogenèse nucléaire

Le spermatozoïde des *Piscicolidae* est caractérisé par un noyau hélicoïdal. Ce type de structure n'est pas rare parmi les gamètes mâles et sera discuté ultérieurement. Sa morphogenèse est liée à la présence d'une manchette de microtubules comme il en existe chez d'autres espèces (CLARK, 1967 ; FAWCETT *et al.*, 1971 ; FERRAGUTI *et al.*, 1971 ; TANDLER *et al.*, 1966 ; Mc INTOSH *et al.*, 1967). Chez la drosophile, la spermiogenèse normale se fait en présence de microtubules mais lorsqu'ils sont absents dans le cas de mutants ou lorsqu'ils sont altérés par l'action d'agents chimiques, on constate corrélativement que l'élongation nucléaire ne se fait pas et que les noyaux ont une forme anormale (SHOUP, 1967 ; WILKINSON *et al.*, 1974, 1975). Ils semblent donc indispensables à l'élongation nucléaire et plusieurs hypothèses ont été émises sur leur rôle. L'une des premières suggère qu'ils pourraient être directement responsables de l'élongation et de la morphologie du noyau (ANDERSON *et al.*, 1967 ; CLARK, 1967 ; HOADGE *et al.*, 1968 ; KESSEL, 1966 et 1970 ; SILVEIRA, 1964 ; POTSWALD, 1967) et a été très bien illustrée par l'article de Mc INTOSH et PORTER (1967) qui leur attribuent un rôle compresseur. Nos observations, identiques à celles faites chez le pinson (FAWCETT *et al.*, 1971) excluent ce rôle ; en effet, si les microtubules modelaient la forme du noyau par compression, ils se trouveraient au fond des sillons nucléaires, or ce n'est pas ce que nous observons (Figs 172, 173). Le même argument peut être utilisé à l'encontre de l'hypothèse de TOKUYASU (1974) tout au moins en ce qui concerne les stades tardifs de la morphogenèse nucléaire. Cet auteur pense que les microtubules pourraient former un cytosquelette rigide sur lequel se moulerait passivement le noyau.

Le rôle compresseur des microtubules a été discuté par FAWCETT *et al.* (1971). Ces auteurs, à la suite d'études portant sur les Mammifères, Oiseaux, Insectes et Annélides, pensent que les micro-

tubules n'auraient pas d'influence sur la forme du noyau mais seraient indispensables à la redistribution cytoplasmique pendant l'élongation de la spermatide. TOKUYASU (1974) envisage le rôle possible des forces mises en jeu par les déplacements intracellulaires. Une étude récente de PHILLIPS (1976) confirme cette hypothèse ; en effet, chez l'*Uropyge Mastigoproctus giganteus*, la morphogénèse nucléaire a lieu après la disparition de la manchette de microtubules. Les conclusions de FAWCETT *et al.* (1971) ne tiennent cependant pas suffisamment compte du fait que les microtubules sont très fréquemment associés à un accollement des membranes de l'enveloppe nucléaire suivi d'un dépôt de chromatine. Cette observation faite chez de nombreuses espèces et retrouvée chez *P. geometra* laisse supposer que la condensation de la chromatine pourrait être un élément important intervenant dans la morphogénèse du noyau (FERRAGUTI *et al.*, 1971 ; HOADGE *et al.*, 1968 ; KESSEL, 1966 et 1970 ; PHILLIPS, 1970 ; STANLEY *et al.*, 1972 ; TOKUYASU, 1974). FERRAGUTI et LANZAVECCHIA (1971), LANZAVECCHIA et LORA LAMIA DONIN (1972 et 1974) d'après leurs observations chez les clitellates attribuent aux microtubules un rôle inducteur sur la condensation de la chromatine à l'intérieur du noyau. De plus, chez les Hirudinées il semble y avoir parallélisme entre les filaments de chromatine et les microtubules. Cette disposition favoriserait donc la torsion du noyau. La condensation orientée de la chromatine pourrait diminuer les forces mécaniques nécessaires à la torsion ultérieure. WEBSTER et RICHARDS (1977) dans leur étude de la spermiogénèse de l'Oligochète *Lumbricillus rivalis* admettent l'hypothèse des auteurs précédents pour certains groupes zoologiques primitifs pour lesquels la médiation d'un mécanisme extérieur, en l'occurrence les microtubules, serait nécessaire à l'organisation et à l'orientation de la chromatine au cours de la condensation nucléaire. L'hypothèse émise par ces auteurs pour expliquer le mode d'action des microtubules est la suivante : les microtubules contrôleraient la disposition de certaines protéines membranaires de l'enveloppe nucléaire et leurs capacités de liaison. La réaction avec ces sites des histones faciliterait la condensation et l'orientation de la chromatine.

LORA LAMIA DONIN et LANZAVECCHIA (1974) déduisent de la progression proximo-distale de la torsion, qui semble se propager de la région antérieure de l'acrosome à l'extrémité postérieure du noyau, l'existence d'un champ morphogénétique se déplaçant dans le même sens. Comme la seule structure commune à l'acrosome et au noyau est représentée par les microtubules, ces derniers joueraient donc également, dans ce cas, un rôle inducteur. Pour ces auteurs, la mitochondrie aurait une réponse diffé-

rente à ce même agent inducteur : elle s'entoure d'une couche de matériel dense comme nous l'avons également constaté. En fait cette hypothèse, relative aux mitochondries, faite à l'issue d'observations effectuées chez les *Hirudidae*, *Eropobdellidae* et *Piscicolidae* est infirmée par nos recherches chez les *Glossiphoniidae*, famille dans laquelle la plupart des espèces possèdent une mitochondrie hélicoïdale. Chez *L. rivalis* il n'existe pas de parallélisme entre le trajet des microtubules et les hélices nucléaires et mitochondriales. WEBSTER *et al.* (1977) émettent donc des réserves à l'égard de l'explication avancée par LORA LAMIA DONIN *et al.* (1974) relative à la morphogenèse nucléaire et proposent la suivante : de l'organisation progressive de la condensation et de l'orientation de la chromatine, commençant à l'origine sous l'influence de la manchette de microtubules, résulte un retour de l'information aux protéines de l'enveloppe nucléaire et à travers elles aux organites associés déterminant ainsi la forme finale, spécifique, du noyau, de l'acrosome et des mitochondries. La manchette de microtubules ne servirait plus alors qu'au maintien de l'alignement des organites du spermatozoïde et jouerait donc un rôle de cytosquelette comme le propose TOKUYASU (1974). Notre étude en coupes sériées des premiers stades de condensation nucléaire (Figs 198, 199) nous permet d'infirmer certaines des conclusions de LORA LAMIA DONIN *et al.* (1974). L'observation faite par ces auteurs et nous-même d'une torsion hélicoïdale de noyau débutant à partir de l'acrosome n'est que la manifestation tardive d'un phénomène dont le point de départ est le noyau. En effet, avant toute torsion visible de ce dernier, la chromatine se dépose en deux bandes à trajet hélicoïdal. Cette disposition préfigure déjà l'aspect final du noyau, la bande étroite donnant vraisemblablement l'une des crêtes, la plus large, dont la surface est double de la précédente, donnant les deux autres. A ce stade une seule des bandes de microtubules enveloppe la gaine acrosomique (Fig. 189). L'élongation de la spermatide se fait en même temps qu'une torsion plus accentuée des deux bandes de microtubules et donc de la chromatine condensée sous-jacente. Si l'on admet un rôle inducteur des microtubules sur la condensation nucléaire, on peut également l'admettre pour les constituants de la gaine acrosomique qui seraient ainsi programmés avec la même disposition hélicoïdale que celle du noyau. L'information irait donc du noyau à l'acrosome et non l'inverse, comme le pensent LORA LAMIA DONIN *et al.* L'hypothèse de WEBSTER *et al.* (1977) est parfaitement applicable à partir de ce stade.

\* Formation de l'acrosome

.....  
Chez *P. geometra* l'ébauche acrosomique s'édifie en un point éloigné de sa position définitive ; la même observation a été faite chez d'autres Annélides (ANDERSON *et al.*, 1968 ; LANZAVECCHIA *et al.*, 1972 ; POTSWALD, 1967). La migration de l'acrosome se fait en l'absence de microtubules, ceux-ci ne viennent entourer la gaine de l'acrosome qu'au moment où ce dernier a atteint sa position définitive.

Les déplacements intracellulaires liés à cette évolution sont très importants, car en même temps doit se faire la mise en place de la pièce intermédiaire, entre le noyau et le centriole. Du fait de la différenciation très précoce de la jonction noyau - mitochondrie (Fig. 157), rendant ces deux éléments solidaires, il faut admettre, soit une rotation nucléaire amenant les différents constituants de la spermatide dans leur position définitive, soit une migration du centriole. Des déplacements, intéressant uniquement l'acrosome, ont été observés chez *Lumbricus* ; LANZAVECCHIA *et al.* (1972) émettent l'hypothèse que ces mouvements dépendent de courants cytoplasmiques dus à la présence de microtubules autour du noyau. Aucun élément dans le cas présent ne nous permet de la confirmer.

L'évolution ultérieure de la gaine acrosomique se fait à l'intérieur de la manchette de microtubules et comporte :

- 1) son allongement,
- 2) la différenciation de sa structure striée à trajet hélicoïdal,
- 3) la formation du bourrelet hélicoïdal,
- 4) la formation de l'extrémité.

Quel est le rôle des microtubules dans cette évolution ? Ils ne semblent pas intervenir dans l'allongement qui se fait probablement par adjonction de matériel provenant de la masse de substance dense à l'extrémité antérieure de la gaine, ce qui est conforme aux conclusions de FAWCETT *et al.* (1971). Par contre, il est intéressant de noter que l'acrosome garde une empreinte de la disposition finale des microtubules représentée par le trajet hélicoïdal du bourrelet et des tubules de la gaine. L'existence d'une interaction entre l'évolution de la manchette de microtubules et celle de l'acrosome est donc très probable et si l'on admet un rôle inducteur des microtubules au niveau du noyau, il est tentant de l'étendre à l'organisation de la structure de la gaine acrosomique comme nous l'avons fait précédemment.

Une autre particularité de cette spermiogénèse est représentée par la formation de la substance acrosomique ; en effet, la coiffe d'origine golgienne semble toujours vide. Le fait que le contenu des

vésicules claires golgiennes se déverse dans la coiffe laisse supposer que cette structure pourrait intervenir en modifiant la nature chimique du composé qu'elles contiennent ; le produit final étant la substance acrosomique.

Le problème de la migration de la substance dense à l'intérieur de la gaine reste posé. Cette évolution se produit en effet quand la gaine a acquis sa longueur définitive ce qui ne permet pas de retrouver l'hypothèse émise pour *Lumbricus* (LANZAVECCHIA *et al.*, 1972) : chez cette espèce on admet que c'est la position de la vésicule acrosomique entre la membrane plasmique, inextensible à ce stade, et le tube en croissance, qui provoque son passage à l'intérieur de ce dernier. GARAVAGLIA *et al.* (1974) estimant que les processus de spermiogénèse sont identiques chez les Oligochètes et les Hirudinées, représentent le matériel acrosomique en place dans la gaine entouré de la coiffe chez *Eryobdella*. Nous n'avons jamais observé ce passage de la vésicule golgienne à l'intérieur du tube chez *P. geometra* et *B. torpedinis*. La structure finale de l'acrosome peut simplement dériver d'une différenciation de la couche externe de la substance acrosomique comme on peut le voir sur la figure 193. Rien ne nous est cependant connu du rôle que pourraient jouer, dans la migration du matériel acrosomique, d'une part les premiers éléments différenciés à l'intérieur de la gaine : cylindres central et intermédiaire et d'autre part la baguette axiale d'apparition très tardive et dont la différenciation s'opèrerait peut-être à partir du matériel opaque aux électrons contenu dans l'extrémité acrosomique. Se basant sur des observations faites en microscopie photonique, TUZET (1950), DAMAS (1964c) font dériver une partie de l'acrosome, appelée par ces auteurs stéréocil, d'un centriole. L'étude de la spermiogénèse de ces deux *Piscicolidae* ne nous a pas permis de retrouver cette filiation. WEBSTER et RICHARDS (1977) ont observé chez l'Oligochète *L. rivalis* la formation de l'ébauche de la gaine au contact d'un centriole et estiment que, chez les Hirudinées, la structure observée, cylindre central duquel part du matériel disposé en rayons (Fig. 159), est suffisante pour en faire un dérivé centriolaire. Un élément en faveur de cette hypothèse pourrait être le fait que l'axe du centriole et celui de l'ébauche de la gaine forment entre eux un angle de 90°, comme nous l'avons observé sur toutes les coupes passant par un plan favorable (Fig. 157). Nous n'avons cependant jamais observé de contiguïté entre ces deux organites.

L'étude de la spermiogénèse et des spermatozoïdes de *P. geometra* et *B. torpedinis* nous a amené, dans un but de comparaison, à nous intéresser à ceux des autres espèces d'Hirudinées.

#### d - Etude comparative des spermatozoïdes d'Hirudinées

Nous avons étudié successivement les spermatozoïdes des espèces appartenant à l'ordre des Gnathobdelles, *H. medicinalis* (L.), *Haemopis sanguisuga* (L.) ; à celui des Pharyngobdelles, *E. octoculata* (L.) et *E. testacea* (Sav.) ; et à celui des Rhynchobdelles, *G. complanata* (L.), *H. marginata* (O.F.Müller), espèces qui avec *P. geometra* et *B. torpedinis* ont fait l'objet d'une publication (WISSOCQ et MALECHA, 1975). Pour cette raison nous nous contenterons de présenter uniquement des schémas dans ce travail. Nous avons depuis, complété cette étude en y adjoignant les gamètes mâles de *G. heteroclita* (L.), *H. stagnalis* (L.), *T. tessulatum* (O.F. Müller), Hirudinées communes de la faune française. L'utilisation des coupes ultrafines nous est rapidement apparue comme insuffisante pour comprendre d'une manière parfaite l'architecture véritable de ces gamètes caractérisés par une extrême longueur pour un très faible diamètre (Fig. 201). Aussi avons-nous jugé indispensable d'utiliser la technique de coloration négative, grâce à l'acétate d'uranyle, mise au point par HUXLEY et ZUBAY (1960). Cette technique permet non seulement de montrer la forme des objets mais encore de révéler certains détails internes. Les résultats obtenus grâce à cette méthode nous ont permis de mettre en évidence des aspects morphologiques importants, de comparer la structure de spermatozoïdes d'espèces appartenant à des ordres, familles et genres différents et d'éviter certaines erreurs d'interprétation inéluctables lorsqu'on utilise dans ce cas uniquement la technique des coupes ultrafines.

#### α - Résultats

Tous les spermatozoïdes ont l'aspect de fins filaments et sont caractérisés par la succession de l'avant vers l'arrière de 4 parties :

- l'acrosome comprenant un apex très différencié se distinguant du reste par l'absence de substance acrosomique. Nous appelons acrosome, l'ensemble des structures se trouvant en avant du noyau sans préjuger de leurs fonctions.

- le noyau ayant toujours une structure hélicoïdale.

- la mitochondrie unique, rectiligne sauf chez les *Glossiphoniidae* où elle peut être partiellement (*G. complanata*) ou entièrement hélicoïdale. Des coupes ultrafines permettent de voir généralement entre la paroi mitochondriale et la membrane cellulaire une couche de substance opaque aux électrons pouvant prendre quelquefois un aspect myélinique (*P. geometra*).

- le flagelle, souvent très long, issu d'un centriole unique situé à la base de la mitochondrie et se prolongeant généralement par une

pièce terminale, atubulaire. Les microtubules flagellaires ont un trajet hélicoïdal.

Nous avons rassemblé dans les tableaux 9 et 10 les principales caractéristiques morphologiques et numériques des spermatozoïdes étudiés. Les parties montrant des différences marquées seront traitées en détail. Par contre, en ce qui concerne les mitochondries et flagelles, seuls seront vus les points importants.

\* Ordre des Gnathobdelles

Espèces étudiées : *H. medicinalis* (Figs 200<sub>1</sub> à 200<sub>5</sub>) et *H. sanguisuga*.

\*\* Acrosome (Figs 200<sub>1</sub> et 200<sub>2</sub>)

Il est formé par une gaine cylindrique à l'intérieur de laquelle s'enroulent en hélices de fines fibrilles de 45 Å environ de large. L'angle d'obliquité de ces fibrilles par rapport à l'axe du spermatozoïde est élevé : 70° environ. La gaine émet, à sa surface externe, une sorte de bourrelet ayant un trajet hélicoïdal. A l'intérieur se trouve un contenu opaque aux électrons : la substance acrosomique, qui est généralement expulsée lors de la coloration des spermatozoïdes. La structure de l'acrosome est très semblable chez *H. medicinalis* et *H. sanguisuga*. Les différences portent sur la longueur et le nombre de tours de spire de l'hélice du bourrelet hélicoïdal (Tableau 9).

L'acrosome comprend un apex très long (Tableau 9) au niveau duquel les fibrilles de la gaine disparaissent. L'axe de cet apex montre une périodicité de 260 à 280 Å environ qui semble propre aux Gnathobdelles.

\*\* Noyau

En coloration négative, il paraît formé par deux fibres hélicoïdales qui ne sont pas indépendantes comme le pensait PASTISSON (1965) mais correspondent à deux épaisissements opposés de la lame nucléaire (Fig. 200<sub>2-3</sub>). En raison de la variation morphologique de la double hélice nucléaire depuis la pièce intermédiaire jusqu'à l'acrosome, nous avons distingué trois portions successives dans le noyau. Nous tenons cependant à souligner que cette division est quelque peu arbitraire car la transformation morphologique s'effectue progressivement tout au long du noyau. Nous avons distingué :

- une portion basale près de la pièce intermédiaire (Fig. 200<sub>5</sub>) caractérisée par deux fibres d'un pas de 0,24 à 0,27 μ,
- une partie médiane où les deux fibres nucléaires tendent à s'estomper (Fig. 200<sub>4</sub>). Sur coupes transversales le noyau

Tableau 9 - Caractéristiques morphologiques et numériques des spermatozoïdes de quelques espèces d'Hirudinées.

Remarques: 1 - Il s'agit du diamètre de la base de l'axe de l'apex acrosomique, non comprise l'épaisseur du bourrelet hélicoïdal.  
2 - Diamètre de l'acrosome non comprise l'épaisseur du bourrelet.

ORDRES	GNATHOBDELLES		PHARYNGOBDELLES		RHYNCHOBDELLES	
FAMILLES	<i>Hirudidae</i>		<i>Erpobdellidae</i>		<i>Fiscicolidae</i>	
Espèces	<i>Hirudo medicinalis</i> (L.)	<i>Haemopsis sanguisuga</i> (L.)	<i>Erpobdella octoculata</i> (L.)	<i>Erpobdella testacea</i> (Sav.)	<i>Fiscicola geometra</i> (L.)	<i>Branchellion torpedinis</i> (Sav.)
<b>Apex acrosomique</b>						
Longueur	3,3 $\mu$ $\pm$ 0,2 $\mu$	3 $\mu$ $\pm$ 0,3 $\mu$	2 $\mu$ $\pm$ 0,2 $\mu$	2 $\mu$ $\pm$ 0,2 $\mu$	4 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	3 $\mu$ $\pm$ 0,2 $\mu$
Diamètre(1)	500 $\text{\AA}$ $\pm$ 50 $\text{\AA}$	800 $\text{\AA}$ $\pm$ 75 $\text{\AA}$	0,1 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,1 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,1 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,2 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$
Epaisseur du bourrelet hélicoïdal (BH)	470 $\text{\AA}$ $\pm$ 60 $\text{\AA}$	500 $\text{\AA}$ $\pm$ 50 $\text{\AA}$	650 $\text{\AA}$ $\pm$ 50 $\text{\AA}$	800 $\text{\AA}$ $\pm$ 50 $\text{\AA}$	500 $\text{\AA}$ $\pm$ 75 $\text{\AA}$	700 $\text{\AA}$ $\pm$ 75 $\text{\AA}$
Nombre de tours de spire du BH	4 $\pm$ 5	4 - 4,5	2	2	7 - 8	7 - 7,5
Pas des spires du BH	0,55 $\mu$ $\pm$ 0,05 $\mu$	0,5 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,6 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,5 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,47 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,4 $\mu$ 0,25 $\mu$ base avant
<b>Acrosome (sans l'apex)</b>						
Longueur	2,3 $\mu$ $\pm$ 0,2 $\mu$	3 $\mu$ $\pm$ 0,3 $\mu$	3,5 $\mu$ $\pm$ 0,3 $\mu$	3,1 $\mu$ $\pm$ 0,3 $\mu$	16 $\mu$ $\pm$ 0,05 $\mu$	36 $\mu$ $\pm$ 2 $\mu$
Diamètre(2)	0,1 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,10 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,19 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,18 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,2 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,28 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$
Epaisseur du BH	450 $\text{\AA}$ $\pm$ 60 $\text{\AA}$	450 $\text{\AA}$ $\pm$ 50 $\text{\AA}$	500 $\text{\AA}$ $\pm$ 50 $\text{\AA}$	550 $\text{\AA}$ $\pm$ 50 $\text{\AA}$	450 $\text{\AA}$ $\pm$ 50 $\text{\AA}$	550 $\text{\AA}$ $\pm$ 50 $\text{\AA}$
Nombre de tours de spire du BH	4,5	6 - 6,5	7 - 7,5	7	35	72 $\pm$ 3
Pas des spires du BH	0,5 $\mu$ $\pm$ 0,05 $\mu$	0,5 $\mu$ $\pm$ 0,05 $\mu$	0,48 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,46 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,45 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,5 $\mu$ $\pm$ 0,05 $\mu$
Largeur des fibrilles de la gaine	45 $\text{\AA}$ $\pm$ 15 $\text{\AA}$	40 $\text{\AA}$ $\pm$ 15 $\text{\AA}$	40 $\text{\AA}$ $\pm$ 15 $\text{\AA}$	45 $\text{\AA}$ $\pm$ 15 $\text{\AA}$	50 $\text{\AA}$ $\pm$ 10 $\text{\AA}$	50 $\text{\AA}$ $\pm$ 20 $\text{\AA}$
Intervalle entre les fibrilles	80 $\text{\AA}$ $\pm$ 15 $\text{\AA}$	80 $\text{\AA}$ $\pm$ 15 $\text{\AA}$	80 $\text{\AA}$ $\pm$ 20 $\text{\AA}$	75 $\text{\AA}$ $\pm$ 20 $\text{\AA}$	75 $\text{\AA}$ $\pm$ 15 $\text{\AA}$	80 $\text{\AA}$ $\pm$ 20 $\text{\AA}$
Angle d'obliquité des fibrilles	72° $\pm$ 5°	70° $\pm$ 5°	57° $\pm$ 7°	62° $\pm$ 5°	50° $\pm$ 3°	52° $\pm$ 4°
Baguette acrosomique			oui	?	oui (4 $\mu$ /0,1 $\mu$ )	oui (0,3 $\mu$ /0,15 $\mu$ )
<b>Noyau</b>						
Longueur	32 $\mu$ $\pm$ 2 $\mu$	29 $\mu$ $\pm$ 2 $\mu$	17 $\mu$ $\pm$ 1 $\mu$	16,5 $\mu$ $\pm$ 1 $\mu$	10 $\mu$ $\pm$ 0,4 $\mu$	6,3 $\mu$ $\pm$ 0,2 $\mu$
Diamètre	variable selon les parties	variable selon les parties	variable selon les parties	variable selon les parties	0,22 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,28 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$
Nombre de fibres nucléaires	2	2	2	2	3	3
Nombre de tours de spire	82 $\pm$ 2	72 $\pm$ 2	29 $\pm$ 1	38 $\pm$ 2	20	15
Pas des tours	variable selon les parties	variable selon les parties	variable selon les parties	variable selon les parties	0,46 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,4 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$
Nombre de parties nucléaires	3	3	2	2	1	1
<b>Partie distale</b>						
Longueur	10 $\mu$ $\pm$ 1 $\mu$	9 $\mu$ $\pm$ 1 $\mu$	11,5 $\mu$ $\pm$ 0,4 $\mu$	9,2 $\mu$ $\pm$ 0,3 $\mu$		
Diamètre	0,15 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,15 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,21 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,20 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$		
Nombre de tours de spire	22 $\pm$ 2	17 $\pm$ 2	22 $\pm$ 1	22 $\pm$ 2		
Pas des tours de spire	0,44 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,52 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,5 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,43 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$		
<b>Partie médiane</b>						
Longueur	18 $\mu$ $\pm$ 1 $\mu$	18 $\mu$ $\pm$ 1 $\mu$				
Diamètre	0,14 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,10 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$				
Nombre de tours de spire	40 $\pm$ 2	45 $\pm$ 2				
Pas des tours de spire	0,45 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,4 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$				
<b>Partie basale</b>						
Longueur	5 $\mu$ $\pm$ 0,5 $\mu$	2,5 $\mu$ $\pm$ 0,5 $\mu$	5 $\mu$ $\pm$ 0,3 $\mu$	7,5 $\mu$ $\pm$ 0,3 $\mu$		
Diamètre	0,18 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,18 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,25 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,25 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$		
Nombre de tours de spire	20 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1		
Pas des tours de spire	0,27 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,24 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,8 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,45 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$		
<b>Pièce intermédiaire</b>						
Longueur	15,5 $\mu$ $\pm$ 0,5 $\mu$	15 $\mu$ $\pm$ 1 $\mu$	11 $\mu$ $\pm$ 0,5 $\mu$	10 $\mu$ $\pm$ 0,7 $\mu$	13 $\mu$ $\pm$ 0,5 $\mu$	7 $\mu$ $\pm$ 0,5 $\mu$
Diamètre	0,25 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,25 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,3 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,27 $\mu$ $\pm$ 0,03 $\mu$	0,23 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,28 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$
Hélice mitochondriale	non	non	non	non	non	non
<b>Flagelle</b>						
Longueur totale	27 $\mu$ $\pm$ 1,5 $\mu$	24 $\mu$ $\pm$ 3 $\mu$	70 $\mu$ $\pm$ 5 $\mu$	63 $\mu$ $\pm$ 5 $\mu$	24 $\mu$ $\pm$ 2 $\mu$	47 $\mu$ $\pm$ 3 $\mu$
Longueur de la pièce terminale	1,8 $\mu$ $\pm$ 0,2 $\mu$	2,5 $\mu$ $\pm$ 0,4 $\mu$	40 $\mu$ $\pm$ 4 $\mu$	40 $\mu$ $\pm$ 4 $\mu$	1 $\mu$	1,2 $\mu$ $\pm$ 2,3 $\mu$
Diamètre de la partie antérieure, à tubules	0,22 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,23 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,15 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,18 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,15 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$	0,12 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$
Diamètre de la pièce terminale	0,12 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$		0,13 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$ 500 $\text{\AA}$ extrémité	0,13 $\mu$ $\pm$ 0,02 $\mu$ 500 $\text{\AA}$		300 $\text{\AA}$ $\pm$ 100 $\text{\AA}$

BUS  
LILLE

Tableau 10- Caractéristiques morphologiques et numériques des spermatozoïdes de quelques espèces d'Hirudinfes.

Remarques 1 - Il s'agit du diamètre de la base de l'axe de l'apex acrosomique, non comprise l'épaisseur du bourrelet hélicoïdal.

2 - Diamètre de l'acrosome non comprise l'épaisseur du bourrelet.

ORDRE	RHYNCHOBDELLES				
FAMILLE	Glossiphoniidae				
Espèces	<i>Glossiphonia heteroclita</i> (L.)	<i>Helobdella stagnalis</i> (L.)	<i>Theromyzon tessulatium</i> (O.F. Müller)	<i>Glossiphonia corpiolata</i> (L.)	<i>Kamolepsis marginata</i> (O.F. Müller)
<u>Apex acrosomique</u>					
Longueur	1,1 $\mu \pm 0,05 \mu$	2 $\mu \pm 0,2 \mu$	2,4 $\mu \pm 0,1 \mu$	1,5 $\mu \pm 0,2 \mu$	1,2 $\mu \pm 0,2 \mu$
Diamètre(1)	0,17 $\mu \pm 0,01 \mu$	0,2 $\mu \pm 0,04 \mu$	0,3 $\mu \pm 0,05 \mu$	600 $\text{Å} \pm 50 \text{Å}$	500 $\text{Å} \pm 75 \text{Å}$
Epaisseur du bourrelet hélicoïdal (BH)	600 $\text{Å} \pm 50 \text{Å}$	450 $\text{Å} \pm 50 \text{Å}$	750 $\text{Å} \pm 50 \text{Å}$	850 $\text{Å} \pm 50 \text{Å}$	700 $\text{Å} \pm 50 \text{Å}$
Nombre de tours de spire du BH	3,5	4	3	2,5 - 3	2,5 - 3
Pas des spires du BH	0,22 $\mu \pm 0,04 \mu$	0,39 $\mu \pm 0,04 \mu$	0,46 $\mu \pm 0,06 \mu$	0,42 $\mu \pm 0,03 \mu$	0,22 $\mu \pm 0,02 \mu$
<u>Acrosome (sans l'apex)</u>					
Longueur	7,7 $\mu \pm 0,2 \mu$	10,5 $\mu \pm 0,5 \mu$	55 $\mu \pm 2 \mu$	14 $\mu \pm 0,5 \mu$	8,7 $\mu \pm 0,5 \mu$
Diamètre(2)	0,18 $\mu \pm 0,01 \mu$	0,24 $\mu \pm 0,03 \mu$	0,3 $\mu \pm 0,03 \mu$	0,28 $\mu \pm 0,03 \mu$	0,13 $\mu \pm 0,02 \mu$
Epaisseur du BH	600 $\text{Å} \pm 50 \text{Å}$	0,14 $\mu \pm 0,01 \mu$	650 $\text{Å} \pm 50 \text{Å}$	800 $\text{Å} \pm 50 \text{Å}$	0,12 $\mu \pm 0,02 \mu$
Nombre de tours de spire du BH	20	16	145	21,5 - 22	35 $\pm 1$
Pas des spires du BH	0,38 $\mu \pm 0,02 \mu$	0,55 $\mu \pm 0,05 \mu$	0,36 $\mu \pm 0,02 \mu$	0,65 $\mu \pm 0,03 \mu$	0,25 $\mu \pm 0,03 \mu$
Largeur des fibrilles de la gaine			40 $\text{Å} \pm 15 \text{Å}$	40 $\text{Å} \pm 15 \text{Å}$	40 $\text{Å} \pm 20 \text{Å}$
Intervalle entre les fibrilles			80 $\text{Å} \pm 15 \text{Å}$	70 $\text{Å} \pm 10 \text{Å}$	70 $\text{Å} \pm 20 \text{Å}$
Angle d'obliquité des fibrilles	40° $\pm 2^\circ$	50° $\pm 3^\circ$	20° $\pm 2^\circ$	63° $\pm 5^\circ$	50° $\pm 5^\circ$
Baguette acrosomique	oui (0,11 $\mu/2,5\mu$ )	oui (0,13 $\mu/4,5\mu$ )	oui (0,17 $\mu/49,5 \mu$ )	oui (12 $\mu/0,12 \mu$ )	oui (7 $\mu/700 \text{Å}$ )
<u>Moyau</u>					
Longueur	16 $\mu \pm 1 \mu$	10 $\mu \pm 0,5 \mu$	6,4 $\mu \pm 0,3 \mu$	12 $\mu \pm 1 \mu$	6,8 $\mu \pm 0,5 \mu$
Diamètre	0,2 $\mu \pm 0,01 \mu$	0,33 $\mu \pm 0,04 \mu$	0,35 $\mu \pm 0,02 \mu$	0,28 $\mu \pm 0,04 \mu$	0,35 $\mu \pm 0,03 \mu$
Nombre de fibres nucléaires	1	1	1	1	1
Nombre de tours de spire	37	13	20	19	26 $\pm 1$
Pas des tours		0,85 $\mu \pm 0,05 \mu$	0,31 $\mu \pm 0,02 \mu$	0,6 $\mu \pm 0,05 \mu$	0,25 $\mu \pm 0,02 \mu$
Nombre de parties nucléaires	3	1	1	1	1
<u>Partie distale</u>					
Longueur	4,95 $\mu \pm 0,1 \mu$				
Diamètre	0,2 $\mu \pm 0,01 \mu$				
Nombre de tours de spire	12				
Pas des tours de spire	0,42 $\mu \pm 0,01 \mu$				
<u>Partie médiane</u>					
Longueur	8,2 $\mu \pm 0,1 \mu$				
Diamètre	0,2 $\mu \pm 0,01 \mu$				
Nombre de tours de spire	20				
Pas des tours de spire	0,38 $\mu$				
<u>Partie basale</u>					
Longueur	2,85 $\mu \pm 0,1 \mu$				
Diamètre	0,2 $\mu \pm 0,01 \mu$				
Nombre de tours de spire	5				
Pas des tours de spire	0,55 $\mu$				
<u>Pièce intermédiaire</u>					
Longueur	17 $\mu \pm 1 \mu$	5,2 $\mu \pm 0,2 \mu$	2,5 $\mu \pm 0,15 \mu$	6 $\mu \pm 0,5 \mu$	3,5 $\mu \pm 0,5 \mu$
Diamètre		0,35 $\mu \pm 0,05 \mu$	0,5 $\mu \pm 0,05 \mu$	0,3 $\mu \pm 0,02 \mu$	0,3 $\mu \pm 0,03 \mu$
Hélice mitochondriale	oui	oui	non	oui partiellement	oui
Nombre de tours de spire	34	7			
Pas des tours de spire	0,45 $\mu \pm 0,05 \mu$	0,7 $\mu \pm 0,05 \mu$			
<u>Flagelle</u>					
Longueur totale	148 $\mu \pm 5 \mu$	51 $\mu \pm 3 \mu$	39 $\mu \pm 3 \mu$	60 $\mu \pm 5 \mu$	47 $\mu \pm 3 \mu$
Longueur de la pièce terminale	40 $\mu \pm 3 \mu$	3,4 $\mu \pm 0,1 \mu$	7,3 $\mu \pm 0,1 \mu$	22 $\mu \pm 2 \mu$	7,5 $\mu \pm 0,5 \mu$
Diamètre de la partie antérieure, à tubules	0,12 $\mu \pm 0,02 \mu$	0,15 $\mu \pm 0,02 \mu$	0,20 $\mu \pm 0,02 \mu$	0,18 $\mu \pm 0,02 \mu$	0,15 $\mu \pm 0,03 \mu$
Diamètre de la pièce terminale	0,1 $\mu \rightarrow$ extrémité 625 $\text{Å}$	0,12 $\mu \pm 0,01 \mu$ extrémité 600 $\text{Å}$	0,25 $\mu \rightarrow$ extrémité 0,17 $\mu$	0,1 $\mu \rightarrow$ 500 $\text{Å}$	0,12 $\mu \pm 0,04 \mu$



ne semble formé que par un seul élément. Vers l'avant de cette portion médiane les deux fibres s'individualisent à nouveau (Fig. 200<sub>3</sub>).

- une région antérieure ou distale, proche de l'acrosome où l'une des fibres nucléaires conserve un trajet hélicoïdal et s'enroule autour de l'autre qui tend à devenir rectiligne (Fig. 200<sub>2</sub>). La fibre à trajet hélicoïdal s'aplatit et prend la forme d'une membrane ondulante (Fig. 200<sub>2</sub>). Sur coupes transversales, cette zone prend l'aspect de virgules, dont la queue correspond à la fibre élargie et hélicoïdale.

\* Ordre des Pharyngobdelles

Espèces étudiées : *E. octoculata* (Figs 200<sub>6</sub> à 200<sub>8</sub>) et *E. testacea*.

\*\* Acrosome (Figs 200<sub>6</sub>, 200<sub>7</sub>)

Il est de taille assez comparable à celle de l'acrosome des Gnathobdelles. La gaine montre, outre un bourrelet hélicoïdal, des fibrilles hélicoïdales de 40 Å environ de large. Leur angle d'obliquité par rapport à l'axe du spermatozoïde est de 55 à 60°. Nous avons souvent pu observer, en coloration négative, l'extrusion de la substance acrosomique qui se réalise grâce à la présence d'une ouverture de la gaine de 850 Å environ de diamètre à la base de l'apex. A ce niveau, la substance acrosomique n'est séparée du milieu extérieur que par la membrane cellulaire. Dans l'axe et à la base de l'acrosome, des coupes ultrafines ont révélé la présence d'un élément allongé, plus clair que le contenu acrosomique. On peut le considérer comme l'équivalent de la baguette que nous avons décrite chez *Piscicola*. L'apex acrosomique est comparable à celui des Gnathobdelles, mais moins long (Tableau 9), et son axe ne présente pas de périodicité.

\*\* Noyau

Il est formé de deux fibres hélicoïdales. La région basale proche de la pièce intermédiaire montre une double hélice d'environ sept tours de spire dont la caractéristique principale réside dans le fait que les deux fibres nucléaires sont de largeur inégale (Fig. 200<sub>8</sub>) : l'une mesure environ 900 Å et l'autre le double : 1800 Å. Assez brusquement les fibres redeviennent d'égale largeur (1400 Å) dans la partie distale (Fig. 200<sub>7</sub>).

\*\* Flagelle

Il est très long (70 µ) mais très particulier. Il est formé d'une pièce terminale sans microtubules d'une longueur (40 µ) supérieure à celle de la partie antérieure (30 µ) contenant neuf

doublets périphériques à trajet hélicoïdal qui se terminent à l'intérieur même de l'axe clair de la pièce terminale. Leurs extrémités ne se situent pas au même niveau et, en coupe transversale, on remarque dans l'axe clair de la pièce terminale un nombre variable (8 à 2) de sections tubulaires. Dans cette zone de transition, sous la membrane du flagelle apparaît un cortex de substance opaque aux électrons, qui s'élargit progressivement prenant peu à peu la place des microtubules périphériques. La substance opaque finit par remplir tout le cylindre sauf un axe de section assez irrégulière de 100 à 250 Å environ de diamètre. Il est à remarquer que très souvent, les microtubules flagellaires présentent une périodicité de 80 Å environ.

\* Ordre des Rhynchobdelles -

Famille des Glossiphoniidae

Espèces étudiées : *G. complanata* (Figs 200<sub>9</sub> et 200<sub>10</sub>), *H. marginata* (Figs 200<sub>11</sub> à 200<sub>13</sub>), *G. heteroclita* (Figs 201 à 205), *H. stagnalis* (Figs 206 à 209), *T. tessulatum* (Figs 210 à 217).

\*\* Acrosome

Chez les *Glossiphoniidae* le bourrelet de la gaine acrosomique offre très généralement l'aspect d'une véritable membrane ondulante (Fig. 200<sub>9</sub>). Chez ces espèces l'acrosome renferme une sorte de baguette axiale très longue (Tableau 10), elle atteint par exemple 49,5 μ chez *T. tessulatum* et 12 μ chez *G. complanata*. Sur certaines colorations négatives favorables (*G. complanata*) et en coupes ultrafines, elle montre une périodicité perpendiculaire à l'axe (Figs 212 et 213). Nous avons observé chez *T. tessulatum* une périodicité parallèle à l'axe (Fig. 212) et sur coupes transversales (Fig. 215), cette baguette apparaît formée de tubules d'un diamètre de 75 Å. Elle se termine, au contact du noyau, par une courte pièce où cette structure périodique disparaît (Figs 213 et 214). La gaine acrosomique renferme aussi des fibrilles hélicoïdales (Fig. 212). L'apex acrosomique est très court (1,1 à 2,4 μ) (Tableau 10). Notre interprétation de l'acrosome des *Glossiphoniidae* diffère de celle qu'a adoptée DAMAS (1974) dans son étude du spermatozoïde de *G. complanata*. Elle appelle en effet acrosome la partie située entre la base de l'apex et le matériel à structure périodique qu'elle dénomme filament pré-nucléaire. La partie dense et homogène située au contact du noyau est désignée sous le terme de baguette axiale. Pour cet auteur, le filament pré-nucléaire et la baguette axiale (nous avons appelé l'ensemble de ces deux éléments "baguette acrosomique") représentent le stéréocil qu'elle a décrit en microscopie photonique (DAMAS, 1964c). Cette interprétation nous semble peu fondée, en effet, comme

nous l'avons vu dans la spermiogénèse, le seul constituant de l'acrosome dont l'origine centriolaire pourra peut-être être démontrée, est la gaine et c'est donc à elle seule que s'appliquerait le terme de stéréocil. En outre seule une étude s'attachant à définir l'origine de la baguette acrosomique chez les Hirudinées permettra de trouver des homologues certaines entre les différents groupes. DAMAS n'utilisant pour son étude que les coupes ultrafines n'a pas observé l'apex acrosomique.

**\*\* noyau**

Il est formé d'une seule fibre enroulée en hélice. L'aspect du noyau peut être cependant différent selon que les tours de spire sont serrés (*H. marginata* (Fig. 200<sub>13</sub>), *T. tessulatum* (Fig. 217), et partie médiane du noyau de *G. heteroclita* (Fig. 204)) ou lâches (*G. complanata* (Fig. 200<sub>10</sub>), *H. stagnalis* (Fig. 208), et parties antérieure et postérieure du noyau de *G. heteroclita* (Fig. 204)). Dans quatre cas sur cinq la morphologie du noyau est invariable sur toute sa longueur, sauf chez *G. heteroclita* où l'on distingue trois parties (Fig. 204). Chez *G. complanata*, la technique de coloration négative nous a permis de montrer nettement que le noyau était formé d'une seule fibre et non de deux comme l'affirme DAMAS (1974).

**\*\* Pièce intermédiaire**

Chez *H. marginata*, *G. heteroclita*, *H. stagnalis*, la mitochondrie est enroulée en hélice (Figs 205, 207), par contre chez *G. complanata* elle reste rectiligne sur toute sa longueur sauf vers son extrémité antérieure où un à deux tours de spire sont ébauchés. La seule espèce à avoir une mitochondrie entièrement rectiligne est *T. tessulatum* (Fig. 217). Il faut également noter la très grande longueur (17 µ) de la mitochondrie de *G. heteroclita* (Fig. 205).

**β - Discussion**

Avant de comparer les spermatozoïdes des Hirudinées à ceux des autres embranchements ou classes d'une part, entre-eux d'autre part, il nous a semblé utile de dégager leurs caractéristiques.

**\* Caractéristiques principales des spermatozoïdes d'Hirudinées**

**\*\* Acrosome**

Tous les spermatozoïdes d'Hirudinées renferment un acrosome présentant deux portions pouvant être de longueur sensiblement égale chez certaines espèces (Gnathobdelles). La région apicale de l'acrosome ne contient pas de substance acrosomique et le prolongement de

la gaine acrosomique n'y présente plus de fibrilles hélicoïdales. L'absence de substance acrosomique dans l'apex s'explique aisément par l'étude de la spermiogenèse. Nous avons en effet montré que cette substance pénètre dans l'acrosome à la base de son apex, et envahit l'intérieur du cylindre délimité par la gaine, jusqu'à la zone contiguë au noyau.

Tous les spermatozoïdes présentent aussi ce que nous avons appelé un bourrelet hélicoïdal. Il correspond à un repli externe et hélicoïdal de la gaine acrosomique, recouvert par la membrane cellulaire, allant de la base à l'apex de l'acrosome où il finit par se confondre avec l'axe.

Il existe en outre, dans l'axe et à la base de l'acrosome, une sorte de baguette qui peut être extrêmement courte (*B. torpedinis*) ou au contraire très développée (*Glossiphoniidae*). Dans cette famille, elle peut atteindre 49,5  $\mu$  de long (ex : *T. tessulatum*) et présente une périodicité transversale très nette. Cette baguette, en raison de sa position, peut être considérée comme homologue de la baguette acrosomique ("acrosomal rod") rencontrée dans les spermatozoïdes d'Oligochètes et en particulier chez *Lumbricus terrestris* (ANDERSON *et al.*, 1968).

#### \*\* Noyau

Tous les noyaux sont de forme hélicoïdale. Les différences portent sur le nombre de fibres nucléaires hélicoïdales et leur morphologie. On peut ainsi distinguer trois catégories de spermatozoïdes selon qu'ils possèdent une fibre (*Glossiphoniidae*), deux (Gnathobdelles - Pharyngobdelles) ou trois (*Piscicolidae*).

Il faut souligner que les fibres nucléaires ne sont jamais indépendantes mais sont issues d'un axe commun. (Nous avons conservé ce terme de fibre car il illustre bien les images observées en coloration négative).

Nous avons enfin toujours constaté que le sens de l'enroulement des hélices de l'acrosome ou du noyau était identique pour tout le gamète.

#### \*\* Flagelle

Il faut d'abord noter que chez aucune des espèces étudiées n'existe de manchon externe supplémentaire de neuf fibres dans la région antérieure du flagelle. Comme l'ont montré ANDERSON et PERSONNE (1970), il existe toujours des particules de glycogène dans la portion antérieure du flagelle et nous avons constaté qu'ils étaient alignés le long des tubules et suivaient leur trajet hélicoïdal.

Les microtubules peuvent occuper la presque totalité de la longueur du flagelle : Gnathobdelles, *Piscicolidae*. Au contraire, chez les *Glossiphoniidae* et surtout les Pharyngobdelles, les microtubules ne sont présents que dans la portion antérieure du flagelle, laissant une pièce terminale très longue, atubulaire et remplie d'une substance opaque traversée par un axe clair. Des flagelles, à pièce terminale aussi longue et si particulière ne semblent pas encore avoir été décrits. Les microtubules ont aussi un trajet hélicoïdal et peuvent présenter une périodicité transversale signalée assez fréquemment (BARDELE, 1973).

\* Comparaison entre les spermatozoïdes d'Hirudinées et ceux des autres embranchements ou classes

Les importants travaux de RETZIUS (1904 et 1905) et FRANZEN (1955 et 1956) sur les spermatozoïdes des Invertébrés ont permis de mettre en évidence deux types fondamentaux de gamètes :

- les spermatozoïdes primitifs, présentant une tête sphérique ou conique, une pièce intermédiaire renfermant un faible nombre de mitochondries, un long flagelle et,

- les spermatozoïdes évolués caractérisés essentiellement par un allongement de la tête et de la pièce intermédiaire, une augmentation du nombre de mitochondries ou du volume du chondriome, une accentuation de la complexité de l'appareil moteur.

TUZET (1950) et FRANZEN (1956) ont très justement rapproché la structure des éléments germinaux mâles de leur mode de transmission à l'organisme femelle. Ils ont ainsi montré que, dans la majorité des cas, le sperme du type primitif se différenciait chez des espèces à fécondation externe. L'allongement et les transformations structurales des gamètes dérivant du type primitif étaient à mettre en parallèle avec d'autres modes de fécondation, tels que la copulation, la pseudocopulation, les spermatophores, la copulation dermique ou traumatique.

Chez les Hirudinées, la copulation se rencontre chez les Gnathobdelles, la copulation dermique s'observe chez les Pharyngobdelles et Rhynchobdelles. Ce dernier mode de reproduction consiste en un dépôt de spermatophores à la surface de la peau de l'Annélide, les spermatozoïdes, après avoir traversé les tissus, parviennent aux ovaires pour féconder les oeufs. Les modalités de reproduction, chez les Hirudinées, sont donc assez complexes et les gamètes mâles appartiennent au type évolué.

L'embranchement des Annélides s'avère donc extrêmement intéressant quant aux corrélations existant entre le mode de fé-

condation et la structure des éléments sexuels mâles. Dans la classe des Polychètes, la fécondation est externe. Si parfois certains gamètes ont un acrosome assez complexe, comme celui de *Nereis irrorata* (DEFRETIN *et al.*, 1974), ou une forme allongée, comme celui de *Spirorbis pagenstecheri* (FRANZEN, 1956), leur morphologie générale est du type primitif. Chez les Oligochètes, où la fécondation est interne, les spermatozoïdes sont longs, complexes, et appartiennent au type évolué (ANDERSON *et al.*, 1968 ; LANZAVECCHIA *et al.*, 1972). Ils apparaissent ainsi beaucoup plus proches des gamètes d'Hirudinées que de ceux des Polychètes. Certains ont même une morphologie hélicoïdale (*Branchiobdellidae*) (FRANZEN, 1962 ; BONDI *et al.*, 1976).

La théorie de FRANZEN, qui semble valable en ce qui concerne les rapports entre le mode de fécondation et le degré d'évolution gamétique, est ici trop générale pour apporter une explication au développement si important des structures hélicoïdales dans les spermatozoïdes d'Hirudinées. Certes, puisque les Pharyngobdelles et Rhynchobdelles présentent une copulation dermique, on pourrait penser qu'il existe une corrélation entre ce mode d'insémination et la présence d'hélices. Cette explication nous semble peu fondée, pour deux raisons : d'une part, les Gnathobdelles ont une fécondation normale et leurs spermatozoïdes sont torsadés ; d'autre part, les autres Invertébrés présentant une copulation dermique (cités par AFZELIUS, 1971), comme quelques Turbellariés, les Myzostomides (JAGERSTEN, 1939), les Onychophores (MANTON, 1938), certains Rotifères tel *Asplanchna* (KOEHLER, 1965), ne semblent pas posséder de gamètes constitués d'hélices.

Par contre, il semble ressortir de la comparaison entre les spermatozoïdes à structure hélicoïdale, une corrélation nette entre la présence d'hélices et les dimensions gamétiques. Les gamètes ou portions de gamètes de morphologie hélicoïdale sont souvent très longs et étroits. FRANZEN (1967) signale chez les Mollusques Céphalopodes la présence d'un acrosome et d'un noyau hélicoïdaux chez *Eledona moschata*, d'un acrosome hélicoïdal chez *Octopus vulgaris* et *O. defilippi*. Chez *Octopus bimaculata*, l'hélice acrosomique correspond à une sorte de bourrelet de la gaine acrosomique comme chez les Hirudinées (LONGO *et al.*, 1970). Inversement, le spermatozoïde de *Sepia officinalis*, de forme assez trapue, ne possède pas d'hélices (RICHARD, 1971). Des structures torsadées ont été décrites chez des gamètes mâles allongés de Mollusques Gastéropodes (LANZA *et al.*, 1964), de Myriapodes (DESCAMPS, 1972 ; HORSTMANN, 1968), de Crustacés Ostracodes (REGER, 1970 ; ZISSLER, 1969) et d'Oiseaux Passeriformes (McFARLANE, 1963 ; NICANDER, 1970).

Toutefois, certains spermatozoïdes très étroits et de grande longueur n'apparaissent pas toujours hélicoïdaux. En particulier, les gamètes mâles des Archi-annélides, *Protodrilus rubropharyngeus*, ont une pièce intermédiaire de 70  $\mu$  de long sur 0,5  $\mu$  de large, et ceux de *Dinophylus sp.* mesurent 133  $\mu$  de long sur 0,5  $\mu$  de large (FRANZEN, 1956). Cependant, il n'est pas absolument certain qu'ils ne possèdent pas de structures hélicoïdales, car ils ont été observés en microscopie photonique.

Tous ces exemples montrent une relation nette entre les éléments hélicoïdaux et la finesse des spermatozoïdes. ANDRE (1970) a émis l'hypothèse qu'un objet allongé et hélicoïdal ploie plus facilement qu'un autre objet de même nature et de même diamètre, mais rectiligne. L'élément hélicoïdal résiste moins à une force appliquée transversalement ou obliquement à son allongement. L'énergie mise en jeu pour faire onduler un spermatozoïde à structure hélicoïdale est donc plus faible que pour un gamète massif. Nous estimons cependant que cette plus grande souplesse du spermatozoïde à éléments hélicoïdaux lui confère une résistance supérieure compensant la fragilité liée à sa longueur importante pour son très faible diamètre. Cette finesse, assez exceptionnelle dans le règne animal, des spermatozoïdes d'Hirudinées ne serait peut-être pas sans rapport avec le mode de copulation dermique d'un grand nombre d'espèces. Les éléments sexuels mâles pourraient de la sorte s'insinuer facilement entre les cellules des tissus. Il est également possible que, chez les espèces à copulation traumatique, la plus faible longueur des noyaux et la présence éventuelle de trois fibres nucléaires (*Piscicolidae*) confèrerait une plus grande résistance, à l'inverse des spermatozoïdes des espèces de l'ordre des Gnathobdelles, à copulation normale, chez lesquelles la portion nucléaire est très longue et constituée de deux fibres. L'hypothèse d'un renforcement des spermatozoïdes par l'enroulement en hélice de ses propres organites nous semble donc la plus vraisemblable. C'est essentiellement sur le rôle du milieu dans lequel évoluent les gamètes au cours de la fécondation, sur l'acquisition des structures hélicoïdales qu'insistent WEBSTER et RICHARDS (1977) en discutant de notre hypothèse. Ces auteurs citent l'exemple de *L. terrestris* et *L. rivalis* dont les noyaux ont le même diamètre, le second étant torsadé et le premier rectiligne. De même chez *Tubifex* qui a un gamète de diamètre inférieur à celui de *L. rivalis*, le pas de l'hélice est de 1  $\mu$  alors qu'il est de 0,2  $\mu$  à 0,3  $\mu$  pour le dernier. Les *Glossiphoniidae* nous donnent également un exemple : sur les six espèces étudiées, seule *T. tessulatum* n'a pas de mitochondrie hélicoïdale, or elle a un comportement reproducteur exceptionnel pour ce groupe puisqu'elle est à copu-

lation normale. De ce fait un renforcement de la résistance mécanique de la mitochondrie ne serait plus nécessaire.

L'explication avancée par McFARLANE (1963), selon laquelle les hélices permettraient un déplacement hélicoïdal des gamètes, confond, selon nous, l'effet et la cause. Quant au rôle possible des hélices de l'acrosome dans l'éjection de sa substance, par augmentation des tours de spire, elle nous semble peu probable. Nous n'avons jamais observé de rétrécissement de la gaine acrosomique, ni de changements dans l'obliquité des tours de spire chez des gamètes dont l'acrosome était vide ou son contenu en cours d'expulsion. De plus, cette hypothèse ne fournirait aucune explication pour la présence des hélices nucléaires et mitochondriales.

En conclusion, il nous semble logique de penser que les gamètes des Hirudinées ont subi une transformation structurale assez complexe en raison de leur mode particulier de fécondation et ont acquis des structures hélicoïdales leur permettant de compenser la fragilité due à leur amincissement. Cette hypothèse, déjà émise par ANDRE, à propos des pièces intermédiaires des gamètes de Mammifères, semble étayée par de nombreux exemples.

\* Relations entre la structure des spermatozoïdes  
et la classification des Hirudinées

Il est actuellement bien connu (article de synthèse de BACETTI et AFZELIUS, 1976) que les variations interspécifiques des spermatozoïdes sont très importantes et apportent des éléments non négligeables pour l'étude de la phylogénie des différents groupes. Il ne faut cependant pas perdre de vue le fait que la morphologie de ces gamètes est d'abord influencée par la nature de l'environnement où a lieu la fécondation (FAWCETT, 1970), ce dont nous avons discuté précédemment. L'examen des divers spermatozoïdes montre qu'il ne semble pas exister de différence fondamentale entre ceux transmis par une copulation normale et ceux qui le sont au moyen d'un spermatophore. Un exemple est donné par la famille des *Glossiphoniidae* où le gamète de *T. tessulatum* (copulation normale) ne diffère de celui des autres (spermatophores) que par une mitochondrie rectiligne. Il est donc possible que, mis à part le degré de torsion en hélice qui traduirait divers degrés de résistance du milieu que doivent traverser les spermatozoïdes au cours de la fécondation, les autres différences constatées soient d'ordre phylogénique. Après avoir dégagé les caractères propres à chaque ordre, famille, nous discuterons des informations qu'elles nous fournissent pour la systématique de ce groupe.

Dans l'ordre des Gnathobdelles, extrémité acrosomique et acrosome, tous deux de faible longueur, sont presque de même taille. L'apex acrosomique présente une périodicité perpendiculaire à l'axe, que nous n'avons pas retrouvée dans les autres ordres. L'obliquité des fibrilles de la gaine est bien plus élevée (70° environ) que chez les autres espèces. La morphologie nucléaire est la plus complexe en raison de la distinction de trois parties. Le noyau est formé de deux fibres. Le flagelle se termine par une portion atubulaire très courte.

Dans l'ordre des Pharyngobdelles, l'acrosome est un peu plus long que son apex. L'obliquité des fibrilles de la gaine est plus faible que chez les Gnathobdelles mais se rapproche de celle des Rhynchobdelles. Le noyau est, comme chez les Gnathobdelles, constitué de deux fibres. Mais on ne distingue plus que deux régions distinctes. Le flagelle présente une pièce terminale plus longue que la portion antérieure, à microtubules.

Chez les Rhynchobdelles, l'apex acrosomique est beaucoup plus petit que le reste de l'acrosome. La taille de l'acrosome est plus élevée que dans les ordres précédents. Le noyau est généralement identique sur toute sa longueur. Toutefois, si l'on considère les deux familles de Rhynchobdelles, on constate deux différences importantes : les *Glossiphoniidae* ont une seule hélice nucléaire, un flagelle avec une pièce terminale assez longue, de même structure que chez les *Erpobdella*, alors que les *Piscicolidae* possèdent une triple hélice nucléaire.

Si l'on compare à présent deux genres différents à l'intérieur d'une même famille, les similitudes s'accroissent. Ainsi, un examen quelque peu hâtif des spermatozoïdes d'*H. medicinalis* et d'*H. sanguisuga* pourrait prêter à confusion. Les différences ne portent que sur des points de détails, comme la longueur plus importante de l'acrosome, la taille plus faible de la partie basale du noyau chez *H. sanguisuga*. Entre les genres *Branchellion* et *Piscicola*, bien que le premier soit marin et le second dulçaquicole, les différences sont minimes. L'acrosome de *B. torpedinis* est d'une longueur supérieure au double de l'acrosome de *P. geometra*. Le noyau et la mitochondrie de *Branchellion* sont par contre plus courts. Le passage de la vie dulçaquicole à la vie marine n'a donc pas provoqué de changements importants dans la structure des gamètes. FRANZEN (1956) avait fait la même constatation chez les Oligochètes, en comparant la morphologie des spermatozoïdes de *Pachydriilus lineatus*, espèce marine, à celle des gamètes de *Lumbricus* et *Allolobophora*, genres terrestres. Par contre, les

différences sont plus prononcées entre deux genres distincts, dulçaquicoles, comme *G. complanata* et *H. marginata*. Non seulement, la taille des éléments respectifs des spermatozoïdes diffère, mais encore leur morphologie. Le bourrelet hélicoïdal de l'acrosome d'*Hemiclepsis* est large et l'obliquité de ses tours de spire est élevée, au contraire de *G. complanata*. Leurs noyaux bien que constitués d'une seule hélice, n'ont pas le même aspect morphologique. La longueur de la pièce terminale du flagelle de *G. complanata* est plus importante que chez *H. marginata*.

Enfin, si l'on prend deux espèces appartenant au même genre, comme *E. octoculata* et *E. testacea*, les similitudes s'accroissent. La longueur des différentes parties du gamète ne varie que dans de faibles proportions. Les différences portent presque exclusivement sur le noyau : longueur et nombre de tours de spire beaucoup plus élevé dans la partie basale chez *E. testacea*. L'aspect de l'enroulement hélicoïdal de deux fibres nucléaires présente de petites variations entre les deux espèces. Cette similitude au niveau des spermatozoïdes est un reflet de la grande ressemblance morphologique de ces deux espèces et vraisemblablement d'une différenciation spécifique récente. Par contre des espèces du même genre mais très dissemblables comme *G. complanata* et *G. heteroclita* montrent des gamètes aux différences très marquées. Le spermatozoïde de *G. heteroclita* est exceptionnel, comparé à celui des autres *Glossiphoniidae*, par la longueur et l'enroulement du noyau, la taille de la mitochondrie et du flagelle ; ce dernier organe est même le plus long de toutes les espèces étudiées. Ainsi, en raison de la grande complexité structurale des spermatozoïdes des Hirudinées, ceux-ci peuvent représenter un critère intéressant pour la systématique de cette classe d'Annélides. S'ils ne peuvent probablement pas être utilisés aisément pour une différenciation spécifique dans certains groupes (*Eryobdellidae* par exemple), les différences entre ordres et familles semblent suffisamment importantes pour préconiser leur étude dans le cas de groupes aux affinités systématiques incertaines (*Xerobdellidae*, *Americanobdellidae* par exemple).

Nos résultats, obtenus sur une faible partie seulement des espèces d'Hirudinées, nous permettent toutefois d'apporter des données complémentaires pour la compréhension de la phylogénie de ce groupe. Ainsi, les gamètes d'*H. marginata* et de *G. complanata* n'ont pas une morphologie très voisine. Ces constatations apportent des faits positifs à l'arbre généalogique, établi par ANTRUM (*in* HARANT et GRASSE, 1959). Cet auteur, en effet, fait apparaître une importante hétérogénéité dans

l'ordre des Rhynchobdelles et sépare précocement les genres *Glossiphonia* et *Hemiclepsis*. Par contre, nos observations ne justifient pas la phylogénie préconisée par SELENSKY (*in* HARANT et GRASSE, 1959) où les genres *Piscicola* et *Branchellion* sont éloignés. La grande analogie structurale entre les spermatozoïdes de ces deux genres montre au contraire leur proche parenté. La différence très importante enregistrée entre les spermatozoïdes de *G. complanata* et *G. heteroclita* reste pour l'instant inexplicquée. Seule l'étude des processus de fécondation chez ces deux espèces d'une part, des spermatozoïdes des autres représentants du genre (11 espèces au total) d'autre part, pourra révéler si cette différence est liée aux modalités de transit des gamètes au travers des tissus du receveur ou s'il faut rediscuter de l'appartenance de ces deux sangsues au même genre.

Il est actuellement admis, puisque toutes les sangsues ont 33 métamères (à l'exception des Acanthobdelles) qu'elles ont une origine monophylétique. Il en résulte que tous les spermatozoïdes étudiés dérivent de celui d'un ancêtre commun. Dans l'hypothèse où les modifications les ayant affectés sont en grande partie phylogéniques, il doit être possible de retrouver certains caractères primitifs. Les données relatives à la spermiogenèse des divers groupes de sangsues sont insuffisantes, comme nous l'avons dit précédemment, pour permettre de faire des homologues entre les différents constituants de l'acrosome. Par contre une tentative peut être faite en ce qui concerne les autres organites. Le point de départ de la morphogenèse du noyau pourrait être une bande de chromatine condensée entre deux zones longitudinales privilégiées opposées de l'enveloppe nucléaire au contact des microtubules (Fig. 198). Ces deux zones entreprendraient un déplacement hélicoïdal dans le même sens autour du grand axe de la spermatide (Fig. 199) dès le début de son allongement pour donner naissance aux noyaux observés par de simples différences de torsion :

1) torsion lâche autour d'un cylindre (Fig. 200<sub>10</sub>) : *G. complanata*, *G. heteroclita*, *H. stagnalis*.

2) torsion autour d'un axe :

- l'un des bords de la bande est plus court et forme un axe autour duquel s'enroule l'autre (Fig. 200<sub>13</sub>) : *H. marginata*, région antérieure des gamètes des *Hirudidae* (Fig. 200<sub>2</sub>) et *Eropobdellidae* (Fig. 200<sub>7</sub>).

- les deux bords de la bande sont d'égale longueur :

. ils ont la même largeur (Fig. 200<sub>3-4-5</sub>) : *H. medicinalis* et *H. sanguisuga* (parties postérieures).

. l'un est deux fois plus large que l'autre,

+ mais reste indivis (Fig. 200<sub>8</sub>) *Eropobdellidae* (partie postérieure),

+ se scinde longitudinalement en deux bourrelets identiques donnant ainsi naissance à deux des trois fibres du noyau : *Piscicolidae*.

L'interprétation du noyau de *T. tessulatum* est plus délicate ; il peut en effet être comparé à celui de *Glossiphonia*, le cylindre étant réel ou à celui d'*Hemiclepsis* (espèce proche parente puisque ce genre est quelquefois considéré comme un sous-genre de *Theromyzon*). De cette analyse il ressort que la forme du noyau qui pourrait être considérée comme la plus primitive et donc la plus simple est celle des *Glossiphoniidae*, confirmant ainsi les autres données d'ordre morphologique et embryologique (MANN, 1962). Le groupe montrant l'évolution la plus complexe est celui des *Piscicolidae*. Pour la mitochondrie l'hypothèse d'une régression à partir d'un type primitif, hélicoïdal, ne nous semble pas à retenir. Il est plus vraisemblable d'admettre qu'elle était rectiligne à l'origine et qu'elle n'est devenue torsadée que chez les espèces où la fécondation nécessitait un renforcement de sa résistance mécanique.

Tous les flagelles possèdent une pièce terminale qui peut être plus ou moins longue (Tableaux 9 et 10). Tant que nous ne connaissons pas le rôle de cette partie atubulaire il sera difficile de choisir entre une régression (*Hirudidae* et *Piscicolidae*) ou une hypertrophie (*Glossiphoniidae*, *Eropobdellidae*). Son importance ne semble pas liée au mode de fécondation puisque nous trouvons indifféremment une pièce terminale, longue ou courte, à la fois chez des animaux à copulation normale et chez ceux qui échangent des spermatophores.

#### e - Le cytophore

##### α - Résultats

Il est très réduit dans les groupes isogéniques de spermatogonies et ne diffère pas quant à ses constituants du cytoplasme de ces cellules. Il contient des petites mitochondries, peu de réticulum et de nombreux ribosomes. MARTINUCCI *et al.* (1975) n'observent pas de ribosomes au cours des premières étapes de la formation du cytophore chez *E. foetida*. Sa croissance commence avec celle des spermatocytes I, elle est due essentiellement à l'augmentation du nombre des mitochondries et des ribosomes (Fig. 218). L'appareil de Golgi est très réduit (Fig. 219). Le cytophore va ensuite régulariser ses contours et former une sphère d'un diamètre de 25  $\mu$ . Cette augmentation de taille est due essentiellement à celle du cytoplasme et à l'apparition de vacuoles (Fig. 220). Le nombre des mitochondries ne semble plus croître et elles se trouvent donc dispersées dans cette masse cytoplasmique (Fig. 220). Dans certains groupes iso-

géniques le cytophore contient une masse centrale très chromophile (Fig. 228 ) déjà observée par BRUMPT (1900b). Cet auteur constate qu'il ne s'agit pas d'un noyau. Notre étude montre en effet que c'est un amas de réticulum endoplasmique agranulaire (Figs 220 et 221). Des observations analogues sont faites chez *E. foetida* (MARTINUCCI *et al.*, 1977). Des cytophores nucléés ont été observés chez *G. complanata* (DAMAS, 1968c) dans les groupes isogéniques de spermatogonies d'hiver, permettant ainsi de différencier ces dernières des spermatogonies d'été au cytophore anucléé. Au fur et à mesure de la maturation du groupe, le volume et le nombre des vacuoles augmentent, ce qui se traduit en microscopie photonique par une diminution nette de densité du cytophore. Les mitochondries montrent une inversion de contraste concomitante de celle des spermatides (Fig. 222). Lorsque les spermatozoïdes ont acquis leur morphologie définitive, ils se détachent du cytophore et ce dernier diminue de taille (21  $\mu$ ). Il est phagocyté à l'intérieur même du testicule.

#### $\beta$ - Discussion

A notre connaissance aucune étude n'a encore été faite sur le rôle et l'évolution du cytophore en microscopie électronique chez les Hirudinées. Une telle étude a été entreprise par STRANG VOSS (1970, 1972) et MARTINUCCI *et al.* (1975, 1977) chez *E. foetida*. MARTINUCCI *et al.* (1977) envisagent plusieurs rôles possibles du cytophore :

- 1) support,
- 2) synchronisation de l'évolution des cellules germinales,
- 3) incorporation sélective des organites et matériaux cellulaires non concernés directement par la spermiogenèse. STRANG VOSS (1970) a montré que la réduction du volume cytoplasmique des spermatides se fait par transfert dans le cytophore de lamelles annelées, de dictyosomes en dégénérescence et de vésicules contenant des citernes du réticulum endoplasmique.
- 4) production d'énergie suggérée par l'abondance des mitochondries à un stade où elles disparaissent des cellules germinales (sauf bien entendu la mitochondrie à l'origine de la pièce intermédiaire). Cette énergie serait utilisée par les spermatides pour la condensation de la chromatine, la morphogenèse nucléaire et la croissance du flagelle.
- 5) synthèse de matériaux nécessaires à la morphogenèse des spermatozoïdes, comme par exemple les précurseurs des microtubules de la manchette et du flagelle ainsi que le glycogène de ce dernier.

6) autodestruction par autolyse. L'abondance des vacuoles de type lysosomal en fin de spermiogénèse en est la manifestation la plus frappante. D'après STRANG VOSS (1972) les spermatides contribueraient à transformer le cytophore en un grand autophagosome en lui transférant, d'une part des vacuoles autophagiques issues du réticulum endoplasmique, d'autre part des lysosomes primaires formés à partir des vésicules golgiennes. Chez les Hirudinées le cytophore est finalement phagocyté.

L'ensemble de ces rôles se conçoit parfaitement dans le cas de *P. geometra* puisque nous observons une très grande similitude d'évolution des organites cytoplasmiques et de la croissance entre cette espèce et *E. foetida*. Cependant, seule l'utilisation de techniques plus élaborées que l'observation morphologique nous permettrait d'avoir une idée précise sur le sens et le volume des échanges entre le cytophore et les cellules germinales.

## 2 - L'ATRIUM GENITAL MÂLE

La première description précise de cet organe a été donnée par BRUMPT (1900b) (Fig. 37). Cet auteur décrit trois types de glandes : a, prenant l'hématoxyline, b, se colorant par l'acide picrique et c, restant incolores. En fait l'utilisation de techniques de colorations signalétiques plus complexes nous a montré qu'il y avait en réalité au moins huit types de cellules glandulaires différentes. Ce résultat confirme les observations d'HAGADORN (1962) chez *T. rude*, espèce chez laquelle il compte au moins quatre types cellulaires. DAMAS (1969b) en décrit onze chez *G. complanata*. L'examen fait au microscope électronique de quelques unes seulement de ces cellules montre qu'elles ont la même structure que les glandes ciliennes étudiées précédemment (à l'exception de la nature des granules) et ne nécessitent donc pas une description détaillée.

La fonction de ces glandes est de sécréter le spermophore. DAMAS (1969b) a pu extraire une protéase des glandes atriales de *G. complanata* dont le rôle est vraisemblablement de lyser l'épiderme facilitant ainsi le passage des spermatozoïdes.

## 3 - CONCLUSION

La paroi testiculaire est formée d'une couche de collagène bordée sur ses deux faces de cellules conjonctives ; elle contient, en outre, quelques fibres musculaires éparses. A l'un des pôles du testicule, des cellules ciliées disposées en entonnoir ont pour rôle de véhiculer les sperma-

tozoïdes vers le canal efférent. L'endothélium testiculaire ne semble pas être à l'origine des spermatogonies qui dériveraient d'un stock de cellules souches existant dans la gonade à la naissance.

Les spermatogonies assemblées en groupes isogéniques autour d'une masse cytoplasmique centrale anucléée, le cytophore, ne présentent pas de caractéristiques cytologiques particulières.

Par contre, les spermatocytes I montrent, au niveau de l'enveloppe nucléaire, d'importantes invaginations toujours pourvues de pores, qui amènent le cytoplasme au sein même du noyau, au contact du nucléole fréquemment annulaire. Chez *B. torpedinis*, les nucléoles migrent souvent dans une évagination du noyau et quatre ébauches flagellaires apparaissent dès ce stade.

La spermiogenèse se caractérise par l'édification d'un acrosome de structure complexe et la torsion en hélice du noyau constitué d'un axe portant trois replis longitudinaux disposés à  $120^\circ$  les uns des autres. L'ébauche acrosomique prend naissance près du centriole et migre ensuite à l'apex du noyau ; elle comporte du matériel opaque partiellement entouré par un saccule golgien en forme de cloche. De ce matériel émerge un tube qui, au cours de sa croissance, se différencie pour donner naissance à la gaine acrosomique. La migration de la substance acrosomique à l'intérieur de cette gaine est précédée par la formation de l'extrémité acrosomique et d'une baguette axiale.

La morphogenèse du noyau hélicoïdal est probablement en relation avec l'existence d'une manchette de microtubules s'étendant du centriole à l'extrémité de l'acrosome. Avant toute torsion visible du noyau, la chromatine se condense sous l'enveloppe nucléaire en deux bandes à trajet hélicoïdal vis-à-vis des microtubules. Cette disposition préfigure l'aspect final du noyau : l'une des bandes donne vraisemblablement l'une des crêtes, l'autre, de largeur double de la précédente, les deux autres. Les premiers signes de torsion s'observent au niveau du noyau et non pas de l'acrosome comme le suggéraient les modifications morphologiques externes des organites de la spermatide. On peut émettre l'hypothèse que les microtubules jouent un rôle inducteur sur les constituants de la gaine acrosomique ayant pour effet de leur donner la même orientation hélicoïdale que celle du noyau.

Nous avons comparé les spermatozoïdes des *Piscicolidae* à ceux des *Glossiphoniidae*, *Hirudidae* et *Eryobdellidae*, étudiés grâce à la technique de coloration négative. Tous les gamètes mâles observés présentent

des hélices au niveau de l'acrosome et du noyau. Seules certaines *Glossiphoniidae* possèdent une mitochondrie hélicoïdale. De morphologie variable suivant les espèces, l'acrosome présente toujours un apex ne renfermant pas de substance acrosomique et une gaine formée de fines fibrilles hélicoïdales et parcourue par un bourrelet au trajet également hélicoïdal. La substance contenue dans la gaine peut être rejetée à l'extérieur par un orifice étroit situé à la base de l'apex acrosomique. On distingue souvent dans l'axe de la base de l'acrosome une baguette de taille variable correspondant vraisemblablement au filament acrosomique observé chez les autres Annélides. Le noyau peut être constitué de une, deux ou trois fibres hélicoïdales qui ne sont pas indépendantes mais correspondent à des évaginations issues d'un axe commun. On en distingue une chez les *Glossiphoniidae*, deux chez les *Hirudidae* et les *Erpobdellidae*, trois chez les *Piscicolidae*. De plus chez une même espèce sa morphologie peut ne pas être la même sur toute la longueur. Le flagelle se termine par une partie atubulaire, de dimension considérable chez les *Erpobdellidae* et certaines *Glossiphoniidae*.

L'étude comparative des spermatozoïdes des différentes espèces d'Hirudinées est discutée en fonction de la classification et de la généalogie de cette classe d'Annélides d'une part, de morphologies semblables rencontrées chez des gamètes mâles d'autres groupes zoologiques d'autre part. Dans toutes les familles de sangsues, une bande de chromatine reliant deux zones longitudinales privilégiées, diamétralement opposées, de l'enveloppe nucléaire au contact des microtubules, pourrait être l'ébauche initiale à partir de laquelle s'édifient les noyaux observés. Ces derniers ne diffèrent, selon les espèces, que par des degrés dans la torsion.

Les structures hélicoïdales rencontrées chez ces gamètes extrêmement fins nous semblent en rapport avec un renforcement de leur résistance mécanique. L'observation de mitochondries torsadées chez toutes les *Glossiphoniidae* étudiées, à l'exception de *T. tessulatum*, seule espèce de cette famille présentant une copulation directe, est un argument en faveur de cette hypothèse.

L'évolution du cytophore est suivie et discutée en fonction des observations faites chez les Oligochètes. Il ne contient pas de noyau et la masse chromophile que l'on observe quelquefois en son centre en microscopie photonique est formée par du réticulum endoplasmique lisse.

L'atrium génital mâle est formé d'au moins huit types cellulaires différents. Ce sont des cellules glandulaires exocrines typiques.

#### IV - ÉVOLUTION DES CARACTÈRES SEXUELS AU COURS DE LA CROISSANCE ET DU CYCLE ANNUEL CHEZ P. GEOMETRA

Dans le but de clarifier les résultats obtenus dans l'étude de l'activité des ovaires, des glandes clitelliennes et des testicules, nous avons distingué plusieurs stades dans leur évolution.

##### A - DEFINITION DES STADES EVOLUTIFS DES CARACTERES SEXUELS

###### 1 - LES OVAIRES

L'activité ovarienne est continue et de nouveaux follicules se différencient régulièrement à partir du stock d'ovogonies. Chez l'animal mature nous trouvons dans l'ovaire toutes les étapes de la croissance ovocytaire. De ce fait ce sont uniquement les cellules germinales les plus évoluées qui sont prises en compte pour caractériser l'évolution ovarienne. Nous distinguerons quatre stades :

- Stade 1 - de l'ovogonie à l'ovocyte I en début de stade diplotène. Ce dernier n'est pas encore distinct des cellules nourricières qui sont attachées avec lui au cytophore.

- Stade 2 - il représente la première étape de la croissance de l'ovocyte. Sa taille est inférieure à l'ensemble formé par les cellules nourricières et le cytophore (Fig. 43).

- Stade 3 - il comporte la fin de la croissance ovocytaire jusqu'à la régression du cytophore et des cellules nourricières (Fig. 44).

- Stade 4 - il est caractérisé par la présence d'ovocytes matures en métaphase de première division de maturation (Fig. 45).

###### 2 - LES GLANDES CLITELLIENNES

Leur évolution a été subdivisée en trois stades :

- Stade 1 : les corps cellulaires des glandes sont très petits et rien ne permet de les distinguer des cellules voisines. Elles sont localisées au niveau des faisceaux de conduits excréteurs.

- Stade 2 - stade d'activation ; les cellules présentent un important accroissement de taille et corrélativement de celle du noyau où apparaissent de très nombreux nucléoles (Fig. 66). Aucune sécrétion n'est

encore décelable en microscopie photonique. Les corps cellulaires commencent à envahir l'espace compris entre le tube digestif et la musculature.

- Stade 3 - depuis l'apparition des premiers granules de sécrétion jusqu'à la pleine activité (Figs 67 à 70). Ce stade présente des aspects variés en fonction de l'état physiologique de la cellule. On peut en effet y distinguer des phases de synthèse et de stockage suivies de phases de vidange lorsque la sécrétion est utilisée pour l'élaboration des cocons.

### 3 - LES TESTICULES

Chez *P. geometra* nous avons distingué quatre stades dans l'évolution du contenu testiculaire comme chez *H. medicinalis* (MALECHA, 1970b). Comme dans le cas des ovaires, ce sont les groupes isogéniques les plus évolués qui sont pris en compte pour cette subdivision, c'est-à-dire pour :

- le stade 1 - des spermatogonies autour d'un cytophore très réduit (Figs 228 et 229).

- le stade 2 - des cellules germinales de grande taille autour d'un cytophore très net et dense. Nous avons dans certains cas subdivisé ce stade en :

. stade 2a - spermatogonies de dernière génération (spermatocytes I avant la prophase de méiose) ;

. stade 2b - spermatocytes I en prophase de méiose (Figs 228 et 229).

- le stade 3 - spermatocytes II et spermatides (Figs 228 et 229).

- le stade 4 - des spermatozoïdes ayant acquis leur structure définitive mais encore attachés au cytophore (Fig. 229).

Nous avons donné une représentation schématique de ces différents stades chez *H. medicinalis* (MALECHA, 1970b) (Fig. 223). Elle est également valable pour *P. geometra*. Cette dernière se différencie de l'espèce précédente par un contenu testiculaire dans lequel on ne trouve qu'un très faible pourcentage de stades 2a et 4.

### B - EVOLUTION DES CARACTERES SEXUELS AU COURS DE LA CROISSANCE

Cette évolution a été suivie chez des sangsues élevées à 15°C et soumises à un éclaircissement de 18 h sur 24. Elles sont nourries toutes les semaines et six d'entre-elles sont fixées régulièrement quatre jours après chacun de ces repas pour l'étude histologique.

Tableau 12 - Evolution des caractères sexuels au cours de la croissance de *P. geometra*, élevées à 15°C et soumises à une photopériode de 18h/24.

		Naissance 0,064 mg	Masse inférieure à 1,5 mg	1,5 à 2 mg	2 à 3 mg	3 à 4 mg	4 à 5 mg	Plus de 5 mg
FEMELLE	OVAIRES	Stade 1 (ovogonies)	Stade 1 (prophase de méiose au stade zygotène-pachytène)		Stade 1 (prophase de méiose au début diplotène)	Stade 2	Stade 3	Stade 4
	FONCTION! GLANDES CLITELLIENNES	indifférenciées	Stade 1			Stade 2		Stade 3
	AIRE COPULATRICE	peu différenciée		en voie de différenciation	Bien différenciée mais pas de sécrétion	Sécrétion abondante		
	TISSU VECTEUR	Très réduit	Début d'accroissement	volumineux (les grandes cellules sont encore de taille voisine des petites)		Très volumineux (les grandes cellules ont atteint leur taille maximale)		
MÂLE	FONCTION! TESTICULES	Stade 1 (spermatogonies isolées)	Stade 1 (spermatogonies en groupes isogéniques)	Stade 2	Stade 3	Stade 4		
	ATRIUM	En cours de différenciation		Bien différencié	Début d'activité sécrétrice	Intense activité sécrétrice		

## 1 - RESULTATS

Ils sont consignés dans le tableau 12.

- A la naissance, les gonades mâles et femelles sont au même stade (Figs 40 et 41) puisque formées de cellules souches qui vont se multiplier rapidement. Les ébauches de l'atrium et du tissu vecteur sont en place. La zone de l'aire copulatrice se distingue de l'épiderme banal uniquement par une densité cellulaire plus grande. Les glandes clitelliennes sont encore concentrées au niveau du clitellum et elles vont occuper leur place définitive, très peu de temps après le premier repas, grâce à la croissance de leur canal excréteur.

- Avant que la sangsue n'atteigne une masse de 1,5 mg, c'est-à-dire après une ou deux prises de nourriture, une différenciation apparaît au sein des glandes génitales ; on observe d'une part des groupes isogéniques de spermatogonies dans les testicules, d'autre part des follicules en prophase de méiose dans les ovaires. Ces derniers sont donc à ce stade en avance sur les gonades mâles.

- L'évolution ultérieure des ovaires se caractérise par l'augmentation de leur volume due à l'accroissement du nombre des follicules qui atteignent la prophase de méiose, stade auquel ils restent bloqués. Pendant ce temps l'évolution testiculaire s'accélère avec apparition des premiers groupes de spermatocytes I, puis rapidement des spermatides, dont la présence coïncide avec le début de l'activité sécrétrice de l'atrium mâle, et enfin des spermatozoïdes.

- La présence des premiers gamètes mâles est corrélative de l'apparition :

- . d'ovocytes en croissance (stade 2),
- . du début de l'activité sécrétrice de l'aire copulatrice,
- . d'un volumineux tissu vecteur,
- . de glandes clitelliennes activées.

- Les granules de sécrétion n'apparaissent dans les glandes clitelliennes que lorsque les ovaires contiennent des ovocytes mûrs.

Nous avons noté que, généralement, l'état d'évolution de l'appareil génital de *P. geometra* dépendait de la masse, de l'individu, atteinte à l'issue des prises de nourriture et non pas du nombre de celles-ci.

## 2 - DISCUSSION

L'évolution des caractères sexuels de *P. geometra* comparée à celle d'*E. octoculata* (VAN DAMME, 1974) montre que les ovaires sont au même stade à la naissance mais qu'il n'en est pas de même pour les gonades

mâles. Chez *E. octoculata*, à la sortie du cocon, les ébauches testiculaires se présentent sous l'aspect de deux minces cordons formés de cellules indifférenciées. Ces cordons primordiaux vont progressivement se transformer en tubes contenant des protogonies. Les ampoules testiculaires ne vont apparaître qu'à l'âge d'un mois et demi. L'évolution différente constatée chez ces deux espèces est peut-être liée à leur cycle biologique. Chez *E. octoculata* la maturité sexuelle n'est atteinte qu'après plusieurs mois alors qu'elle peut l'être en un seul chez *P. geometra*.

Chez ces deux espèces, comme chez les Oligochètes (AVEL, 1929 ; HERLANT-MEEWIS, 1958 - 1959) la gamétogenèse femelle est la première à évoluer. C'est en effet dans l'ovaire qu'apparaissent les premières pro-phases méiotiques. Les testicules comblent cependant rapidement ce retard et des spermatozoïdes sont produits bien avant les ovocytes mûrs.

L'examen du tableau 12 montre qu'il existe deux vitesses d'évolution différentes des caractères sexuels ; l'une, plus lente, est celle des ovaires et des glandes clitelliennes, l'autre, plus rapide, celle des testicules, de l'atrium mâle, de l'aire copulatrice et du tissu vecteur. En nous référant aux stades définis par AVEL (1929) pour les Lombriciens, nous constatons une très grande analogie d'évolution de l'appareil génital entre ce groupe et *P. geometra*. Chez les Lombriciens "la puberté se manifeste par le développement complet des caractères sexuels somatiques ventraux". Elle coïncide avec la méiose mâle. La même étape peut être définie chez *P. geometra* comme étant le stade où arrivent à leur développement complet l'atrium mâle, l'aire copulatrice et le tissu vecteur. Vient ensuite le stade de l'activité génitale ; il se caractérise chez les Lombriciens par l'apparition du clitellum. Chez *P. geometra* il peut se définir comme celui où les glandes clitelliennes sécrètent. Il est par contre impossible de scinder la période prépubertaire de la piscicole en plusieurs stades comme le fait AVEL chez les Lombriciens. En effet chez *P. geometra* les ébauches de tous les caractères sexuels existent à la naissance et vont se différencier rapidement. Cette période peut être qualifiée d'infantile.

## C - EVOLUTION DES CARACTERES SEXUELS AU COURS DU CYCLE ANNUEL

Nous avons suivi de juin 1970 à juin 1971 une population naturelle de *P. geometra*.

### 1 - RESULTATS

#### a - Les ovaires (Fig. 224)

Les ovocytes matures sont présents dans les ovaires de janvier à septembre. Pendant le reste de l'année nous ne trouvons que

des ovocytes en croissance. Cependant ces derniers, qui apparaissent chez des sangsues de 2,5 mg en été, ne sont observés que chez celles atteignant une masse supérieure à 4 mg. La vitesse de la croissance ovocytaire est également très ralentie pendant la mauvaise saison comme en témoigne la largeur de la bande "stade 2" de la figure 224. Nous n'avons pu représenter sur cette dernière l'évolution ovarienne de l'échantillon récolté en septembre. Nous sommes, à cette époque, en présence d'une population mixte formée d'une part de sangsues qui ne participeront à la reproduction qu'au printemps suivant et dont les ovocytes les plus évolués sont en début de phase d'accroissement et, d'autre part, d'individus ayant déjà pondu, comme le montre le tableau 13. Nous retrouvons ces derniers dans le relevé du 15 octobre 1971 (2 sur 15 individus étudiés en histologie), le relevé du 22 octobre 1971 (1 sur 17) et ils disparaissent dans celui du 29 octobre 1971 (20 sangsues examinées).

Tableau 13 - Stades d'évolution des glandes clitelliennes et des ovaires chez des *P. geometra* récoltées en septembre.

Masse des sangsues en mg	0,5	1,5	2,5	3	3	5	5	5	7	7	7	9	9	11	11	15
Nombre d'animaux étudiés	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Stade des ovaires	1	1	1	1	2	4	3	3	4	2	4	4	2	4	4	2
Stade des glandes clitelliennes	1	1	1	1	1	3	1	3	2	1	3	2	1	3	2	1

b - Les glandes clitelliennes (Fig. 225)

L'activité sécrétrice des glandes clitelliennes coïncide avec la présence de stades 4 dans les ovaires et s'étend de fin janvier à septembre. Pour la population hivernante, leur activation survient en octobre en 1970 (Fig. 225) ou novembre en 1971. Les stades d'évolution des glandes clitelliennes de la population mixte de septembre sont figurés dans le tableau 13.

c - La fonction mâle

L'examen histologique des sangsues récoltées dans la nature, nous a montré que leur contenu testiculaire pouvait présenter des fluctuations très importantes dans l'évolution de la spermatogenèse. L'étude

que nous avons menée sur les effets du jeûne et qui sera exposée dans le chapitre suivant, nous a révélé que ce facteur était vraisemblablement responsable de ces variations, notamment pendant la mauvaise saison, époque où les poissons d'eau douce ont une activité très réduite. Cette observation nous a conduit à utiliser comme critère de la maturité génitale mâle la présence de spermatozoïdes dans les vésicules séminales pour les animaux récoltés dans la nature. Les résultats enregistrés de juin 1970 à juin 1971 (Fig. 226) mettent en évidence une production de spermatozoïdes pendant toute l'année. Les sangsues atteignent cependant la maturité sexuelle mâle à un stade plus tardif de leur croissance pendant la mauvaise saison.

La développement de l'atrium génital mâle coïncide avec l'évolution testiculaire. Il est toujours actif lorsque des spermatozoïdes sont présents dans les vésicules séminales.

## 2 - DISCUSSION

L'examen des résultats précédents conduit à une observation très importante : la production de gamètes n'est pas interrompue pendant l'hiver puisque les sangsues produisent des spermatozoïdes et que la croissance ovocytaire peut être menée à son terme (fin de stade 3). De plus, chez quelques sangsues, certaines figures de dégénérescence observées sont manifestement des stades 4. L'ovogenèse semble donc être complète dans certains cas avec cependant une dégénérescence immédiate des ovocytes qui atteignent la maturité. Le fait que nous n'observons pas, d'octobre à janvier, d'ovaires possédant des ovocytes au stade 4 non dégénérés peut être interprété soit comme le résultat de l'action d'un facteur interne régulateur de la dernière étape de la gamétogenèse femelle, soit simplement comme le résultat de l'absence de fécondation, cette dernière induisant le passage en métaphase de première division de maturation et assurant la survie des ovocytes. A l'encontre de cette dernière hypothèse il faut noter que des stades 4 apparaissent en fin janvier chez des animaux non inséminés. L'évolution ultérieure de ces ovocytes ne nous est pas connue. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette observation :

- il s'agit d'un début de développement parthénogénétique. Dans ce cas il est possible qu'ils dégénèrent. L'observation de dégénérescence ovocytaires est fréquente dans les ovaires de nombreux animaux.
- la fécondation peut encore se faire en métaphase de première division de maturation. Cependant nous n'observons jamais de spermatozoïdes autour des ovocytes au stade 4.

Tableau 14 - Températures moyennes mensuelles relevées dans l'air à la station de  
 météorologie nationale de Lille-Lesquin

(moyenne des température minimale + température maximale quotidiennes )

2

Mois	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Années												
1970	3,1	3,1	3,2	6,7	13,3	17,5	15,9	17,4	15,7	11,4	8,1	2,7
1971	3,0	4,2	3,6	8,7	14,0	13,8	18,3	17,5	14,6	10,7	5,7	5,1



Le blocage de l'activité reproductrice en hiver paraît beaucoup plus réel au niveau de l'évolution des glandes clitelliennes. En effet si nous enregistrons un synchronisme parfait entre le développement des ovaires et celui des glandes clitelliennes de janvier à septembre, il n'en est pas de même en octobre, période où l'activité de ces dernières (Fig. 225) est nettement en retard sur l'ovogenèse (Fig. 224), si l'on prend comme référence le tableau 12. Cette observation nous apparaît comme une réponse temporaire de l'ovaire à des conditions de température encore favorables à la reproduction (tableau 14). Elle met en évidence une certaine indépendance entre l'évolution des ovaires et celle des glandes clitelliennes. D'octobre à janvier, la ponte est impossible, non parce qu'il n'y a pas de gamètes disponibles, mais parce que la sangsue est dans l'incapacité de produire des cocons. Le retard que nous avons observé dans l'activation des glandes clitelliennes en 1971 est peut-être à attribuer aux températures plus basses enregistrées en septembre, octobre et novembre de cette année là par rapport à 1970 (tableau 14). Le blocage de l'activité reproductrice pendant la mauvaise saison réside également dans le comportement reproducteur des animaux ; il y a en effet une inhibition de ce dernier par absence d'accouplements. Ce fait est particulièrement net en janvier, période pendant laquelle les sangsues possèdent à la fois des spermatozoïdes et des ovocytes au stade 4. Cette observation suppose des contrôles différents pour la maturation génitale d'une part, l'accouplement et la ponte d'autre part.

Comme nous l'avons vu dans notre étude sur la croissance (Chapitre II), cette dernière n'est pas inhibée par les basses températures et est favorisée par l'arrêt de l'activité reproductrice. L'examen des figures 224, 225 et 226 montre qu'il n'en est pas de même pour la différenciation des organes génitaux. Elle est en effet accélérée pendant la bonne saison et très nettement ralentie pendant la mauvaise, notamment en ce qui concerne la fonction femelle.

Peu de données existent sur l'évolution des caractères sexuels au cours du cycle annuel chez les Hirudinées. DAMAS (1977) décrit chez *G. complanata* 6 étapes dans l'évolution ovarienne ; les ovocytes achèvent en mars leur croissance commencée en décembre. La maturité sexuelle est atteinte en mai. En ce qui concerne la fonction mâle, des spermatozoïdes ne sont libérés des testicules que fin mars (DAMAS, 1968c). Un cycle très voisin se retrouve chez une Glossiphoniidée nord-américaine : *T. rude* (HAGADORN, 1962). Chez *H. medicinalis*, un arrêt de la gamétogenèse mâle s'observe de novembre à mars (HAGADORN, 1966b) ou avril (NEKAYEV, 1959).

Comparé au cycle annuel des Hirudinées précédentes, celui de *P. geometra* s'en distingue nettement par le fait que cette sangsue produit des spermatozoïdes et des ovocytes submatures (stade 3) pendant toute l'année.

#### D - CONCLUSION

L'évolution des caractères sexuels de *P. geometra* au cours de la croissance peut se subdiviser en trois stades :

- stade infantile - pendant lequel se poursuit la différenciation de l'appareil génital dont les ébauches existent déjà à la naissance.

- stade de puberté - il débute quand les spermatocytes sont en prophase de méiose, ce qui coïncide avec la période où l'atrium mâle, l'aire copulatrice et le tissu vecteur achèvent leur développement. A la fin de ce stade, les testicules produisent des spermatozoïdes, les cellules glandulaires de l'atrium mâle et de l'aire copulatrice sont remplies de sécrétions et les glandes clitelliennes sont activées.

- stade d'activité génitale - il commence avec l'apparition de granules de sécrétion dans les glandes clitelliennes et d'ovocytes mûrs dans les ovaires. Il va se poursuivre avec la production de cocons et s'achèvera avec la mort de l'animal, la phase de sénescence étant pratiquement inexistante.

L'étude du cycle annuel de *P. geometra* révèle une période d'arrêt de l'activité reproductrice s'étendant d'octobre à février. Elle est caractérisée d'une part, au niveau génital, par l'absence d'ovocytes mûrs (stade 4) et de granules de sécrétion dans les glandes clitelliennes, d'autre part, par une modification du comportement des sangsues qui ne s'accouplent pas. Le cycle biologique de cette espèce présente la particularité, encore jamais signalée chez les Hirudinées, de produire des ovocytes submatures (stade 3) et des spermatozoïdes pendant la période hivernale de repos reproducteur.

## V - INFLUENCE DES FACTEURS EXTERNES SUR L'ACTIVITÉ REPRODUCTRICE DE P. GEOMETRA

### A - INFLUENCE DE LA LUMIERE

Aucune donnée précise n'existe jusqu'à présent quant à l'influence de la lumière sur l'activité génitale des Hirudinées. MANN (1962) ne la cite pas parmi les facteurs assurant la régulation de la fonction reproductrice. L'exposition de *T. rude* (HAGADORN, 1962) à la lumière continue provoque des perturbations dans le cycle génital de cette espèce. Elles se manifestent par une réduction du nombre d'individus en ponte. L'obscurité absolue n'a aucun effet. Notre étude sur *H. medicinalis* (MALECHA, 1970b) montre

- d'une part qu'à une température voisine de 20°C et au rythme nycthémeral normal, la spermiogenèse présente une involution en novembre ;

- d'autre part que, lorsque des sangsues maintenues à l'obscurité totale et à 6-7°C sont placées respectivement à 20°C dans les mêmes conditions d'éclairement, et à 20°C mais soumises au rythme nycthémeral normal, nous constatons, 14 et 21 jours après, une baisse sensible de l'évolution des spermatogonies en spermatocytes chez les premières par rapport aux secondes.

Le résultat de ces expériences laisse supposer une intervention de la lumière dans la régulation de l'activité reproductrice. Cependant les conditions expérimentales et le petit nombre d'animaux étudiés ne nous ont pas permis d'apporter une conclusion définitive, c'est pourquoi nous avons repris cette étude chez *P. geometra*.

### 1 - RESULTATS

(Les conditions expérimentales ont été définies dans le chapitre sur la croissance).

Les élevages sont faits à une température constante de 15°C.

L'examen du tableau 15 montre que la ponte n'est bloquée qu'à 12 heures de lumière sur 24. Elle est retardée pour les courtes durées d'éclairement (8 h, obscurité) par rapport aux longues (18h et 24 h). Afin

Tableau 15 - Epoque d'apparition de la lère ponte chez des *P. geometra* placées à une température constante de 15°C et soumises à un éclairage variable.

Durée journalière de l'éclairage	24 h	18 h	12 h	8 h			0 h*
				1e série	2e série lot 1    lot 2	3e série	
Nombre d'animaux au début de l'expérience	43	45	43	22	18    42	22	29
Nombre d'animaux lors de la lère ponte	43	45		18	18    42	7	11
Intervalle entre les prises de nourriture (en jours)	voir fig. 6	voir fig. 7	voir fig. 8	7	7    7	7	7
Temps écoulé entre le 1er repas et la lère ponte (en jours)	40	32	Pas de ponte jusqu'à la mort de la dernière sangsue 9 mois après	87	77    77	64	57

\* Ces sangsues subissent deux phases d'éclairage de courte durée par semaine. La première de quelques minutes lors de l'introduction du poisson dans l'aquarium, la seconde d'une durée de 10 mn environ lors de son enlèvement 24 heures après.

BHS  
LILLE

de déterminer la durée de la photophase provoquant un blocage de la ponte, nous avons élevé pendant 41 et 155 jours des sangsues à une photopériode de 12 h/24 puis nous les avons soumises à des durées d'éclairement différentes. Les résultats sont consignés dans le tableau 16. Ils confirment l'efficacité de l'équilibre entre longueurs du jour et de la nuit sur l'inhibition de la ponte. Un éclairage de 10 h sur 24 s'est révélé efficace dans un cas sur deux. Nous avons effectué une étude histologique de deux lots de sangsues élevées à 15°C et soumises à 12 heures d'éclairement sur 24 :

- 1er lot : il est composé de huit *P. geometra* âgées de 47 jours au moment de la fixation. Elles ont été nourries 7 fois. L'une contient des testicules au stade 2, des ovaires et des glandes clitelliennes au stade 1 ; les sept autres des gonades mâles en début de stade 4 (les vésicules séminales sont vides), un atrium en début d'activité sécrétrice, des gonades femelles au stade 2, des glandes clitelliennes au stade 1.

- 2ème lot : il est composé de six *P. geometra* âgées de 133 jours au moment de la fixation. Elles ont été nourries 11 fois et pèsent respectivement : 12, 21, 25, 25, 28 et 34 mg. Dans tous les cas les testicules sont au stade 4 ; les vésicules séminales sont remplies de spermatozoïdes et l'atrium génital mâle est actif. Dans deux cas les ovaires sont au stade 3 et les glandes clitelliennes au stade 2. Les quatre autres sangsues sont à maturité sexuelle (glandes clitelliennes en début d'activité). Les témoins non fixés de cette série ne se sont pas accouplés et n'ont pas pondu jusqu'à leur mort, survenue pour le dernier au bout de 9 mois.

## 2 - DISCUSSION

Les résultats précédents montrent qu'à une température constante de 15°C, la ponte peut être inhibée en soumettant les sangsues en élevage à une durée d'éclairement de 12 heures par jour.

Par contre, elle s'observe toujours dans le cas de longues et de courtes photophases. L'obscurité et l'éclairement continus donnent le même résultat. Donc, parmi toutes les possibilités de variations photopériodiques dans un cycle de 24 heures, seule une zone très réduite est efficace pour inhiber l'activité reproductrice de *P. geometra* : c'est celle qui encadre le point d'équilibre entre le jour et la nuit. L'action d'un éclairage de même nature se retrouve chez certains Insectes. Chez ces derniers, il est à l'origine d'une induction de la diapause et la courbe qui donne le pourcentage de réussite en fonction de la photopériode est du type III défini par BECK (1968). Pour cet auteur, l'absence de diapause observée pour des photophases inférieures à 8 heures est due au fait qu'il s'agit d'une situation

Tableau 16 - Epoque d'apparition de la 1ère ponte chez des *P. geometra* élevées d'abord pendant 155 jours pour la série I et 41 jours pour la série II, à 15°C et 12h/24 d'éclairément, puis soumises à une photopériode différente. Les sangsues sont nourries tous les 7 à 10 jours. Dans le cas des animaux qui ne pondent pas, l'expérience s'arrête avec leur mort.

Durée journalière de l'éclairément	24 h	20 h	18 h		16 h	14 h	12 h		10 h	
Série	I	II	I	II	II	II	I	II	I	II
Nombre d'animaux au début de l'expérience	4	20	4	20	20	20	4	20	4	20
Nombre d'animaux lors de la 1ère ponte	4	16	4	15	15	18				15
Temps écoulé entre le début de l'expérience et la 1ère ponte (en jours)	14	17	24	17	17	19	Pas de ponte	Pas de ponte	Pas de ponte	38



que les animaux ne rencontrent pas dans la nature. Les résultats enregistrés pour ces photopériodes sont donc sans signification écologique.

Chez *P. geometra* l'activité reproductrice s'arrête en fin septembre-octobre, c'est-à-dire pendant une période de l'année où les températures extérieures sont encore relativement élevées et donc où les eaux ne sont pas encore refroidies (Tableau 14). Cette température est encore compatible avec la reproduction si on la compare à celle qui règne en mars, avril et mai (Tableau 14), période de ponte très active. L'instauration de la période hivernale de repos reproducteur apparaît donc comme étant induite par la photopériode voisine de 12h/24 et non par une chute de la température des eaux.

Nos résultats montrent qu'une photopériode de 12h/24 est toujours efficace, 10h/24 une fois sur deux et 14h/24 ne l'est pas. Cependant la température à laquelle nous avons mené nos expériences est élevée (15°C) ; or les résultats obtenus chez les Insectes, répondant au type III d'induction de la diapause, montrent que pour une même espèce la zone des photopériodes efficaces est d'autant plus importante que la température est basse (BECK, 1968). Il est donc très vraisemblable que chez *P. geometra* l'inhibition de la ponte pendant l'hiver est induite à basse température par une gamme assez étendue de photopériodes situées autour de 12h/24 d'éclairément.

Parmi les Annélides Polychètes, une action de la lumière a été mise en évidence chez *Platynereis dumerilii* par HAUENSCHILD (1955, 1956, 1959, 1960). Cet auteur montre que l'activité reproductrice de cette espèce est rythmique et soumise à un cycle photopériodique vraisemblablement lunaire. Expérimentalement le début d'une phase d'éclairément partiel (photopériode de 12h/24) conditionne l'apparition 16 à 20 jours plus tard d'un maximum d'activité reproductrice.

La comparaison de l'évolution des caractères sexuels des *P. geometra* élevées à 15°C sous une photopériode de 12h/24 à celle des sangsues maintenues à la même température mais sous un éclairément de 18h/24 (Tableau 12) met en évidence que la lumière agit en retardant considérablement l'époque d'apparition de la maturité sexuelle et en dernier ressort en inhibant le comportement reproducteur (accouplement et ponte).

L'examen du nombre de cocons déposés par les sangsues soumises à une photopériode de 24h/24 (Fig. 6) et 18h/24 (Fig. 7) montre que la ponte est beaucoup plus faible dans le premier cas. Cette différence est à attribuer non pas à un effet de l'éclairément sur la ponte, mais à son action

sur la croissance et aux perturbations du comportement qu'entraîne l'absence d'une phase d'obscurité. Une diminution du nombre d'individus en ponte a d'ailleurs été constaté chez *T. rude* par HAGADORN (1962) dans des conditions identiques.

Un autre effet de la lumière a été mis en évidence chez *E. octoculata* par GREENE (1974), qui a montré que l'éclairement jouait un rôle dans le cycle quotidien d'activité. Cette sangsue s'alimente en effet beaucoup plus activement la nuit.

## B - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

L'influence de la température sur la reproduction des Hirudiennes est connue depuis longtemps et la plupart des auteurs considèrent que c'est le facteur essentiel qui la régit. BENNIKE (1943) et PERRET (1952) notent que la reproduction ne se fait pas à une température inférieure à 11°C pour *G. complanata*, 15°C pour *G. heteroclita*, 16°C pour *H. marginata*, 12°C pour *T. tessulatum* et *H. stagnalis*. MANN (1957a) constate que la ponte des *G. complanata* vivant à basse température est en retard sur celle des individus de la même espèce vivant dans des eaux plus chaudes. La période de reproduction d'*H. stagnalis* est beaucoup plus courte dans l'Alberta (Canada) où elles ne pondent qu'une seule fois (DAVIES et REYNOLDS, 1975) que dans le lac Utah où s'observent deux pontes successives (TILLMAN et BARNES, 1973). Dans le premier cas la température maximale de l'eau est de 20°C ; elle est de 30°C dans le second. CRISTEA (1970) a observé chez *E. testacea* un retard de la ponte d'un mois en 1969 par rapport à 1968, année où le printemps a été beaucoup plus chaud. Les observations de SAPKAREV (1969) en Macédoine vont dans le même sens. Il semble donc bien établi chez les *Glossiphoniidae* et les *Erpobdellidae* que le facteur essentiel déclenchant la ponte au printemps est la température. Cependant, les observations que nous avons faites dans la nature montrent que la période d'activité reproductrice commence chez *P. geometra* lorsque la température est encore très basse. TEREKHOV (1967) constate chez la même espèce que la ponte apparaît à 4-5°C et qu'un abaissement de la température à + 1-0°C ne l'arrête pas mais la ralentit. De ce fait, nous avons tenté de préciser certains aspects de l'action de la température sur la reproduction de *P. geometra*.

### 1 - RESULTATS

a - L'examen des figures 15, 16 et 17 montre qu'une photopériode de 12h/24 bloque la ponte à 15°C mais non à 17,5°C et 20°C.

Du résultat de cette expérience, nous pouvons conclure que l'éclairement agit sur la ponte jusqu'à une certaine température située entre 15 et 17,5°C, mais qu'il est sans effet au-delà. Ce rôle prépondérant d'une température élevée sur la photopériode a été confirmé par de nombreux résultats d'élevage. Dans une série expérimentale comprenant cinq lots de 20 sangsues élevées à 18°C environ sous un éclairement photopériodique de 12h/24 et placées respectivement en lumières jaune, verte, rouge, bleue et blanche, l'apparition des premiers cocons s'observe dans tous les aquariums en l'espace de huit jours.

b - L'examen des figures 10, 11 et 12 montre que la ponte survient quelle que soit la température quand l'éclairement est suffisant (photopériode de 18h/24), et d'autant plus tardivement que la température est basse. Nous avons observé l'apparition des premiers cocons après 70 jours d'élevage dans un lot de 25 sangsues placées à 8°C et éclairées 24h/24 (un poisson a été laissé en permanence dans l'aquarium).

c - L'examen du tableau 6 (p. 24) montre que le nombre de cocons déposés par sangsue est plus faible à 10°C qu'à 20 et 25°C et que la fréquence avec laquelle se succèdent les pontes (nombre de cocons déposés par semaine et par sangsue) est d'autant plus faible que la température est basse.

## 2 - DISCUSSION

De ces résultats il ressort que la température n'est prépondérante sur l'éclairement que lorsqu'elle s'élève au-delà d'une limite située entre 15 et 17,5°C. Au printemps la reproduction de *P. geometra* commence alors que les eaux sont encore très froides ; il est donc évident que le facteur actif est non pas la température mais très certainement la lumière. Deux hypothèses permettent d'expliquer la levée de l'inhibition exercée par l'éclairement sur le comportement reproducteur :

- soit un arrêt de l'inhibition dû aux courtes photophases de fin décembre,

- soit une levée d'inhibition liée à l'accroissement de la durée quotidienne d'éclairement qui commence début janvier et dont l'effet a déjà été observé par exemple sur l'interruption de la diapause de la libellule *Aeschna cyanea* (SCHALLER, 1965).

Le fait que les sangsues ne commencent à s'accoupler qu'en mars est vraisemblablement dû au délai important qui sépare, à basse température, l'apparition des conditions d'éclairement favorables et les premières

manifestations de l'activité reproductrice comme le montre le résultat de l'expérience suivante : un élevage de *P. geometra* est mené à 15°C avec une photopériode de 12h/24 pendant 68 jours ; à cette date il est scindé en deux lots, l'un placé à 22°C (5 sangsues de masse moyenne 27,2 mg), l'autre à 10°C et 18 h d'éclairement sur 24 (5 sangsues de masse moyenne 29,4 mg) ; la ponte s'observe dans le premier lot 13 jours après, mais seulement dans un délai de 41 jours dans le second.

Le fait que l'inhibition de l'activité reproductrice de *P. geometra* est due à la lumière permet d'émettre une autre hypothèse pour expliquer les observations faites par BECKER et KATZ (1965) chez une autre *Piscicolidae* : *P. salmositica*. Chez cette espèce, la ponte se fait d'octobre à mars. Elle commence à 11,7°C et se continue pendant la période de l'année où la température de l'eau est la plus basse : 5°C. Ce cycle très particulier est adapté à celui de la migration des saumons, hôtes de ces parasites comme l'indiquent les auteurs, mais il n'est pas exclu que le déclenchement de la ponte soit sous le contrôle des variations photopériodiques.

La température joue cependant un rôle non négligeable dans deux domaines, la fréquence des pontes d'une part, la maturation génitale d'autre part.

- Fréquence des pontes - Comme nous l'avons observé, elle diminue quand la température baisse. La même observation est faite chez les Oligochètes : MICHON (1954) observe que chez des *E. foetida* élevés à 18°C la ponte est inférieure de moitié à celle obtenue à 28°C. TEREKHOV (1967) place des *P. geometra* matures, élevées à 24-28°C, dans des eaux plus froides et constate que chaque sangsue dépose 1 à 2 cocons en 24 h à 22°C ; 0,5 à 17°C, très peu à 12°C (2 à 5 par aquarium de 20 à 30 individus). La ponte cesse à 8°C. Par contre, ce même auteur note comme nous qu'une brusque augmentation de la température de l'eau accroît d'une manière sensible la production de cocons. Ces constatations nous permettent d'expliquer une des particularités du cycle biologique de *P. geometra*. En effet, bien que la période de reproduction commence fin février, nous ne trouvons en abondance des jeunes qu'en mai. Cela peut s'expliquer par une fréquence très faible des pontes et aussi par la plus grande durée du développement embryonnaire, conséquence des basses températures des eaux en mars et début avril. Les pontes doivent se faire massivement quand les eaux atteignent une certaine température en avril, ce qui explique l'abondance des jeunes début mai. TEREKHOV (1967) constate qu'au printemps les pontes sont très nombreuses à 6-8°C.

- Maturation génitale - Le fait qu'une basse température retarde l'époque d'apparition de la maturité sexuelle dans des conditions d'éclairement favorable (Figs 10, 11 et 12) laisse supposer qu'elle ralentit le développement des glandes génitales. C'est ce que nous observons en novembre, décembre et début janvier, où son action s'ajoute à celle de l'éclairement. Les testicules parviennent au stade 4 en hiver lorsque les sangsues atteignent un poids plus élevé qu'en été (Fig. 226) ; ce processus est encore plus net en ce qui concerne l'ovogenèse (Fig. 224). Il s'agit d'un ralentissement de la différenciation des gonades et non pas d'un arrêt. En effet, les ovaires atteignent le stade 4 pendant la période la plus froide de l'année c'est-à-dire fin janvier-février. Ce résultat est différent de celui que nous avons obtenu avec *H. medicinalis* (MALECHA, 1970b). Chez cette espèce, un élevage à 6-7°C bloque la maturation génitale mâle au stade 2. Des testicules parvenus au stade 4 retournent au stade 2 lorsque les sangsues sont placées à cette température. Cette différence est certainement en relation avec le cycle biologique d'*H. medicinalis* qui présente normalement une période de régression testiculaire hivernale. Il est possible également que l'activité reproductrice des *Hirudidae* comme celle des *Erpobdellidae* et des *Glossiphoniidae* soit beaucoup plus influencée par la température que celle de *P. geometra*. *H. medicinalis*, comme *P. geometra*, présente une accélération de la maturation génitale quand la température s'élève. La même constatation a été faite chez les Annélides Polychètes (DURCHON et PORCHET, 1971 ; BOILLY-MARER, 1971 ; PORCHET, 1976). HALVORSEN (1971) pense que la température est l'un des deux facteurs qui régissent le cycle biologique de la *Piscicolidae* *C. mammillatus*, l'autre étant une corrélation avec la migration saisonnière de son hôte (*Lota lota*). Cependant cette hypothèse n'est étayée par aucune donnée expérimentale.

## C - INFLUENCE DE LA NUTRITION

A notre connaissance, aucune étude n'a été faite jusqu'à présent sur l'influence de la nutrition sur l'activité reproductrice des Hirudinées. Nous envisagerons successivement les effets du jeûne sur la ponte et sur les caractères sexuels.

### 1 - INFLUENCE DE LA NUTRITION SUR LA PONTE

#### a - Conditions expérimentales

Les élevages sont conduits à 15°C avec une photopériode de 8h/24, 18h/24 et 24h/24. Les sangsues sont réalimentées lorsque la ponte a cessé depuis 24 ou 48 heures.

Tableau 17 - Evolution des caractères sexuels au cours du jeûne chez *P. geometra*.

Temps séparant la dernière prise de nourriture de la fixation (en jours)	3	10	21	75
Nombre de sangsues	6	6	6	3
Poids moyen en mg	6,25	5,03	3,58	3
Ecart-type	0,69	0,95	0,63	0,50
Ovaires	Stade 4	Stade 4	Stade 4	début de stade 2 + ovocytes matures en dégénérescence
Glandes clitelliennes	Stade 3	Stade 3	Stade 2	Stade 1
Testicules	Stade 4	Stade 4	2 sangsues au stade 2b 2 sangsues au stade 2b avec quelques rares stades 3 et 4 2 sangsues au stade 4	Stade 1
Présence de spermatozoïdes dans les vésicules séminales	+	+	+	+
Activité sécrétrice de l'atrium génital mâle	+	+	+	+

BUS  
LILIE

b - Résultats

L'examen des figures 6 et 7 montre que la durée de la période de ponte est directement liée à l'alimentation. Lorsque le dépôt des cocons a cessé, une réalimentation entraîne sa réapparition 24 à 48 heures après, pendant une nouvelle période qui dure de 7 à 11 jours. Le dépôt du maximum de cocons se situe entre le 3e et le 7e jour suivant le dernier repas (Fig. 227).

A - INFLUENCE DU JEÛNE SUR LES CARACTERES SEXUELS

a - Conditions expérimentales

Les sangsues sont élevées à 15°C avec une photopériode de 18h/24. L'expérience a été réalisée sur des *P. geometra* au début de leur période de maturité sexuelle (deux semaines de ponte) afin d'éliminer une interférence possible avec des processus de sénescence.

b - Résultats

Ils sont résumés dans le tableau 17.

α - La fonction femelle

L'arrêt de la ponte n'est pas provoqué par un manque d'ovocytes matures mais par une absence de synthèses des sécrétions au niveau des glandes clitelliennes. A la fin de la période de ponte qui suit le dernier repas ces glandes sont pratiquement vides et leur cytoplasme comporte de grandes vacuoles. Lorsque la période de jeûne se prolonge, les sécrétions qu'elles contiennent disparaissent. Le noyau reste cependant volumineux ce qui donne à ces cellules l'apparence du stade 2. La présence de vacuoles indique très clairement qu'il ne s'agit pas d'une phase d'activation mais de régression. Chez certains individus quelques très rares granules peuvent encore être trouvés dans les corps cellulaires et les canaux excréteurs. La régression va se poursuivre jusqu'au stade 1. L'ovogenèse ne semble affectée que tardivement. Elle est bloquée au début du stade 2. Les ovocytes en croissance au commencement de la période de jeûne achèvent leur évolution comme en témoigne la présence tardive de stades 4 en dégénérescence.

Cependant une activation spontanée de l'ovogenèse telle qu'elle a été constatée au cours du jeûne de l'Oligochète *E. foetida* par HERLANT-MEEWIS (1965 - 1966) n'est pas à exclure.

Nous avons observé dans certaines séries expérimentales chez des *P. geometra* non nourries depuis deux semaines et dont les oviductes contiennent de très nombreux stades 4, une intense vacuolisation

dans la plupart de ces ovocytes (Fig. 241). Il est cependant très difficile de savoir s'il s'agit d'un effet du jeûne ou d'une dégénérescence normale des ovocytes âgés non pondus. Cette dernière hypothèse nous paraît la plus vraisemblable puisque, dans ce cas, les autres caractères sexuels ne sont pas affectés.

Les spermatozoïdes issus d'une insémination précédant le jeûne et contenus dans l'ovaire sont encore présents à la fin de l'expérience.

L'aspect et l'importance du tissu vecteur ainsi que les sécrétions de l'aire copulatrice ne nous sont pas apparus affectés par le jeûne.

### β - La fonction mâle

Les testicules sont particulièrement sensibles à une interruption de l'alimentation. Ils sont bloqués en prophase de méiose (stade 2b) beaucoup plus rapidement que ne l'est l'ovogenèse. Les groupes isogéniques qui ont passé cette étape achèvent leur maturation et les spermatozoïdes formés vont s'ajouter à ceux des vésicules séminales. Après 75 jours de jeûne les testicules ne contiennent que des spermatogonies, les stades 2 ont dégénéré.

Cependant, la sangsue semble encore capable de produire des spermatophores normaux puisque les vésicules séminales sont remplies de gamètes mâles et les cellules glandulaires de l'atrium riches en produits de sécrétion.

### 3 - DISCUSSION

Nous constatons de grandes similitudes entre l'effet du jeûne sur la maturation génitale et la ponte chez l'Oligochète *E. foetida* (HERLANT-MEEWIS, 1962, 1965 - 1966) et l'Hirudinée *P. geometra* :

- arrêt de la ponte,
- régression des glandes clitelliennes,
- blocage de la spermatogenèse en prophase de méiose,
- possibilité d'une reprise de la ponte sans un nouvel accouplement.

Il existe cependant des différences entre les deux espèces :

- Chez *E. foetida*, l'arrêt de la ponte suit immédiatement celui de la nutrition ; il est dû à une involution des ovocytes qui ont terminé leur vitellogenèse. Le clitellum ne s'estompe que deux semaines après.
- Chez *P. geometra*, le dépôt des cocons cesse 8 à 12 jours après le dernier repas, quand le contenu du tube digestif a été métabolisé, mais il est dû à un arrêt des synthèses au niveau des glandes clitelliennes

et non pas à une dégénérescence d'ovocytes matures. Cette dernière ne survient que très tardivement.

- Chez *P. geometra*, il ne semble pas qu'il y ait un blocage de la méiose dans les ovaires comme chez *E. foetida*, mais plutôt un arrêt des possibilités d'accroissement.

- La régression testiculaire se fait en deux étapes chez *P. geometra* : d'abord un arrêt en prophase de méiose comme chez *E. foetida*, puis quand le jeûne se prolonge, une dégénérescence de ces stades. Il ne subsiste plus que des spermatogonies.

- Contrairement aux Oligochètes chez lesquels tous les caractères sexuels secondaires régressent, chez *P. geometra* l'aire copulatrice, le tissu vecteur, ne semblent pas affectés et l'atrium mâle reste toujours actif.

#### D - CONCLUSION

Le cycle annuel de l'activité reproductrice de *P. geometra* est sous la dépendance de la lumière et de la température. Une photopériode voisine de 12h/24, telle qu'elle survient dans la nature au début de l'automne, retarde la maturation génitale et empêche l'apparition du comportement reproducteur chez les jeunes sangsues. La levée de l'inhibition est liée, soit aux courtes photophases de la fin de l'année civile, soit à l'accroissement des durées quotidiennes d'éclairement qui les suit.

Bien que les grandes étapes du cycle soient régies par la lumière, la température joue un rôle important. Lorsqu'elle est élevée, elle active la maturation génitale et au delà d'une température située entre 15 et 17°C elle rend inopérante l'action de la lumière. Chez des animaux en reproduction la ponte est ralentie à basse température. Au printemps, l'existence d'un seuil thermique à partir duquel les pontes deviennent abondantes est très probable.

Le jeûne intervient d'une manière très sensible sur l'activité reproductrice. La ponte est inhibée à la suite de l'impossibilité où se trouvent les glandes clitelliennes de synthétiser les sécrétions nécessaires à l'élaboration des cocons. L'ovogenèse est atteinte tardivement : la croissance ovocytaire ne peut s'effectuer. L'effet du jeûne est très rapide au niveau des testicules dont les spermatocytes sont d'abord bloqués en prophase de méiose puis dégènèrent. Ils ne contiennent finalement que des spermatogonies. Cependant les spermatozoïdes des vésicules séminales ne sont pas phagocytés et l'atrium mâle reste actif. Le tissu vecteur et l'aire copulatrice ne semblent pas affectés.

## VI - INFLUENCE DES FACTEURS INTERNES SUR

### LA MATURATION SEXUELLE DE P. GEOMETRA

#### A - RESULTATS DES RECHERCHES CHEZ LES AUTRES HIRUDINEES

(MALECHA, 1970c).

##### 1 - RÔLE DU CERVEAU CHEZ T. RUDE (HAGADORN, 1962)

La première étude expérimentale de la maturation sexuelle chez les Hirudinées a été effectuée par HAGADORN (1962) chez *T. rude* (Hirudinée Rhynchobdelle). Elle a porté sur l'ovogenèse, la spermatogenèse et l'évolution des glandes de l'atrium génital mâle et a donné les résultats suivants :

- Ovogenèse : l'ablation du cerveau en hiver, avant l'activation des gonades qui survient en février, maintient les ovaires en inactivité. Cette opération pratiquée en période de reproduction n'entraîne aucune dégénérescence et la vitellogenèse semble se poursuivre. La ponte est cependant bloquée par une réaction, apparemment d'origine purement nerveuse.

- Spermatogenèse : lorsqu'on procède à l'ablation du cerveau en janvier, deux mois plus tard le contenu testiculaire ne comporte plus que les premiers stades de la spermatogenèse et on note une importante diminution du nombre des gamétocytes présents, due à la phagocytose des stades plus évolués. La décérébration pratiquée en été reste sans effet au niveau des testicules.

- Glandes de l'atrium mâle : l'ablation du cerveau pendant qu'elles sont en phase inactive les maintient à ce stade ; cette même opération pratiquée en phase d'activité est sans effet.

Ces résultats mettent en évidence une influence exercée par le cerveau sur les gonades et sur l'activation des glandes atriales de *T. rude*. Au niveau des ovaires cette action semble intervenir sur les premiers stades de l'ovogenèse. En ce qui concerne la spermatogenèse le stade spermatocyte I (stade 4 de l'auteur) semble constituer le point sensible. Par contre, la présence du cerveau ne paraît pas nécessaire lorsque les processus de maturation sont engagés. L'implantation de cerveaux à des animaux décérébrés en hiver ou en été est sans effet. L'échec de ce type

d'expérience n'a pas permis de conclure d'une manière formelle à une action de type hormonal. D'autres données obtenues *in vivo* (HAGADORN, 1966b, 1967, 1969) et *in vitro* (MALECHA, 1967, 1970a) ont apporté des renseignements relatifs à l'action du cerveau sur la spermatogenèse chez *H. medicinalis*.

## 2 - RÔLE DU CERVEAU CHEZ *H. MEDICINALIS*

### a - Résultats obtenus *in vivo* (HAGADORN, 1966b, 1967, 1969)

Les travaux ont porté sur des sangsues dont les groupes isogéniques les plus évolués sont respectivement les stades 2 (HAGADORN, 1966b, 1967) et les stades 3 ou 4 (HAGADORN, 1969). En fin d'expérimentation les témoins sont à maturité sexuelle dans les deux cas. L'ablation du cerveau provoque une chute du nombre des groupes isogéniques présents et une baisse dans la proportion des stades 3 et 4 dans le premier cas ou 2 et 3 dans le second cas. Le nombre des phagocytes augmente. Chez les opérés témoins qui subissent toutes les opérations précédant la décérébration on observe une nette différence avec les témoins naturels ; on enregistre, en effet, une augmentation des stades 1, une diminution de la densité gamétocytaire et un accroissement des phagocytes.

L'injection, à intervalles réguliers, à des sangsues décérébrées de cerveaux préalablement stockés à -20°C après avoir été ou non lyophilisés rétablit une proportion normale des différents stades sans cependant donner des résultats superposables à ceux des témoins. L'injection de muscles, prélevés dans les mêmes conditions que les cerveaux, à des sangsues décérébrées est par contre sans effet.

La phosphatase acide étant particulièrement abondante au niveau des phagocytes, son dosage a permis d'obtenir des données sur les variations quantitatives de ces cellules. On observe en particulier un doublement du pourcentage de phosphatase acide chez les sangsues décérébrées. Le contenu protéinique du testicule dont le taux est uniquement affecté par les variations du nombre des gamétocytes et des phagocytes montre une chute de 50 % chez les individus privés de cerveau ce qui indique une baisse d'au moins 50 % des groupes isogéniques puisque le nombre des phagocytes a augmenté. Cependant, chez les animaux ayant reçu des injections de cerveaux, on constate une baisse en protéines de 50 %, ce qui peut s'expliquer par une faible augmentation du nombre des groupes isogéniques contrebalancée par une moindre proportion des phagocytes.

b - Résultats obtenus *in vitro* (MALECHA, 1967, 1970a).

La technique des cultures *in vitro* permet de suivre l'évolution du contenu des testicules d'un même animal.

Lorsque des gonades mâles ne contenant que des stades 1 et 2 sont explantées *in vitro*, les stades 3 apparaissent après 7 jours de culture et leur nombre croît ensuite ; quelques-uns d'entre-eux donnent des spermatozoïdes au cours de la 3e semaine de survie *in vitro*. Les stades 2b disparaissent et le nombre de gamétocytes décroît nettement. Les spermatogonies continuent cependant à se diviser. L'association en culture d'un cerveau et d'un testicule permet de rétablir une spermatogenèse normale.

L'explantation de testicules contenant des stades 1, 2 et 3 montre que ces derniers achèvent leur maturation en milieu anormal. Les stades 2b évoluent pendant la première semaine de culture *in vitro* en stades 3 puis ceux qui n'ont pas subi cette évolution ou qui proviennent de celle des stades 2a sont activement phagocytés.

c - Discussion de ces résultats

La décérébration ou la culture de testicules isolés se traduit :

- par une chute du nombre total des groupes isogéniques.
- par une phagocytose active des stades 2b après une semaine de culture *in vitro*.
- par la persistance des mitoses goniales.
- par la poursuite de la spermiogenèse se traduisant par un passage au stade 4 des stades 3 qui ne sont pas remplacés.
- par la maturation d'un nombre réduit de groupes isogéniques en partant d'animaux en repos génital.

D'autre part, l'injection de cerveaux pratiquée chez des individus décérébrés est suffisante à pallier l'ablation du collier péri-oesophagien. Une injection de muscles est sans effet.

On peut conclure d'après ces résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* que l'action stimulatrice exercée par le cerveau sur la gamétogenèse est de nature hormonale.

Il convient cependant de chercher à préciser à quel moment cette action intervient au cours de la maturation génitale. En ce qui concerne la spermatogenèse les expériences poursuivies ont montré que la présence du cerveau n'est pas nécessaire à la poursuite des divisions goniales et au déroulement de la spermiogenèse quand le stade 3 a été atteint. Le stade le plus affecté par l'absence du facteur cérébral est le

stade 2b. Il est donc permis de penser que l'action gonadotrope du cerveau est nécessaire pour que la mitose réductionnelle puisse s'effectuer normalement. HAGADORN émet l'hypothèse d'une action au stade 2 ou au moment du passage du stade 1 au stade 2 ; ce dernier stade correspond probablement aux spermatogonies de dernière génération et aux spermatocytes I.

La maturation de certains gamétocytes en milieu an-hormonal chez des animaux primitivement en repos génital a également été observée dans quelques cas chez *T. rude* par HAGADORN (1962). Cet auteur explique ce fait par la présence de groupes activés qui achèveraient leur maturation. L'effet d'un choc thermique n'est cependant pas à exclure *in vitro*.

Chez tous les individus ayant subi une intervention chirurgicale, on constate une baisse du nombre total des groupes isogéniques qui subsiste après l'injection de cerveaux. HAGADORN attribue cette baisse à la perte, consécutive à l'opération, d'éléments nutritifs contenus dans le tube digestif.

Chez certains opérés témoins, l'état du contenu testiculaire est voisin de celui des sangsues décérébrées. HAGADORN explique ce fait par un risque certain de lésion du cerveau au cours de l'opération.

Ces résultats ont été confirmés récemment chez une autre *Hirudidae* : *Poecilobdella viridis*, par NAGABHUSHANAM *et al.* (1976).

### 3 - RÔLE DES GANGLIONS BUCCAUX CHEZ *E. OCTOCULATA*

VAN DAMME (1976) a montré chez *E. octoculata* que la destruction des ganglions buccaux (système nerveux stomatogastrique) à un stade juvénile entraîne une maturation génitale précoce, à la fois chez des animaux s'alimentant normalement et chez ceux restés à jeun. L'auteur conclut que "l'inhibition de la maturation génitale chez la sangsue impubère paraît dès lors attribuable à une "hormone juvénile" libérée au niveau des ganglions buccaux".

### 4 - RÔLE DU CERVEAU CHEZ *T. TESSULATUM*

Récemment (MALECHA, 1979) nous avons observé une influence indirecte des ganglions cérébroïdes sur la maturation génitale de *T. tessulatum*. Chez cette espèce l'ablation du cerveau a pour effet de perturber les échanges d'eau ce qui provoque un arrêt de la croissance et par voie de conséquence celui du développement des caractères sexuels.

## 5 - ORIGINE DE L'HORMONE CEREBRALE

L'existence de neurones à caractères sécréteurs dans le cerveau des Hirudinées est connue depuis longtemps. Ils sont en effet signalés pour la première fois par B. SCHARRER (1937) chez *H. medicinalis*. Les études les plus importantes sont dues à HAGADORN (1958). Cet auteur décrit chez *T. rude* deux types de cellules :

- les unes  $\alpha$  colorables par la fuchsine paraldéhyde ;
- les autres  $\beta$  colorables par l'orangé G ou le vert lumière.

Depuis, de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de ces cellules. On peut citer en microscopie photonique ceux de NAMBUDIRI et VIJAYAKRISNAM (1958), LEGENDRE (1959), CZECHOWICZ (1961, 1963, 1968), HAGADORN (1966a), IONESCU-VARO et GRIGORIU (1965), TUMPLING (1965), DAMAS (1966), MISHRA (1967), BIANCHI (1964a, b, 1967a, b, 1969), MALECHA (1970b) et en microscopie électronique ceux de : BERN, NISHIOKA et HAGADORN (1960), BERN et HAGADORN (1965), HAGADORN et NISHIOKA (1961), HAGADORN, BERN et NISHIOKA (1963), CZECHOWICZ et ZARZYCKI (1970), VAN DAMME (1977).

HAGADORN (1962) constate chez *T. rude* pour les cellules  $\alpha$ , un accroissement du matériel fuchsinophile tant dans le péricaryon que dans les axones avant l'activation des testicules et des ovaires. Le maximum d'activité neurosécrétrice est observé en avril au moment où la maturité sexuelle est atteinte. La diminution du matériel fuchsinophile est corrélative d'une réduction de l'activité génitale. Une corrélation évidente s'établit donc entre l'activité génitale et le cycle des cellules  $\alpha$ . Ces dernières pourraient être à l'origine de l'action gonadotrope du cerveau.

Le cycle des cellules  $\alpha$  d'*H. medicinalis* semble être identique à celui de *T. rude* mais il est moins net (HAGADORN, 1966b).

Une telle corrélation a également été observée par CZECHOWICZ (1963) chez *E. octoculata*, *E. testacea* et *G. complanata*. TUMPLING ne décèle aucune activité cyclique de ces cellules chez *T. testulatum*, *G. complanata*, *E. octoculata* et *P. geometra*. DAMAS (1966) pense que l'on peut établir une relation entre le cycle des cellules  $\alpha$  et l'ovogenèse chez *G. complanata*.

La sécrétion de l'"hormone juvénile" d'*E. octoculata* est imputée par VAN DAMME (1976, 1977) à une volumineuse cellule fuchsinophile des ganglions buccaux.

Aucun rôle physiologique précis n'a jusqu'à présent été attribué aux cellules de type  $\beta$ .

Tableau 18 - Ovariectomies et décérébrations pratiquées sur des sangsues dont les glandes clitelliennes sont au stade 3. Durée de l'expérience 12 jours.

		Nombre de sangsues	Masse moyenne en début d'expérience en mg	Masse moyenne en fin d'expérience en mg	Perte de masse	Glandes clitelliennes			Présence de glandes en dégénérescence	Testicules			
						Stade 3 Sécrétion peu abondante	Stade 3 Sécrétion abondante	Stade 3 Sécrétion anormalement abondante		% de stade 1	% de stade 2	% de stade 3	% de stade 4
Témoins fixés le même jour que les opérés	dépôt de cocons	9	16,5	9,6	41 %	5	4		1	30,45	13,62	51,94	3,99
	Pas de cocons	6	11,9	8,1	32 %	4	1	1		11,21	6,60	13,64	3,12
Sangsues ovariectomisées	dépôt de cocons	6	16,5	8,6	48 %		6		4	*	*	*	*
	Pas de cocons	5	17,1	12,3	26 %		2	3	2	30,20	13,51	52,82	3,47
Sangsues décérébrées	dépôt de cocons	0								12,52	4,33	13,77	1,87
	Pas de cocons	15	13,1	10,5	19 %			15		29,19	15,12	52,70	2,99
										6,74	4,96	8,44	1,85

\* : Le comptage a été effectué sur les trois paires de testicules postérieures.



## B - RECHERCHES PERSONNELLES CHEZ P. GEOMETRA

L'ensemble des résultats précédents met généralement en évidence une action gonadotrope du système nerveux des Hirudinées. Cependant avant d'aborder l'étude du rôle du cerveau dans la maturation sexuelle et l'évolution des caractères sexuels somatiques de *P. geometra*, nous avons voulu vérifier l'existence de relations éventuelles entre les différentes parties de l'appareil génital. Nous avons procédé à l'ablation des ovaires et de l'atrium génital mâle. L'insuccès de nos tentatives d'excision des testicules s'explique par leur nombre relativement important. L'opération a en effet pour conséquence la création de nombreuses plaies et multiplie les risques de lésion du tube digestif.

### 1 - OVARIECTOMIE

#### a - Mode opératoire

Après anesthésie au chloréthane à 0,2 %, deux incisions sont pratiquées dans la paroi ventrale au niveau de l'aire copulatrice. Elles sont faites de part et d'autre du plan sagittal afin de ne pas léser la chaîne nerveuse. Les ovaires sont simplement arrachés avec des pinces fines. Les sangsues opérées ainsi que les témoins sont maintenus pendant 10 jours environ dans une solution de Holtfreter additionnée de specilline G (500 UI/ml) et de streptomycine (0,050 mg/ml) puis remis dans de l'eau stérile provenant de l'étang où elles ont été élevées. Elles sont maintenues à 20°C et soumises à une photopériode de 18h/24.

Les sangsues sont toujours nourries 24 h avant l'opération afin d'éviter une interaction entre les effets du jeûne et ceux de l'ovariectomie. Nos premières séries expérimentales, faites sur des animaux récoltés dans la nature et non nourris ont donné des résultats difficilement interprétables, les réponses variant en fonction de l'état alimentaire des opérés.

#### b - Ovariectomies pratiquées sur des sangsues dont les glandes clitelliennes sont au stade 3

Les résultats de deux séries expérimentales sont consignés dans les tableaux 18 et 19.

#### α - Action sur les glandes clitelliennes

L'examen du tableau 18 montre que l'ovariectomie n'empêche pas la formation de cocons qui sont généralement bien formés. Cependant certains de ceux déposés par des sangsues ovariectomisées présentent de petites malformations dans l'ornementation externe.

Tableau 19 - Ovariectomies pratiquées sur des sangsues dont les glandes clitelliennes sont au stade 3. Durée de l'expérience : 23 jours. Les sangsues ont toutes une masse supérieure à 9 mg.

	Nombre de sangsues	Nombre de repas après l'opération	Stade des glandes clitelliennes	Nombre de sangsues avec des glandes clitelliennes en dégénérescence
Témoins fixés le 1er jour de l'expérience	6		3	0
Témoins fixés le même jour que les opérés	6	3	3	0
Sangsues ovariectomisées	7	3	3	7
Sangsues ayant subi une ovariectomie incomplète	9	3	3	9

L'étude histologique montre que chez toutes les sangsues opérées l'activité des glandes clitelliennes se maintient au stade 3 (tableaux 18 et 19, Fig. 230, 231). Certains animaux présentent un pourcentage parfois important de cellules glandulaires en dégénérescence (Fig. 231) à côté d'autres qui restent saines. Le nombre de ces animaux varie suivant les séries opératoires, il est dans un cas de 6 sur 11 (Tableau 18) dans l'autre de 16 sur 16 (Tableau 19).

Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette observation :

- les glandes clitelliennes sont sous le contrôle des ovaires. L'absence de ces derniers entraîne leur dégénérescence. Deux observations rendent cette hypothèse peu probable :

. Toutes les glandes ne dégènèrent pas et la proportion de dégénérescence est variable avec les individus.

. La dégénérescence s'observe chez des sangsues possédant encore un gros fragment ovarien (Tableau 19).

Tableau 20 - Effets de l'ovariectomie sur la spermatogénèse.  
 Durée de l'expérience : 12 jours.

	Nombre de sangsues	Densité de stade 4 et de spermatozoïdes			
		Anormale au niveau de la 1ère paire de testicules	Anormale au niveau de la 3ème paire de testicules	Anormale dans l'un des deux testicules de la 1ère paire	Normale dans tous les testicules
Sangsues ovariectomisées	11	4	1	3	3
Sangsues ayant subi une ovariectomie incomplète	3	2		1	



- La dégénérescence de certaines glandes clitelliennes est consécutive à une lésion de leurs canaux excréteurs au moment de l'opération.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons procédé à une section unilatérale des faisceaux de canaux excréteurs au niveau du 13e métamère. L'opération a porté sur 7 sangsues en ponte (masse moyenne 21,01 mg, écart-type : 6,68). Elles sont fixées 8 jours après. Tous ces animaux déposent des cocons anormaux. La malformation la plus importante est l'absence totale d'ornementation (Figs. 232 et 233). L'examen histologique de ces *P. geometra* montre qu'elles contiennent un nombre très élevé de glandes clitelliennes en dégénérescence.

Ces faits prouvent très nettement que les dégénérescences de glandes clitelliennes ainsi que les malformations de quelques cocons sont le résultat d'une lésion des canaux excréteurs lors de l'ovariectomie.

L'examen du tableau 18 montre que les pertes de masse sont du même ordre chez les animaux témoins et ceux ovariectomisés. Elles sont, dans les deux cas, beaucoup plus importantes chez les sangsues ayant déposé des cocons.

$\beta$  - Action sur l'aire copulatrice et le tissu vecteur

Aucune conclusion ne peut être tirée de l'étude histologique. Ces zones ont en effet subi d'importants remaniements dûs au fait que les plaies opératoires se situent à leur niveau.

$\gamma$  - Action sur la spermatogenèse

A la suite d'une ovariectomie, les testicules les plus antérieurs de certaines sangsues présentent une accumulation anormale de spermatozoïdes puisqu'on ne les y rencontre jamais dans les conditions normales, et de groupes isogéniques au stade 4, très rares normalement (moins de 4 %) avec une réduction corrélative des autres stades (Fig. 234).

L'examen du tableau 20 montre qu'il ne s'agit pas d'une réponse à l'absence d'un facteur ovarien de nature hormonale ; en effet, de nombreux éléments s'opposent à cette hypothèse :

- la composition des testicules les plus postérieurs est très voisine de celle des témoins (Tableau 18) ;

- cette réaction n'affecte généralement qu'une seule des six paires de testicules et assez fréquemment un seul testicule sur les deux.

- cette réaction se produit également quand il reste un important fragment ovarien.

Tableau 21 - Les sangsues élevées *ab ovo* sont nourries 4 fois et opérées 23 jours après la naissance. La fixation est faite quand les premiers témoins déposent des cocons soit 58 jours après l'opération (5 prises de nourriture après l'opération).

	Nombre de sangsues	Masse moyenne en mg	Glandes clitelliennes		
			Stade 1	Stade 2	Stade 3
Témoins fixés le jour de l'opération	6		6		
Témoins fixés en même temps que les opérés	6	4,6		3	3
Sangsues ovariectomisées	3	6,6		3	
Sangsues ayant subi une ovariectomie incomplète	7	6,5	2	3	2

Tableau 22 - Les sangsues élevées *ab ovo* sont nourries 4 fois avant l'opération. Pendant les 38 jours qui séparent l'ovariectomie de la fixation, elles sont nourries cinq fois.

	Nombre d'animaux	Glandes clitelliennes	Nombre de sangsues s'étant accouplées	Nombre de sangsues ayant déposé des cocons
Témoins fixés le jour de l'opération	10	Stade 1		1
Sangsues ovariectomisées	5	Stade 3	5	5



Il s'agit donc vraisemblablement d'un effet local dû à l'opération. Deux hypothèses peuvent être émises pour l'expliquer :

- l'opération entraîne une torsion des vésicules séminales provoquant à ce niveau un engorgement dont la conséquence serait l'impossibilité pour les testicules, et d'abord pour, les plus antérieurs, de se vider de leurs spermatozoïdes.

Cette hypothèse ne nous semble cependant pas à retenir ; en effet, d'une part les vésicules séminales sont capables de supporter des variations de volume considérables, d'autre part, l'observation des coupes ne nous a pas permis de déceler de tels étranglements.

- l'opération entraîne l'impossibilité pour les testicules antérieurs de se vider de leurs spermatozoïdes en agissant soit directement sur le mécanisme de vidange (paralysie musculaire par exemple) soit sur son contrôle nerveux (section de filets nerveux par exemple).

Cet effet de l'ovariectomie semble temporaire puisque 23 jours après l'opération nous n'avons observé de composition testiculaire anormale que dans trois cas sur 16 (7 ovariectomies totales et 9 partielles).

c - Ovariectomies pratiquées sur des sangsues dont les glandes clitelliennes sont au stade 2

Le résultat de cette expérience montre que l'ovariectomie pratiquée à ce stade :

- est sans effet sur l'évolution ultérieure des glandes clitelliennes (Figs. 235 et 236) qui atteignent dans tous les cas le stade 3, de l'aire copulatrice, du tissu vecteur et des testicules.

- n'inhibe pas l'accouplement et l'échange de spermatophores. Les spermatozoïdes se retrouvent dans une poche formée par la prolifération des restes de paroi ovarienne après l'extirpation des ovaires (Fig. 237).

- permet la formation de cocons généralement bien constitués mais évidemment dépourvus d'ovocytes.

d - Ovariectomies pratiquées sur des sangsues dont les glandes clitelliennes sont au stade 1

Les résultats consignés dans les tableaux 21 et 22 nous ont permis d'une part de confirmer les observations précédentes et de constater d'autre part l'absence de toute régénération ovarienne.

e - Conclusion

L'ensemble des résultats précédents met en évidence l'indépendance de l'évolution des glandes clitelliennes, du tissu vecteur

et de l'aire copulatrice vis-à-vis des ovaires. La dégénérescence de certaines glandes clitelliennes après ovariectomie est à attribuer à une lésion de leurs canaux excréteurs au moment de l'opération.

La spermatogenèse n'est pas affectée mais une réaction localisée à la zone opératoire peut cependant se manifester. Elle pourrait être due à un blocage du processus d'expulsion des spermatozoïdes formés.

L'absence d'ovaires n'a aucun effet sur l'accouplement et le dépôt de cocons.

Nous retrouvons donc chez l'Hirudinée *P. geometra* des résultats identiques à ceux obtenus chez les Oligochètes lombriciens par AVEL (1929).

## 2 - ABLATION DE L'ATRIUM GENITAL MÂLE

### a - Conditions expérimentales

Les sangsues sont élevées avant l'opération à 15°C et sont soumises à un éclairage de 12h/24, conditions inhibant la reproduction.

L'ablation de l'atrium se fait grâce à une incision ventrale longitudinale de la paroi de la sangsue, près de l'orifice génital mâle. Ce dernier est enlevé ainsi que la masse glandulaire et la plus grande partie des canaux éjaculateurs. La masse moyenne des 18 sangsues opérées est de 11,98 mg (écart-type : 6,08). Elles sont ensuite placées dans un même aquarium à 20°C et sont éclairées 18h/24.

### b - Résultats

Malgré l'impossibilité pour ces sangsues de produire des spermatophores, elles s'accouplent et déposent des cocons dans lesquels sont pondus des oeufs au stade 4 non fécondés.

L'examen histologique de douze sangsues fixées 35 jours après l'opération montre que :

- la composition du contenu de tous les testicules est normale. Les spermatozoïdes s'accumulent dans les vésicules séminales très distendues. Aucun signe de phagocytose n'est décelé.

- Les cellules glandulaires des portions restantes de canaux éjaculateurs sont actives et ne présentent pas de traces de dégénérescence.

- Les glandes clitelliennes sont au stade 3 et les cocons formés ont une morphologie normale.

- Le tissu vecteur et l'aire copulatrice ne subissent aucune modification de leur structure.

- Le déroulement de l'ovogenèse n'est pas affecté.

Cependant, à l'exception d'un cas sur les douze examinés, les stades 4 sont très rares. Ce déficit peut être attribué à deux causes : d'une part une production importante de cocons dans lesquels sont pondus les ovocytes matures, d'autre part à l'absence de fécondation, ce qui ralentit vraisemblablement le passage des stades 3 au stade 4.

### c - Conclusion

L'évolution des caractères sexuels et le comportement (accouplement, dépôt de cocons) de *P. geometra* ne sont pas affectés par l'ablation de l'atrium génital mâle.

L'absence d'insémination et donc de fécondation des ovocytes semble retarder le passage de ces derniers du stade 3 au stade 4.

## 3 - RÔLE DU CERVEAU

### a - Expériences d'ablation des ganglions cérébroïdes

#### α - Mode opératoire

La paroi dorsale de la sangsue est incisée transversalement au dessus des ganglions cérébroïdes qui sont extraits après section des deux connectifs péripharyngiens. La plaie se cicatrise rapidement sans nécessiter de suture.

#### β - Ablation des ganglions cérébroïdes de *P. geometra* à maturité sexuelle

Les résultats sont consignés dans le tableau 18.

#### \* Effets généraux

Les effets de la décérébration sur la motricité et le contrôle de la ventouse antérieure sont connus depuis longtemps (HARANT et GRASSE, 1959 ; DALES, 1963). Nous constatons en outre :

- l'impossibilité pour les sangsues de se nourrir ce qui entraîne impérativement l'obligation de les alimenter juste avant l'opération et de les fixer dans un délai suffisamment court pour que l'effet du jeûne ne vienne pas interférer avec celui de la décérébration sur le résultat des expériences.

- un arrêt du dépôt des cocons. Il a déjà été observé par HAGADORN (1962) chez *T. rude*. Cet auteur l'attribue à une réaction d'origine purement nerveuse.

- un arrêt des accouplements certainement aussi d'origine nerveuse.

- une perte de masse inférieure à celle observée

Tableau 23 - Résultats de décérébrations suivies ou non de greffe d'une région antérieure d'une autre *P. geometra* et d'ablations de cellules fuchsinophiles cérébrales sur l'évolution des caractères sexuels de sangsues en repos reproducteur hivernal.  
 Durée de l'expérience : 14 jours - Les sangsues sont isolées dans des boîtes de Pétri.  
 \* Nombre d'animaux au début de l'expérience.

	Nombre de sangsues	Masse moyenne au début de l'expérience (en mg)	Masse moyenne à la fin de l'expérience (en mg)	Perte de masse	Glandes clitelliennes			Ovaires			Testicules		
					Stade 1	Stade 2	Stade 3	Stade 2	Stade 3	Stade 4	Stade 2	Stade 3	Stade 4
Témoins fixés au début de l'expérience	11	11,66 (écart-type : 6,76)			10	1		2	8	1		2	9
Témoins fixés à la fin de l'expérience	20 (20)*	11,88 (écart-type : 4,27)	8,30 (écart-type : 3,57)	30,13 %	2	15	3		4	16		3	17
Sangsues décérébrées	20 (20)*	11,31 (écart-type : 3,57)	7,99 (écart-type : 2,80)	29,35 %		2	18			20			20
Sangsues décérébrées + greffe d'une région antérieure d'une autre sangsue	3 (20)*	8,78 (écart-type : 2,28)			1	4	3		3	5		1	7
Sangsues privées des cellules fuchsinophiles cérébrales	20 (20)*	11,51 (écart-type : 3,6)	8,22 (écart-type : 2,93)	28,58 %	1	5	14	1	1	18		2	18



pour les animaux ovariectomisés et les témoins (Tableau 18). Elle est cependant proche de celle des sangsues témoins et ovariectomisées ne pondant pas. Cette perte de masse, plus faible, peut être simplement d'origine métabolique, les sangsues décérébrées ayant une activité beaucoup plus réduite. C'est ce qui est confirmé par les résultats enregistrés lorsque les animaux sont maintenus à l'obscurité (Tableau 23). Dans ce cas en effet les témoins restent au repos et leur perte de masse est très voisine de celle des opérés. Un contrôle du cerveau sur les échanges d'eau du type de celui observé chez les Oligochètes (CARLEY, 1978) nous semble de ce fait peu probable chez *P. geometra*.

\* Action sur les glandes clitelliennes

La décérébration entraîne une accumulation anormale de sécrétions dans les glandes clitelliennes (Tableau 18). Cela se traduit par une hypertrophie des cellules due à l'accroissement de leur contenu en granules de sécrétion. Corrélativement nous observons une diminution de volume du cytoplasme et finalement du noyau (Figs. 238 et 239). La comparaison en microscopie électronique entre l'évolution des glandes des opérés et celle des témoins, ne met pas en évidence de différences quant à l'aspect des organites cellulaires.

L'ablation des ganglions cérébroïdes n'empêche donc pas la poursuite des synthèses au niveau des glandes clitelliennes ; elle provoque leur hypertrophie en entraînant un stockage des sécrétions, inutilisées à la suite de l'inhibition de la ponte consécutive à l'opération.

\* Action sur les ovaires

L'ovogenèse se poursuit normalement en l'absence de cerveau. Tous les stades sont présents et l'on observe des mitoses goniales. Chez certaines sangsues opérées (8 cas sur 15) de nombreux ovocytes au stade 4 sont en dégénérescence (Fig. 241). La même observation peut cependant être faite chez les témoins (9 cas sur 15). Ce résultat ne peut donc pas être attribué à un effet de l'opération. Il s'agit vraisemblablement de la dégénérescence normale des ovocytes âgés qui n'ont pu être pondus.

\* Action sur les testicules

Comme le montre le tableau 18, la proportion des différents groupes isogéniques dans les testicules est presque identique à celle des témoins. L'ablation du cerveau ne semble donc avoir aucun effet sur la spermatogenèse.

\* Action sur les autres caractères sexuels

Comme pour les testicules, la décérébration est sans effet sur l'atrium génital mâle, l'aire copulatrice et le tissu vecteur.

Des résultats identiques aux précédents sont obtenus après ablation totale du collier péripharyngien, ou décapitation. Aucune différence n'est observée entre les sangsues décérébrées et celles chez qui cette opération est suivie d'une greffe de cerveau du même âge.

γ - Ablation des ganglions cérébroïdes de *P. geometra* en période de repos reproducteur hivernal

\* Conditions expérimentales

Cette opération a été pratiquée sur des sangsues récoltées dans la nature en novembre. Elles sont réparties en lots de composition homogène, comprenant une égale répartition d'animaux de masses différentes et comprises entre 6 et 24,2 mg. Après l'opération, les opérées et les témoins sont maintenus à l'obscurité, à une température de 15°C.

\* Résultats

- L'évolution des glandes clitelliennes est nettement accélérée (Tableau 23). Dans deux cas sur vingt, elles sont au stade 2 et appartiennent aux sangsues qui ont la masse la plus faible (6,0 et 6,5 mg).

- L'ovogenèse semble très légèrement accélérée par rapport aux témoins.

- La spermatogenèse ne semble pas affectée. Les trois cas de témoins au stade 2 sont à attribuer à un effet du jeûne.

Les ganglions cérébroïdes semblent donc exercer une action inhibitrice sur l'évolution des glandes clitelliennes et peut-être des ovaires.

Afin de vérifier si cette action est de type hormonal ou nerveux nous avons procédé sur des *P. geometra* décérébrées à des greffes de régions antérieures.

δ - Greffes de parties antérieures de *P. geometra* sur des sangsues en repos reproducteur hivernal et décérébrées

\* Mode opératoire

Les greffons sont constitués par les 10 premiers métamères de sangsues provenant de la même récolte que les porte-greffes et légèrement plus petites. La greffe est faite au niveau d'une incision de la région testiculaire (Fig. 240). Le greffon est maintenu, jusqu'à la cicatrisation, à l'aide d'agrafes en fil d'argent.

\* Résultats

Ils sont consignés dans le tableau 23.

Le greffon exerce une influence inhibitrice sur

l'évolution des glandes clitelliennes et celle de l'ovogenèse. Elle est cependant beaucoup moins importante que celle exercée par le cerveau des témoins surtout si l'on prend en considération le fait que ce sont les plus petites sangsues qui survivent (entre 6 et 12,9 mg). Toutes les *P. geometra* témoins, jusqu'à une masse de 14,4 mg, sont au stade 1 ou 2. Ce résultat est certainement dû au fait que la survie des greffons est médiocre. La plupart d'entre-eux présentent des signes de gonflement à la fin de l'expérience bien que la cicatrisation soit correcte. Ce mauvais état de conservation de certains greffons est confirmé par l'examen histologique.

La décérébration a comme conséquence l'impossibilité pour les sangsues de se nourrir et de ce fait ne permet pas une expérimentation à long terme. Sachant, comme nous l'avons vu précédemment, que de fortes présomptions existent pour que l'action cérébrale sur les gonades soit due aux cellules fuchsinophiles, nous avons tenté de détruire ces dernières sans léser le reste du cerveau afin de permettre l'alimentation normale des sangsues.

b - Expériences d'ablation des cellules fuchsinophiles des ganglions cérébroïdes

α - Caractéristiques de ces cellules

L'examen du cerveau *in vivo* montre que certains neurones apparaissent opalescents et sont donc facilement repérables. L'examen histologique montre qu'il s'agit de 4 paires de cellules fuchsinophiles des follicules latéro-postérieurs du cerveau (Fig. 242). Elles sont de deux types :

- Type 1 : formé par trois paires de grandes cellules d'un diamètre de 40 à 50  $\mu$ , dont les produits de neurosécrétion sont colorés en bleu par la fuchsine paraldéhyde.

- Type 2 : représenté par une paire de cellules plus petites (30  $\mu$  sur 15  $\mu$ ) accolées aux précédentes et dont le produit de sécrétion se colore nettement en violet.

β - Mode opératoire

Après une incision transversale de la musculature dorsale du corps de *P. geometra* nous permettant d'accéder au cerveau, nous ouvrons à l'aide de ciseaux de Pascheff la paroi des follicules contenant les cellules opalescentes. Ces dernières, libérées, flottent dans la solution saline entourant l'animal, attachées à la commissure dorsale par leur axone. Il suffit alors de couper ce dernier.

Tableau 24 - Epoque d'apparition de la ponte chez des *P. geometra* élevées d'abord pendant 39 jours à 15°C et sous une photopériode de 12h/24, puis placées à 20°C ou ayant subi l'ablation des cellules fuchsinophiles cérébrales.

	Nombre de sangsues	Température d'élevage	Durée journalière de la photophase	Délai séparant la 1ère ponte du début de l'expérience	Nombre d'animaux en ponte 45 jours après le début de l'expérience
Lot 1 témoins	12	15°C	12 h	pas de ponte	pas de ponte
Lot 2	12	20°C	12 h	23 jours	12
Lot 3 Ablation des cellules fuchsinophiles cérébrales	9 (12)*	15°C	12 h	14 jours	5

\* Sur les 12 sangsues opérées, 3 ne s'alimentent pas et ne sont donc pas comptabilisées.



γ - Résultats

\* Ablation des cellules fuchsinophiles cérébrales  
de sangsues en reproduction

Cette opération ne modifie en rien leur comportement. Elles s'alimentent normalement lorsque le cerveau n'a pas subi de lésions importantes. Les accouplements et le dépôt des cocons ne sont pas interrompus.

\* Ablation des cellules fuchsinophiles cérébrales  
de sangsues en repos reproducteur hivernal

Cette opération provoque une accélération de l'évolution des glandes clitelliennes (Tableau 23). Elle est cependant légèrement moins efficace que la décérébration. Elle est par contre sans effet sur la spermatogenèse et l'activité de l'atrium génital mâle.

\* Ablation des cellules fuchsinophiles cérébrales  
de sangsues élevées à 15°C et soumises à une  
photopériode de 12h/24

Comme le montre le tableau 24, cette opération accélère l'apparition du dépôt des premiers cocons. Elle est même nettement plus efficace qu'une élévation de température. Cependant quatre sangsues sur les neuf opérées qui s'alimentent ne pondent pas malgré une croissance normale (19, 21, 22 et 35 mg). Elles présentent toutes des ovaires et des testicules au stade 4. Les glandes clitelliennes de l'une sont remplies de sécrétion, celles de deux autres sont au début du stade 3 et celles de la dernière au stade 2. Une seule de ces quatre *P. geometra* avait subi une ablation incomplète et possédait encore une cellule fuchsinophile.

Dans une autre série expérimentale réalisée dans les mêmes conditions que la précédente 7 sangsues sur 13 déposent des cocons 18 jours après l'opération.

L'ablation des cellules fuchsinophiles cérébrales n'a pu être réalisée sur de très jeunes sangsues ; elles ne se distinguent pas à ce stade, *in vivo*, des autres neurones.

c - Discussion

L'ensemble de ces résultats expérimentaux ne met pas en évidence une action homogène du cerveau sur l'évolution des différents caractères sexuels de *P. geometra*. En confrontant ces résultats aux observations relatives au cycle vital de l'espèce nous essayerons de préciser quelle part revient à l'influence du cerveau dans l'évolution génitale de cette sangsue.

α - Les glandes clitelliennes

Les résultats expérimentaux montrent que les synthèses et le stockage des sécrétions se poursuivent chez des sangsues arrivées à maturité sexuelle et décérébrées. Cette même opération pratiquée sur des animaux en repos hivernal entraîne une accélération des processus de maturation des glandes clitelliennes. Il apparaît donc nettement que le cerveau exerce une influence inhibitrice sur l'évolution de ces glandes. Les quelques résultats de greffes réussies apportent de fortes présomptions pour que cet effet soit de type hormonal. Un argument en faveur de cette dernière hypothèse est fourni par les expériences d'ablation des cellules fuchsinophiles qui donnent des résultats très voisins des précédents. La constatation d'une efficacité moindre de cette dernière opération par rapport à la décérébration peut être due au fait que le facteur inhibiteur est sécrété non seulement par ces quatre paires de cellules fuchsinophiles mais aussi pour une moindre part par d'autres neurones. Il faut rappeler que chez les Hirudinées de très nombreuses cellules cérébrales, non considérées comme neurosécrétrices présentent une réaction positive à la fuchsine paraldéhyde (HAGADORN, 1958).

Le fait que TUMPLING (1965) n'observe pas de cycle d'activité des cellules neurosécrétrices de *P. geometra* demande un nouvel examen à la lumière des résultats précédents.

β - L'ovogenèse

La question qui se pose est de savoir si le facteur inhibiteur cérébral exerce également son action sur l'ovogenèse. Deux arguments peuvent être émis à l'encontre d'un tel contrôle :

- l'ablation du cerveau de sangsues à maturité sexuelle est sans effet sur les ovaires.

- l'examen du cycle annuel (chapitre IV) montre une indépendance de l'évolution des ovaires et des glandes clitelliennes en automne. En octobre les ovaires peuvent atteindre le stade 3 ou même 4 (ils régressent ensuite) sans activation des glandes clitelliennes. Ces dernières sont au stade 1 ou 2 en novembre et décembre alors que chez certaines sangsues peuvent apparaître des ovocytes matures (ils dégèrent aussitôt).

Cependant d'autres arguments existent en faveur d'une action du facteur inhibiteur cérébral :

- la décérébration pratiquée sur des sangsues en repos hivernal augmente, chez les opérés, le nombre d'individus au stade 4 par rapport aux témoins (tableau 23).

- On observe toujours la présence d'ovocytes matures chez des sangsues dont les glandes clitelliennes sont au stade 3.

L'ensemble de ces observations suggère que les premières étapes de l'ovogenèse ne sont pas soumises à l'action du facteur inhibiteur cérébral, mais que la disparition de ce dernier, soit par décérébration, soit naturellement, favorise le passage des ovocytes du stade 3 au stade 4 (notamment des non fécondés) et augmente leur durée de survie.

#### $\gamma$ - La ponte

La décérébration inhibe immédiatement la ponte, ce qui suppose un contrôle nerveux de cette dernière (HAGADORN, 1962). L'ablation des cellules fuchsinophiles cérébrales a pour effet d'accélérer l'époque d'apparition de la ponte (Tableau 24). Cette réponse est certainement consécutive à la levée de l'inhibition exercée par le cerveau sur la phase finale de la maturation génitale et non pas à un effet direct sur la ponte. Il faut constater en effet que 4 sangsues sur 9 dans un cas, 6 sur 13 dans l'autre ne pondent pas, bien qu'elles soient à maturité sexuelle. Cependant, dans ce cas, une lésion du cerveau due à l'opération n'est pas à exclure.

#### $\delta$ - La spermatogenèse

L'ablation du cerveau ou des cellules fuchsinophiles est sans effet sur la spermatogenèse. Il semble donc raisonnable d'admettre que le facteur inhibiteur cérébral n'exerce aucune influence sur la gamétogenèse mâle. Cette conclusion est confirmée par l'examen du cycle vital. Ce dernier montre en effet que la spermatogenèse est active pendant toute l'année mais que les stades 4 apparaissent chez des animaux relativement grands pendant la mauvaise saison. Cela peut s'expliquer simplement par des modifications d'ordre métabolique dues aux basses températures de l'eau, sans nécessiter l'intervention d'un facteur humoral.

D'autres caractères sexuels ont une évolution analogue à celle des testicules, ce sont l'atrium génital mâle, l'aire copulatrice et le tissu vecteur.

De cette discussion il ressort que l'activité inhibitrice cérébrale de *P. geometra* n'est certainement pas du même ordre que celle décrite chez les Néréidiens. Dans ce groupe, DURCHON et PORCHET (1970, 1971) montrent que l'activité endocrine cérébrale diminue progressivement au cours du cycle vital et qu'à un taux hormonal déterminé correspond un état génital donné (PORCHET, 1976). Un tel modèle peut se concevoir pour expliquer l'ordre chronologique de l'activation des différents caractères

sexuels de *P. geometra* pendant l'été, mais il ne permet de rendre compte, ni de l'absence de corrélation entre l'activité ovarienne et celle des glandes clitelliennes pendant l'automne, ni des résultats expérimentaux.

Chez *P. geometra*, l'action du facteur inhibiteur cérébral semble s'exercer essentiellement sur les glandes clitelliennes. Nous nous trouvons donc chez cette espèce dans une situation très voisine de celle observée chez les Oligochètes. Chez les Lombriciens, AVEL (1929) a mis en évidence un facteur humoral de développement du clitellum. Ce facteur apparaît à la puberté et disparaît à chaque période de repos génital. Il est stimulateur contrairement à ce qui est observé chez *P. geometra*. La source de ce facteur clitellogène serait le cerveau (HERLANT-MEEWIS, 1958 - 1959 ; BERJON, 1965). Par contre ce dernier n'interviendrait pas directement sur la gamétogenèse chez *E. foetida* (CAZAUX, 1974). Pour cet auteur le cerveau, dont l'effet stimulateur sur la croissance a été mis en évidence (CAZAUX et ANDRE, 1972a et b), "intervient indirectement dans la spermatogenèse en portant l'activité métabolique à un niveau minimal en dessous duquel la différenciation de la lignée mâle ne peut se faire". CAZAUX est cependant en contradiction sur ce point avec les résultats obtenus par HERLANT-MEEWIS (1959, 1965 - 1966), RUDE et LINDER (1974) et SAUSSEY (1963) qui suggèrent un rôle gonadotrope du cerveau.

Chez les Annélides l'existence d'une hormone gonado-inhibitrice cérébrale a été démontrée pour la première fois par DURCHON (1952) chez les Polychètes, groupe où elle a été retrouvée chez de nombreuses espèces (voir article de synthèse de DURCHON, 1967, 1970). *P. geometra* représente le deuxième exemple après *E. octoculata* (VAN DAMME, 1976) de l'existence d'un tel facteur inhibiteur chez les Hirudinées. Dans ce groupe nous trouvons donc une régulation de l'activité reproductrice soit de type stimulateur (*T. rude*, *H. medicinalis* et *P. viridis*) comme chez les Polychètes Arénicoliens et Euniciens, soit de type inhibiteur (*E. octoculata* et *P. geometra*) comme chez les Polychètes Néréidiens, Syllidiens et peut-être Nephthydiens (DURCHON, 1967, 1970).

#### d - Conclusion

Chez *P. geometra* le cerveau exerce une influence inhibitrice sur l'évolution des glandes clitelliennes et probablement sur la longévité des ovocytes matures ainsi que sur leur passage du stade 3 au stade 4. Ce facteur inhibiteur est vraisemblablement de nature hormonale et sécrété par des cellules fuchsinophiles des ganglions cérébroïdes. Les premières étapes de l'ovogenèse, la spermatogenèse, l'atrium génital mâle, le tissu vecteur et l'aire copulatrice ne semblent pas sous sa dépendance.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

*P. geometra* est une sangsue généralement considérée comme sténotope de lacs. Elle a cependant une répartition beaucoup plus vaste dans le Nord de la France puisqu'on la rencontre dans des étangs ayant comme caractéristique commune d'être soumis à des réempoissonnements réguliers générateurs de la propagation de l'espèce. Des eaux de type eutrophe et bien oxygénées, un pH élevé, semblent être des facteurs favorables au maintien et à la prolifération de l'espèce.

Nos recherches nous ont conduit à aborder l'étude, chez *P. geometra*, de la croissance, de la maturation sexuelle et du cycle de l'activité reproductrice ainsi que des facteurs externes et internes susceptibles de le modifier.

### 1 - ETUDE DE LA CROISSANCE

L'examen des relevés effectués sur le terrain met en évidence une différence de taille importante entre les sangsues hivernantes et celles récoltées en été, comme l'avait déjà constaté TEREKHOV (1967). La croissance de la génération hivernante est modérée d'octobre à décembre, époque pendant laquelle elle se caractérise par un développement important des adipocytes, et s'accélère en janvier-février, moment où elle coïncide avec l'apparition de l'activité sécrétrice des glandes clitelliennes.

L'étude expérimentale montre qu'une élévation de température accélère la croissance, mais que la taille maximale atteinte à 25°C est plus faible qu'à 20, 15 et 10°C.

Un éclaircissement continu perturbe le rythme d'activité de *P. geometra* et par voie de conséquence la croissance.

La lumière, en intervenant sur l'activité reproductrice, modifie la croissance. Dans les mêmes conditions de température et de nutrition, les sangsues qui ne se reproduisent pas atteignent des tailles beaucoup plus importantes que celles qui déposent des cocons.

La croissance est également soumise à la fréquence de l'alimentation dont l'effet se fait sentir sur la taille maximale des piscicoles.

Une grande taille est atteinte par la génération hivernante

par suite de l'absence d'activité reproductrice et malgré un ralentissement de la croissance à basse température. Cette grande taille pourrait assurer à ces sangsues une plus grande fécondité.

Les générations d'été sont plus petites sous l'effet conjugué des températures élevées et d'une intense activité reproductrice. Une faible taille a comme conséquence une plus grande surface corporelle qui pourrait être favorable à la survie de cette espèce très exigeante en oxygène.

L'analyse mathématique des courbes de croissance montre que l'équation de Von Bertalanffy en donne une expression très satisfaisante.

## 2 - ETUDE HISTOLOGIQUE DE LA MATURATION SEXUELLE

### a - L'ovogenèse

Du cordon germinatif de l'ovaire se détachent des follicules formés de 5 à 10 cellules. Les plus externes donnent naissance aux cellules folliculaires. La multiplication des internes, asynchrone, est à l'origine d'un groupe formé de 50 à 60 cellules nourricières et d'un seul ovocyte qui se différencie rapidement des précédentes par l'apparition de villosités sur sa surface. L'ensemble, cellules nourricières et ovocyte, est attaché à une masse cytoplasmique centrale anucléée : le cytophore. L'ovocyte à maturité est pratiquement alécithe. Son accroissement a deux origines, d'une part ses propres synthèses, d'autre part les productions des cellules nourricières, ARN et mitochondries, qui sont déversées dans le cytoplasme ovocyttaire par l'intermédiaire du cytophore.

Parmi les 2 à 5 cellules folliculaires, c'est à la plus interne que semble dévolu le rôle le plus important : ses prolongements s'insinuent entre les cellules nourricières et son noyau présente un développement considérable. Leur rôle est vraisemblablement de pourvoir l'ovocyte et les cellules nourricières en éléments nécessaires à leur croissance qu'elles puisent dans le milieu environnant.

### b - La fécondation

Elle a lieu au sein de l'ovaire et présente deux étapes classiques :

- formation d'une membrane vitelline à partir des villosités de l'ovocyte soudées entre elles,
- apparition d'un espace périvitellin dans lequel sont déversés les granules corticaux.

Cependant chez *P. geometra* l'évolution de l'ovocyte reste bloquée en métaphase de première division de maturation jusqu'à la ponte. La réactivation de la méiose a lieu à l'intérieur du cocon.

Un début de développement parthénogénétique s'observe régulièrement en janvier-février dans la nature : des ovocytes sont en métaphase de première division de maturation en l'absence d'insémination et donc de fécondation.

c - Les glandes clitelliennes

Cinq types de glandes débouchent dans la région clitellienne : types 1, 2a, 2b, 3 et 4.

Les sécrétions des glandes de type 1, riches en mucopolysaccharides acides, sont les premières à intervenir dans la formation du cocon. Elles produisent un manchon qui assure un triple rôle :

- permettre l'adhérence du cocon au support,
- éloigner du clitellum toutes les souillures qui le recouvrent,
- réaliser un sac extensible dans lequel sont déversées les sécrétions des autres glandes.

Les fibrilles tubulaires contenues dans les granules des cellules de type 2a se déploient et se réorganisent pour participer à la formation de la paroi du cocon conjointement aux sécrétions de type 3 qu'elles enrobent.

L'existence au niveau du clitellum d'une bande ventrale dépourvue de pores excréteurs de glandes explique les rotations qu'effectue la sangsue au cours de sa ponte. Elles ont pour but de déposer ventralement les sécrétions qui sont nécessaires pour compléter la paroi du cocon.

Les sécrétions des glandes de type 4 sont formées de 2 à 3 vésicules golgiennes enroulées les unes autour des autres. Elles réagissent rapidement au PATAg (1 h) et constituent les réserves nutritives du cocon.

Les observations cytologiques et cinématographiques ont permis de donner une interprétation du mécanisme de la ponte (Figs 101 à 107) et d'expliquer par un processus purement mécanique, conforme à l'hypothèse émise par BRUMPT (1900b), l'asepsie du contenu du cocon.

Les cellules de type 5 dont les conduits débouchent dans la zone préclitellienne, ont un cycle identique à celui des glandes clitelliennes. Elles n'interviennent pas dans la formation du cocon mais pourraient sécréter une phéromone jouant un rôle dans l'attraction sexuelle.

d - L'aire copulatrice

Son étude nous a conduit à aborder celle de l'épiderme banal. Nous avons étudié les cellules épidermiques reliées les unes aux autres par un complexe jonctionnel comportant une *zonula adhaerens* apicale et

une jonction septée bien mise en évidence après marquage par le lanthane, les cellules glandulaires piriformes et les organes sensoriels ciliés.

La différenciation des cellules épidermiques de l'aire copulatrice se traduit essentiellement par le fait qu'elles constituent une assise très épaisse, aux cellules très hautes et étroites dont le pôle apical contient une sécrétion abondante. L'hypothèse d'un rôle adhésif de ces sécrétions est en accord avec la morphologie et la fixation, exceptionnellement forte, du spermatophore.

#### e - Le tissu vecteur

Il est formé de deux types cellulaires :

- les grandes cellules d'un diamètre de 20  $\mu$  qui ont les caractéristiques morphologiques des fibroblastes et produiraient du collagène,
- les petites cellules (8 à 10  $\mu$  x 4 à 5  $\mu$ ) qui sont des phagocytes. C'est entre elles que circulent les spermatozoïdes allant du spermatophore aux ovaires. Leur rôle est de phagocyter ceux qui ne les atteignent pas et de participer à la cicatrisation de la plaie issue de l'insémination.

Ces deux types cellulaires se retrouvent partout dans le corps de *P. geometra*, mais leur concentration est telle entre l'aire copulatrice et l'ovaire, qu'elles y constituent un tissu aux caractéristiques histologiques et fonctionnelles bien définies.

#### f - Les testicules et la spermatogénèse

La paroi testiculaire comporte une trame de 4 à 5  $\mu$  de collagène bordée sur ses deux faces de cellules conjonctives. Les cellules germinales ne semblent pas issues d'une différenciation de l'endothélium mais de la multiplication des spermatogonies souches présentes dans le testicule à la naissance.

La spermatogénèse a été suivie à la fois chez *P. geometra* et *B. torpedinis*.

Les spermatogonies ont les mêmes caractéristiques que celles décrites dans d'autres groupes zoologiques. Au stade spermatocyte I, l'importance des échanges nucléo-cytoplasmiques se traduit par l'existence de profondes invaginations de l'enveloppe nucléaire qui amènent le cytoplasme au sein même du noyau, au contact des nucléoles. Chez *B. torpedinis*, quatre ébauches flagellaires sont visibles, par cellule, dès ce stade.

La spermiogénèse aboutit à la formation de spermatozoïdes très complexes, caractérisés par la présence de structures hélicoïdales au niveau de l'acrosome et du noyau.

La comparaison des spermatozoïdes des *Piscicolidae* à ceux des autres ordres et familles de la faune française (9 espèces étudiées) montre que dans tous les cas, il s'agit de gamètes très longs et très fins de type évolué. Ils sont composés de l'avant vers l'arrière de quatre parties :

- L'acrosome : il comprend :

- une gaine cylindrique dont la paroi est formée de fibrilles à trajet hélicoïdal. Elle émet à sa surface externe un bourrelet dont la course est identique à celle des fibrilles. A l'intérieur de la gaine se trouve un contenu opaque aux électrons : la substance acrosomique, à la base de laquelle s'observe une baguette plus ou moins développée.
- un apex dépourvu de substance acrosomique et dont la paroi n'a pas subi la même différenciation que celle de la gaine.

- Le noyau : il est toujours de forme hélicoïdale. En coloration négative celui des *Glossiphoniidae* apparaît formé d'une seule fibre, celui des *Hirudidae* et des *Erpobdellidae* de deux, et celui des *Piscicolidae* de trois. En fait, ces fibres ne sont pas indépendantes et les images observées correspondent à l'enroulement :

- d'une lame de chromatine d'épaisseur uniforme dans le premier cas,
- d'une lame aux bords épaissis dans le second,
- d'un axe portant trois replis longitudinaux disposés à 120° les uns des autres dans le troisième.

- La mitochondrie : elle est unique et rectiligne, sauf dans le groupe des *Glossiphoniidae* où, à l'exception de *T. tessulatum*, elle est hélicoïdale.

- Le flagelle : il est souvent très long et toujours muni d'une pièce terminale atubulaire. Cette dernière est courte chez les *Hirudidae* et les *Piscicolidae*, longue chez les *Erpobdellidae* et *Glossiphoniidae*.

L'hypothèse que nous avons émise (WISSOCQ et MALECHA, 1975) d'un renforcement de la résistance mécanique de ces gamètes très fins grâce aux structures hélicoïdales trouve une confirmation dans le fait que la seule *Glossiphoniidae* à ne pas avoir de mitochondrie torsadée est *T. tessulatum*, unique espèce de la famille à copulation directe.

Les morphologies différentes de ces spermatozoïdes sont discutées en fonction de la phylogénie du groupe.

Les transformations que subissent les spermatides pour donner naissance à ces spermatozoïdes sont très complexes. La morphogénèse

du noyau est probablement en relation avec l'existence d'une manchette de microtubules s'étendant du centriole à l'acrosome. La chromatine se condense à l'intérieur de l'enveloppe nucléaire vis-à-vis de deux bandes de microtubules à trajet hélicoïdal qui s'enroulent dans le même sens au fur et à mesure que le noyau s'allonge. Cette observation infirme l'hypothèse émise par LORA LAMIA DONIN *et al.* (1974) de l'existence d'un champ morphogénétique agissant d'abord sur l'acrosome puis sur le noyau. Tous les noyaux des spermatozoïdes d'Hirudinées pourraient dériver d'un même type d'ébauche nucléaire formée d'une lame de chromatine condensée entre deux bandes diamétralement opposées de l'enveloppe nucléaire. De simples différences de torsion donneraient naissance aux divers types de noyaux observés.

L'ébauche acrosomique apparaît près du centriole et migre ensuite à l'apex du noyau ; elle comporte du matériel opaque partiellement entouré par un saccule golgien en forme de cloche. De ce matériel émerge un tube qui au cours de sa croissance se différencie pour donner naissance à la gaine acrosomique. La migration de la substance acrosomique à l'intérieur de cette gaine est précédée par la formation de l'extrémité acrosomique et de la baguette axiale. Un effet inducteur des microtubules sur la structure de la gaine acrosomique dont la disposition est ainsi contrôlée par le noyau est probable. Nous ne partageons pas l'opinion émise par GARAVAGLIA *et al.* (1974) d'un passage de la vésicule acrosomique à l'intérieur de la gaine. La surface externe de la masse de substance acrosomique pourrait se différencier pour donner naissance à son enveloppe. Nous n'avons pas pu établir l'origine centriolaire de l'acrosome. Cependant si une telle filiation est démontrée, elle ne s'appliquera qu'à la gaine et c'est à elle seule que devra être réservé le terme de stéréocil.

L'hypothèse émise par LORA LAMIA DONIN *et al.* (1974) d'un effet inducteur différent des microtubules sur la mitochondrie est infirmée par nos observations chez les *Glossiphoniidae* où la pièce intermédiaire peut être aussi hélicoïdale.

L'évolution du cytophore a été suivie au cours de la spermatogenèse de *P. geometra*. Il n'est jamais nucléé et la masse chromophile centrale, que l'on y observe parfois, est formée par un amas dense de réticulum endoplasmique lisse. Le rôle du cytophore semble identique à celui que lui attribuent MARTINUCCI *et al.* (1977) chez *E. foetida*.

### 3 - L'ACTIVITE REPRODUCTRICE ET SON CONTRÔLE

Les observations faites dans la nature, en élevage, et les études histologiques montrent que :

- la période de reproduction de *P. geometra* qui s'étend de fin février à septembre inclus, est la plus longue parmi celles des Hirudinées Européennes.
- Le cycle d'activité des glandes génitales est jusqu'à présent unique chez les sangsues. En effet la période de repos hivernal n'est pas due à un arrêt de la gamétogenèse puisque la spermiogenèse est active et que des ovocytes achèvent leur croissance (fin de stade 3). De septembre à janvier, les sangsues sont dans l'impossibilité de former des cocons puisque les glandes clitelliennes ne sécrètent pas. En janvier-février le blocage de l'activité reproductrice ne concerne plus que le comportement : les sangsues ne s'accouplent pas et ne pondent pas, bien que tous les caractères sexuels soient à maturité.
- Au cours de la croissance de *P. geometra*, on peut distinguer comme chez les Lombriciens (AVEL, 1929) :
  - . une période infantile pendant laquelle commence le développement des caractères sexuels présents à la naissance,
  - . une période de puberté qui commence avec la méiose mâle et se poursuit avec l'évolution rapide du contenu testiculaire jusqu'au stade 4 et le développement complet de l'atrium mâle, de l'aire copulatrice et du tissu vecteur.
  - . une période d'activité génitale caractérisée par la présence de sécrétions dans les glandes clitelliennes et de nombreux ovocytes en métaphase de 1ère division de maturation dans les ovaires. Elle s'achève avec la mort de la sangsue.
- La durée du développement embryonnaire est de 14 jours à 25°C et de 24 jours à 15°C.
- La longévité des animaux dans de bonnes conditions de nutrition n'excède pas 9 mois. Elle est d'autant plus courte que la température d'élevage est élevée.

L'ensemble de ces données nous a permis de proposer un cycle biologique annuel pour *P. geometra* (Figs 5a et 5b), caractérisé par un nombre élevé de générations d'été par rapport aux autres Hirudinées. Ce cycle est sous le contrôle des facteurs externes : lumière, température et nutrition.

L'influence de la lumière est du type "jours longs et jours courts efficaces" pour provoquer la ponte (type III de BECK (1968) chez les Insectes). Cette dernière est inhibée à 15°C pour une photopériode voisine de 12h/24. C'est le premier exemple chez les Hirudinées d'une influence de la lumière sur l'activité reproductrice. C'est elle qui est responsable de

l'absence d'activité reproductrice en hiver et de sa reprise au printemps.

La lumière est cependant incapable d'inhiber la ponte lorsque la température devient supérieure à un seuil situé entre 15 et 17,5°C.

La température agit :

- d'une part sur la fréquence des pontes. Elles sont d'autant plus abondantes que la température est élevée. Au printemps, il existe vraisemblablement une température critique au-dessus de laquelle les pontes deviennent très abondantes ce qui explique l'éclosion massive des jeunes piscicoles constatée début mai alors que l'activité reproductrice des sangsues est possible depuis fin février.
- d'autre part, sur la maturation sexuelle : des températures élevées l'accélèrent, des températures basses la retardent.

L'activité reproductrice est sous la dépendance directe de la nutrition. Le jeûne provoque un arrêt de la ponte, une régression rapide du contenu testiculaire puis des glandes clitelliennes. S'il est prolongé la croissance ovocytaire est arrêtée. Par contre, les spermatozoïdes des vésicules séminales ne sont pas phagocytés. Le tissu vecteur et l'aire copulatrice ne sont pas affectés.

Les stimuli externes (lumière, température) agissent par leur effet sur le système nerveux qui tient en dernier ressort l'évolution des caractères sexuels sous sa dépendance. Cependant, avant d'aborder l'étude de son rôle dans la maturation génitale, nous avons vérifié l'indépendance de l'évolution des différents caractères sexuels. Les résultats sont conformes à ceux obtenus par AVEL (1929) chez les Lombriciens. L'évolution des glandes clitelliennes, du tissu vecteur, de l'aire copulatrice, est indépendante de celle des ovaires. Les caractères sexuels et le comportement (accouplement, ponte) ne sont pas affectés par l'ablation de l'atrium génital mâle.

Chez *P. geometra*, le cerveau exerce une influence inhibitrice, probablement de nature hormonale, sur la phase finale de la maturation génitale. L'absence de ce facteur inhibiteur entraîne une hypersécrétion des glandes clitelliennes chez les sangsues matures ou accélère l'apparition de la maturité sexuelle chez les immatures. Dans ce dernier cas l'activité sécrétrice des glandes clitelliennes apparaît précocement, le passage des ovocytes du stade 3 au stade 4 est accéléré et la survie de ces derniers est prolongée notamment en l'absence d'insémination. Les premières étapes de l'ovogénèse, le tissu vecteur, l'aire copulatrice, les testicules et l'atrium génital mâle ne sont pas sous la dépendance de ce facteur inhibiteur cérébral. L'ablation élective de quatre paires de cellules fuchsinophiles des ganglions cérébroïdes apporte de fortes présomptions pour qu'elles soient à l'origine de la sécrétion de ce facteur inhibiteur.

Ce contrôle humoral de la phase finale de la maturation génitale explique le cycle biologique particulier de cette sangsue chez laquelle l'absence d'activité reproductrice hivernale est simplement due à un blocage au niveau de la dernière étape de l'évolution des glandes clitelliennes et des ovaires d'une part, du comportement reproducteur d'autre part.

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

---

- AFZELIUS, B.A. (1971) - Sperm morphology and fertilization biology. Proc. Int. Symp. Genetic of the Spermatozoon, 131-143;
- AFZELIUS, B.A., et FRANZEN, Å. (1971) - The spermatozoon of the jelly fish *Nausithoë*. J. Ultrastruct. Res., 37, 186-199.
- ANDERSON, W.A., WEISSMAN, A., et ELLIS, R.A. (1967) - Cytodifferentiation during spermiogenesis in *Lumbricus terrestris*. J. Cell Biol., 32, 11-26.
- ANDERSON, W.A., et ELLIS, R.A. (1968) - Acrosome morphogenesis in *Lumbricus terrestris*. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 85, 398-407.
- ANDERSON, W.A., et PERSONNE, P. (1970) - The localization of glycogen in the spermatozoa of various invertebrate and vertebrate species. J. Cell Biol., 44, 29-51.
- ANDRE, J. (1962) - Contribution à la connaissance du chondriome : étude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogénèse. J. Ultrastruct. Res. Suppl. 3, 1-185.
- ANDRE, J. (1970) - Discussion p. 272 in PHILLIPS, D.M. (1970) - Insect flagellar tubule patterns theme and variations. In BACCETTI Comparative Spermatology, 263-274. (Academic Press, New-York).
- ANGELI, N. (1973) - Etude du zooplancton dans le modèle réduit de lagune de Wavrin. Rapport du Laboratoire de Protistologie, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- ANGELI, N. (1977) - Bassin pilote d'autoépuration des prés Duhem. Rapport final du Laboratoire de Biologie Animale sur le suivi biologique effectué de mars 1976 à février 1977.
- AVEL, M. (1929) - Recherches expérimentales sur les caractères sexuels somatiques des Lombriciens. Bull. Biol. France et Belgique, 63, 149-318.
- AVEL, M. (1959) - Classe des Annélides Oligochètes. In GRASSE P.-P. "Traité de Zoologie". Masson et Cie Ed., Paris, 5 (1), 224-470.
- BACCETTI, B., et AFZELIUS, B.A. (1976) - The biology of the sperm cell. Monographs in Developmental Biology Vol. 10. Ed A. Wolosky, New York, 254 p.

- BARADANY, N. (1961) - Organisation ultramicroscopique de la membrane nucléaire de la spermatide de la sangsue (*Hirudo medicinalis*). C. R. Acad. Sc. Paris, 253, 1127-1129.
- BARDELE, C.F. (1973) - Struktur, Biochemie und Funktion der Microtubuli. Cytobiologie, 7, 442-488.
- BASKIN, D.G. (1976) - The fine structure of Polychaete septate junctions. Cell Tiss. Res., 174, 55-67.
- BECK, S.D. (1968) - Insect photoperiodism. Academic Press New York and London, 288 p.
- BECKER, C.D., et KATZ, M. (1965) - Distribution, ecology and biology of the salmonid leech *Piscicola salmositica* (Rhynchobdellae : Piscicolidae). J. Fish. Res. Bd. Canada, 22, 1175-1195.
- BENNIKE, S.A.B. (1943) - Contributions to the ecology and biology of the danish freshwater leeches (Hirudinea). Fol. Limmol. Scand., 2, 1-109.
- BERJON, J.J. (1965) - Application de la culture organotypique sur milieux artificiels à la discrimination des fonctions endocrines des ganglions cérébroïdes du Lombricien *Eisenia foetida* (Sav.). C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, 260, 6212-6214.
- BERN, H.A., et HAGADORN, I.R. (1965) - Neurosecretion. In : Structure and function in the nervous system of invertebrates. T.H. Bullock, and G.A. Horridge, I, 353-429. San Francisco : Freeman and Company.
- BERN, H.A., NISHIOKA, R.S., et HAGADORN, I.R. (1960) - Association of elementary neurosecretory granules with the Golgi complex. J. Ultrastruct. Res., 5, 311-320.
- BERTOUT, M. (1972) - Développement d'une vacuole nucléolaire dans l'ovocyte de *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète) après suppression de l'action endocrine du cerveau. C. R. Acad. Sci. (Paris), 275, 2683-2686.
- BERTOUT, M. (1973) - Relations entre l'évolution du nucléole et l'activité endocrine cérébrale au cours de l'ovogenèse de *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide, polychète), dans les conditions naturelles et expérimentales. Wilhelm Roux'Archiv, 173, 183-207.
- BIANCHI, S. (1964a) - Neurosecrezione e sostanze fenoliche nei gangli degli Annelidi. I. Ricerche sugli Irudinei (*Hirudo medicinalis*). Atti. Soc. Pelorit. Sci. fis. mat. nat., 10, 287-300.
- BIANCHI, S. (1964b) - Istochimica del neurosecreto delle cellule nervose di *Hirudo medicinalis*. Atti. Soc. Pelorit. Sci. fis. mat. nat., 10, 319-325.

- BIANCHI, S. (1967a) - On the different types of fluorescent neurons in the leech (*Hirudo medicinalis*). Atti. Soc. Pelorit. Sci. fis. mat. nat., 13, 39-47.
- BIANCHI, S. (1967b) - Sulla secrezione monoaminica dei gangli nervosi di *Hirudo medicinalis*. Boll. Soc. ital. Biol. sper., 43, 1-2.
- BIANCHI, S. (1969) - Sur la signification des neurones fluorescents chez la sangsue *Hirudo medicinalis*. Ann. Endoc., 30, 545-548.
- BOILLY-MARER, Y. (1971) - Contribution à l'étude de la signification des caractères sexuels somatiques et de leur déterminisme chez les *Nereidae* (Annélides Polychètes). Thèse Doctorat Sci. Nat., Lille.
- BONDI, C., et FARNESI, R.M. (1976) - Electron microscope studies of spermatogenesis in *Branchiobdella pentodonta* Whitman (Annelida, Oligochaeta). J. Morph., 148, 65-88.
- BRADKE, D.L. (1963) - Special features of spermatogenesis in *Lumbricus terrestris*. Anat. Rec., 145, 360.
- BRAKE, Z. (1958) - *Hirudo medicinalis* spermatogeneze. Latv. P.S.R. Zinat. Akad. Vestis, 3, 99-106.
- BRUMPT, E. (1900a) - Reproduction des Hirudinées. Formation du cocon chez *Piscicola* et *Herpobdella*. Bull. Soc. Zool. France, 25, 47-51.
- BRUMPT, E. (1900b) - Reproduction des Hirudinées. Mem. Soc. Zool. France, 13, 286-430.
- BRUSLE, J. (1971) - Les infrastructures germinales mâles précoces (gonocytes, spermatogonies et spermatocytes I). Ann. Biol., 10, 353-402.
- CAMERON, M.L., et FOGEL, W.H. (1963) - The development and structure of the acrosome in the sperm of *Lumbricus terrestris*. Canad. J. Zool., 41, 753-761.
- CARLEY, W.W. (1978) - Neurosecretory control of integumental water exchange in the earthworm *Lumbricus terrestris* L. Gen. Comp. Endocrinol., 35, 46-51.
- CAZAUX, M. (1974) - Rôle des ganglions cérébroïdes dans le développement des phénomènes sexuels chez *Eisenia foetida* Sav. (Oligochète, Lombricien). C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, 279, 89-91.
- CAZAUX, M., et ANDRE, F. (1972a) - Rôle des ganglions cérébroïdes dans la croissance pondérale du Lombricien *Eisenia foetida* Sav. C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, 274, 1550-1553.

- CAZAUX, M., et ANDRE, F. (1972b) - Rôle accélérateur et rôle inhibiteur des ganglions cérébroïdes, sur la croissance du Lombricien *Eisenia foetida* Sav., dans les conditions expérimentales. C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, 274, 2905-2908.
- CHAPRON, C., et RELEXANS, J.-C. (1971) - Connexions intercellulaires et évolution nucléaire au cours de la préméiose ovocytaire. Etude ultrastructurale chez le Lombricien *Eisenia foetida*. C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, 272, 3307-3310.
- CLARK, A.W. (1965) - Microtubules in some unicellular glands of two leeches. Z. Zellforsch., 68, 568-588.
- CLARK, A.W. (1967) - Some aspects of spermiogenesis in a lizard. Am. J. Anat., 121, 369-400.
- CLARK, R.B. (1955) - The posterior lobes of the brain in *Nephtys* and the mucous gland of the prostomium. Quart. J. Micr. Sci., 96, 545-565.
- CORNEC, J.P. (1971) - Sur le comportement des tissus après amputation chez l'Hirudinée Pharyngobdelle *Erpobdella octoculata*. Ann. Embr. Morph., 4, 269-279.
- CRISTEA, V. (1970) - Unele aspecte ale biologiei reproducerii si dezvoltarii la *Erpobdella testacea* Sav. (Hirudinea - Pharyngobdellae). St. Si cerc. Biol. Seria zoologie, 22, 447-453.
- CRISTEA, V., et MANOLELI, D. (1977) - Conspectus des sangsues (*Hirudinea*) de Roumanie avec une clef de détermination. Trav. Mus. Hist. nat. "Gr. Antipa", 18, 23-56.
- CZECHOWICZ, K. (1961) - Studies on the distribution of nucleic acid in the neurosecretory cells of the central nervous system in some leeches. Zool. Polon., 2, 91-100.
- CZECHOWICZ, K. (1963) - Neurosecretion in leeches and the annual cycle of its changes. Zool. Polon., 13, 163-184.
- CZECHOWICZ, K. (1968) - Studies on the participation of the neurosecretory system in the leech in the regulation of water balance. Zool. Polon., 18, 81-95.
- CZECHOWICZ, K. et ZARZYCKI, J. (1970) - Studies on the ultrastructure of the nervous system in leeches. Folio Morphologica, 29, 45-50.
- DALES, R.P. (1963) - Annelids. Hutchinson University Library London, 200 p.
- DAMAS, D. (1964a) - Succinodeshydrogénases ovariennes de *Glossiphonia complanata* (L.) (Hirudinée Rhynchobdelle) en rapport avec la phase d'accroissement des oeufs. C. R. Acad. Sci., 258, 1895-1896.

- DAMAS, D. (1964b) - Structure et rôle du rachis ovarien chez *Glossiphonia complanata* (L.) (Hirudinée, Rhynchobdelle). Bull. Soc. Zool. Fr., 89, 147-155.
- DAMAS, D. (1964c) - Elaboration de l'acrosome au cours de la spermiogenèse de *Glossiphonia complanata* (L.) (Hirudinée Rhynchobdelle). Bull. Soc. Zool. Fr., 89, 669-673.
- DAMAS, D. (1965a) - Mode de nutrition des cellules mâles et femelles de *Glossiphonia complanata* (Hirudinée) durant la spermatogenèse et l'ovogenèse. Bull. Soc. Zool. Fr., 90, 337-338.
- DAMAS, D. (1965b) - Répartition des orthophosphatases alcalines chez une Hirudinée : *Glossiphonia complanata* (L.). Bull. Soc. Zool. Fr., 90, 385-391.
- DAMAS, D. (1965c) - Présence d'un mucopolysaccharide neutre dans l'acrosome du spermatozoïde de *Glossiphonia complanata* (L.) (Hirudinée Rhynchobdelle). Annales Histochem., 10, 11-16.
- DAMAS, D. (1966) - Phénomène neurosécrétoire en rapport avec la reproduction de *Glossiphonia complanata* (L.) (Hirudinée, Rhynchobdelle). Bull. Soc. Zool. Fr., 91, 613-621.
- DAMAS, D. (1968a) - Histochimie des canaux éjaculateurs de *Glossiphonia complanata* L. (Hirudinée Rhynchobdelle). Ann. Histochem., 13, 111-122.
- DAMAS, D. (1968b) - Origine et structure du spermatophore de *Glossiphonia complanata* L. (Hirudinée Rhynchobdelle). Arch. Zool. exp. gén., 109, 79-86.
- DAMAS, D. (1968c) - Les cellules germinales mâles de *Glossiphonia complanata* (L.) (Hirudinée Rhynchobdelle). Origine, évolution et structure. Bull. Soc. Zool. Fr., 93, 375-385.
- DAMAS, D. (1969a) - Données histochimiques sur la cuticule de *Glossiphonia complanata* (L.), (Hirudinée, Rhynchobdelle). Arch. Zool. exp. gén., 110, 417-433.
- DAMAS, D. (1969b) - Appareil génital et fécondation par voie hypodermique chez *Glossiphonia complanata* (L.) (Hirudinée, Rhynchobdelle). Etude histophysiological. Thèse Fac. Sci. Univ. Paris, CNRS n° AO 3587.
- DAMAS, D. (1972) - Durcissement de la cuticule des mâchoires chez *Hirudo medicinalis* (Annélide, Hirudinée), aboutissant aux structures dentaires : étude histochimique et ultrastructurale. Arch. Zool. exp. gén., 113, 401-421.

- DAMAS, D. (1973a) - Etude ultrastructurale des organes tégumentaires de Bayer (complexe épithélio-musculaire) chez l'Hirudinée *Glossiphonia complanata* L. C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, 276, 2545-2548.
- DAMAS, D. (1973b) - Ultrastructure de l'épithélium tégumentaire de *Glossiphonia complanata* (L.) (Hirudinée) : cellules épithéliales et organes sensoriels de Bayer. Z. Zellforsch., 143, 355-365.
- DAMAS, D. (1974) - Ultrastructure du spermatozoïde de *Glossiphonia complanata* L. (Hirudinée, Rhynchobdelle). C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, 279, 1353-1356.
- DAMAS, D. (1977) - Anatomie et évolution de l'appareil génital femelle de *Glossiphonia complanata* (L.) (Hirudinée, Rhynchobdelle), au cours du cycle annuel. Etude histologique et ultrastructurale. Arch. Zool. exp. gen. 118, 29-42.
- DAPPLES, C.C., et KING, R.C. (1970) - The development of the nucleolus of the ovarian nurse cell of *Drosophila melanogaster*. Z. Zellforsch., 103, 34-47.
- DAVIES, R.W., et REYNOLDS, T.B. (1975) - Life history of *Helobdella stagnalis* (L.) in Alberta. Verh. Internat. Verein. Limnol., 19, 2828-2839.
- DAVIS, C.C. (1968) - Mechanisms of hatching in aquatic invertebrate eggs. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., 6, 325-376.
- DEFRETIN, R., et WISSOCQ, J.-C. (1974) - Le spermatozoïde de *Nereis irrorata* Malmgren (Annélide Polychète). J. Ultrastruct. Res., 47, 196-213.
- DELAVAUULT, R., et BRUSLE, J. (1967) - Sur la présence de flagelles dans les diverses catégories cellulaires observées en microscopie électronique dans les gonades d'*Asterina gibbosa* (Echinoderme, Astéride). Bull. Soc. Zool. Fr., 92, 488.
- DELAVAUULT, R., et BRUSLE, J. (1968) - Recherches sur la cytodifférenciation des gamètes chez un hermaphrodite fonctionnel : *Asterina gibbosa*. Ultrastructure des cellules de la lignée spermatogénétique et comparaison spermatogonies-ovogonies. C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, 266, 710-712.
- DENIS, H. (1977) - Accumulation du RNA dans les oocytes des Vertébrés inférieurs. Biol. Cellulaire, 28, 87-92.
- DESCAMPS, M. (1972) - Etude ultrastructurale du spermatozoïde de *Lithobius forficatus* L. (Myriapoda, Chilopoda). Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 126, 193-205.

- DESSER, S.S., et WELLER, I. (1977) - Ultrastructural observations on the body wall of the leech, *Batracobdella picta*. Tissue and Cell, 9, 35-42.
- DHAINAUT, A. (1972) - Evolution nucléolaire au cours de l'ovogenèse de *N. pelagica* (Annélide Polychète). I. Etude morphologique. J. Microsc. 13, 67-84.
- DURCHON, M. (1952) - Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les Annélides Polychètes : l'épitoquie et la stolonisation. Ann. Sc. nat. zool. et Biol. Anim., 14, 119-206.
- DURCHON, M. (1967) - L'endocrinologie des Vers et des Mollusques. Ed. Masson et Cie, Paris, 237 p.
- DURCHON, M. (1970) - Déterminisme endocrine de la maturation sexuelle chez les Annélides Polychètes). Bull. Soc. zool. Fr., 95, 489-509.
- DURCHON, M., et PORCHET, M. (1970) - Dosage de l'activité endocrine cérébrale au cours du cycle génital femelle chez *Nereis diversicolor*. C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, 270, 1689-1691.
- DURCHON, M., et PORCHET, M. (1971) - Premières données quantitatives sur l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens au cours de leur cycle sexuel. Gen. comp. Endocrinol., 16, 555-565.
- DUSSART, B., (1966) - Limnologie. L'étude des eaux continentales. Ed. Gauthier-Villars Paris, 677 p.
- EISENSTADT, T.B. (1964) - Etude cytologique de l'ovogenèse. I. Morphologie de la gonade de *Glossiphonia complanata* L. d'après les données de la microscopie optique et électronique (En russe). Citologija, 6, 19-21.
- EISENSTADT, T.B. (1965) - Quelques particularités de l'ultrastructure des ovocytes en rapport avec la synthèse du vitellus. (En russe). Zh. Obsch. Biol., 26, 230-236.
- EISENSTADT, T.B. (1967) - Etude autoradiographique de la synthèse d'ARN et de protéines dans les gonades d'animaux avec différents types d'ovogenèse. (En russe). Citologija, 9, 397-406.
- FALLON, J.F., et AUSTIN, C.R. (1967) - Fine structure of gametes of *Nereis limbata* (Annelida) before and after interaction. J. Exp. Zool., 166, 225-242.
- FARNESI, R.M., et VAGNETTI, D. (1973) - Il clitello in *Branchiobdella pentodonta* With. : Indagini istochimiche ed ultrastrutturali. Riv. idrobiol., 12, 21-32.

- FAWCETT, D.W. (1970) - A comparative view of sperm ultrastructure. Biol. Reprod. (suppl.) 2, 90-127.
- FAWCETT, D.W., ANDERSON, W.A., et PHILIPS, D.M. (1971) - Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. Develop. Biol., 26, 220-251.
- FELLUGA, B., et MARTINUCCI, G.B. (1975) - Nuclear organization in male gonial cells of *Eisenia foetida* (Sav.). J. Submicr. Cytol., 7, 185-196.
- FERRAGUTI, M., et LANZAVECCHIA, C. (1971) - Morphogenetic effects of microtubules. J. Submicrosc. Cytol., 3, 121-137.
- FRANZEN, Å. (1955) - Comparative morphological investigations into the spermiogenesis among mollusca. Zool. Bidr. Upps., 30, 399-456.
- FRANZEN, Å. (1956) - On spermiogenesis, morphology of the spermatozoon, and biology of fertilization among invertebrates. Zool. Bidr. Upps., 31, 355-482.
- FRANZEN, Å. (1962) - Notes on the morphology and histology of *Xironogiton instabilia* (Moore 1893) (Fam. *Branchiobdellidae*) with special reference to the muscle cells. Zool. Bidr. Upps., 35, 369-384.
- FRANZEN, Å. (1967) - Spermiogenesis and spermatozoa of the cephalopoda. Ark. zool., 19, 323-334.
- GABE, M. (1968) - Techniques histologiques. Masson et Cie Ed., Paris.
- GARAVAGLIA, C., LORA LAMIA DONIN, C., et LANZAVECCHIA, G. (1974) - Ultrastructural morphology of spermatozoa of Hirudinea. J. Submicr. Cytol., 6, 229-244.
- GATENBY, J.B. (1959) - Notes on electron microscopy of the spermatogenesis of *Lumbricus herculeus*. Trans. roy. Soc. New-Zeal., 87, 55-66.
- GATENBY, J.B., et DALTON, A.J. (1959) - Spermiogenesis in *Lumbricus herculeus*. An electron microscope study. J. Biophys. Biochem. Cytol., 6, 45-52.
- GEORGES, D. (1969) - Spermatogenèse et spermiogenèse de *Ciona intestinalis* L., observées en microscopie électronique. J. Microsc., 8, 391-400.
- GINZBURG, G.I. (1966) - Incorporation of some aminoacids into the egg during oogenesis of *Glossiphonia complanata* L. (En russe). Zh. Obsch. Biol., 27, 575-582.
- GINZBURG, G.I. (1967) - Autoradiographic study of the nucleic acid biosynthesis during the oogenesis of *Glossiphonia complanata* L. (En russe). Zh. Obsch. Biol., 28, 322-334.

- GONDRAN, M. (1954) - Remarques sur les glandes tégumentaires de *Glossosiphonia complanata* L. (Hirudinée, Rhynchobdelle). Arch. Zool. exp. gén., 92, 93-115.
- GOODMAN, D., et PARRISH, W.B. (1971) - Ultrastructure of the epidermis in the ice worm, *Mesenchytraeus solifugus*. J. Morph., 135, 71-86.
- GREENE, K.L. (1974) - Experiments and observations on the feeding behaviour of the freshwater leech *Erpobdella octoculata* (L.) (Hirudinea : Erpobdellidae). Arch. Hydrobiol., 74, 87-99.
- GROVE, A.J. (1925) - On the reproduction processes of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Quart. J. Micr. Anat., 69, 245-290.
- GROVE, A.J., et COWLEY, L.F. (1927) - The relation of the glandular elements of the clitellum of the brandling worm (*Eisenia foetida* Sav.) to the secretion of the cocoon. Quart. J. Micr. Sci., 71, 31-46.
- GULLAND, J.A. (1969) - Manuel des méthodes d'évaluation des stocks d'animaux aquatiques. Première partie - Analyse des populations. Manuels FAO de science halieutique n°4, 160 p.
- HAGADORN, I.R. (1958) - Neurosecretion and the brain of the rhynchobdellid leech, *Theromyzon rude* (Baird). J. Morphol. U.S.A., 102, 55-90.
- HAGADORN, I.R. (1962) - Functional correlates of neurosecretion in the rhynchobdellid leech, *Theromyzon rude*. Gen. comp. Endocrinol. U.S.A., 2, 516-540.
- HAGADORN, I.R. (1966a) - The histochemistry of the neurosecretory system in *Hirudo medicinalis*. Gen. comp. Endocrinol. U.S.A., 6, 288-294.
- HAGADORN, I.R. (1966b) - Neurosecretion in the Hirudinea and its possible role in reproduction. Amer. Zoologist., 6, 251-261.
- HAGADORN, I.R. (1967) - Hormonal control of spermatogenesis in *Hirudo medicinalis*. IVE Symposium International sur la Neurosécrétion, Strasbourg, 219-228, Springer-Verlag, New-York.
- HAGADORN, I.R. (1969) - Hormonal control of spermatogenesis in *Hirudo medicinalis*. II. Testicular response to brain removal during the phase of testicular maturity. Gen. comp. Endocrinol. U.S.A., 12, 469-478.
- HAGADORN, I.R., BERN, H.A., et NISHIOKA, R.S. (1963) - The fine structure of the supraoesophageal ganglion of the rhynchobdellid leech, *Theromyzon rude*, with special reference to neurosecretion. Z. Zellforsch. mikr. Anat. Dtsch., 58, 714-758.
- HAGADORN, I.R., et NISHIOKA, R.S. (1961) - Neurosecretion and granules in neurones of the brain of the leech. Nature G.B., 191, 1013-1014.

- HALMI, N.S. (1952) - Differentiation of two types of basophils in the adeno-hypophysis of the rat and mouse. *Stain Technol.*, 27, 61-64.
- HALVORSEN, O. (1971) - Studies of the herminth fauna of Norway. XIX. The seasonal cycle and microhabitat preference of the leech *Cystobranchnus mammillatus* (Malm. 1863) parasitizing burbot *Lota lota* (L.). *Norwegian J. Zool.*, 19, 177-180.
- HARANT, H., et GRASSE, P.-P. (1959) - Classe des Annélides Achètes ou Hirudinées ou sangsues. *Traité de Zoologie de P.-P. Grassé*, V(1), 471-593, Masson et Cie, Ed., Paris.
- HAUENSCHILD, C. (1955) - Photoperiodizität als Ursache des von der Mondphase abhängigen Metamorphose-Rhythmus bei dem Polychaeten *Platynereis dumerilii*. *Z. Naturforsch.*, 10, 658-662.
- HAUENSCHILD, C. (1956) - Neue experimentelle Untersuchungen zum Problem der Lunarperiodizität. Photoperiodizität als Ursache des Lunaren Schwärmerhythmus bei dem Polychaeten *Platynereis dumerilii*. *Naturwiss.*, 16, 361-363.
- HAUENSCHILD, C. (1959) - Zyklische Veränderungen an den inkretorischen Drüsenzellen im Prostomium des Polychaeten *Platynereis dumerilii* als Grundlage der Schwärmerperiodizität. *Z. Naturforsch.*, 14, 81-87.
- HAUENSCHILD, C. (1960) - Lunar periodicity. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 25, 491-497.
- HEATH, H. (1925) - Egg formation in a leech. *J. Morphol.*, 41, 333-345.
- HERLANT-MEEWIS, H. (1958-1959) - Evolution des caractères sexuels au cours de la croissance et de la reproduction chez *Eisenia foetida*. *Ann. Soc. Roy. zool. Belg.*, 89, 281-336.
- HERLANT-MEEWIS, H. (1959) - Phénomènes neurc-sécrétoires et sexualité chez *Eisenia foetida*. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 255, 2187-2188.
- HERLANT-MEEWIS, H. (1962) - Endocrine relationships between nutrition and reproduction in the Oligochaete *Eisenia foetida*. *Gen. comp. Endocrinol.*, 2, 608.
- HERLANT-MEEWIS, H. (1965-1966) - Evolution de l'appareil génital d'*Eisenia foetida* au cours du jeûne, de la régénération postérieure et à la suite de l'ablation de ganglions nerveux. *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.*, 96, 189-240.
- HERRMANN, S.J. (1970) - Total residue tolerances of colorado Hirudinea. *Southwest Nat.*, 15, 261-273.

- HERTER, K. (1937) - Die Ökologie der Hirudineen. Bronns Klassen und Ordnungen des Tierreich. Bd 4, Abt. III, Buch 4, Teil 2, Lief. 3.
- HESS, R.T., et VENA, J.A. (1974) - Fine structure of the clitellum of the annelid *Enchytraeus fragmentosus*. Tissue and Cell, 6, 503-514.
- HIRAO, Y. (1965) - Cocoon formation in *Tubifex*, with its relation to the activity of the clitellar epithelium. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, zool., 15, 625-633.
- HOADGE, T.R., et KESSEL, R.G. (1968) - An electron microscope study of the process of differentiation during spermatogenesis in the drone honey bee (*Apis mellifera* L.) with special reference to centriole replication and elimination. J. Ultrastruct. Res., 24, 6-32.
- HOFFMANN, J. (1955) - Quelques caractères éthologiques de la Piscicolidée : *Cystobranchus respirans* Troschel. Arch. Inst. Grand-Ducal Luxemb. Sect. Sci. nat. phys. math., 22, 223-225.
- HOFFMANN, J. (1956) - Contributions à l'étude des specificités morphologiques et éthologiques de la Piscicolidée : *Cystobranchus respirans* Troschel, 1850. Arch. Inst. Grand-Ducal Luxemb. Sect. Sci. nat. phys. math., 23, 209-239.
- HORSTMANN, E. (1968) - Die Spermatozoen von *Geophilus linearis* Koch (*Chilopoda*). Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 89, 410-429.
- HOUDRY, J. (1974) - Mise en évidence d'une activité phosphatasique acide dans les cellules animales et problèmes posés par cette visualisation. J. Microscopie, 21, 245-252.
- HUEBNER, E., et ANDERSON, E. (1976) - Comparative spiralian oogenesis. Structural aspects : an overview. Amer. Zool., 16, 315-343.
- HUXLEY, H.E., et ZUBAY, G.J. (1960) - Electron microscope observations on the structure of microsomal particles from *Escherichia coli*. J. Molec. Biol., 2, 10-18.
- IONESCU VARO, M., et GRIGORIU, A. (1965) - La neurosécrétion chez *Trocheta bukowskii* Gedroye (Glossiphoniidae). Trav.Mus. Hist. Nat. "Grigore antipa", Rouman., 5, 99 - 105.
- JÄGERSTEN, G. (1939) - In AFZELIUS, B.A. (1971).
- JÖRGENSEN, M. (1908) - Untersuchungen über die Eibildung bei *Nepheleis vulgaris* M.T. (*Herpobdella atomaria* Carena). Arch. Zellforsch., 2, 279-347.
- JÖRGENSEN, M. (1913) - Zellenstudien. II. Die Ei- und Nährzellen von *Piscicola*. Arch. Zellforsch., 10; 127-160.

- JUNG, D. (1963) - Bau und Feinstruktur der Augen auf dem vorderen und hinteren Saugnapf des Fischegels *Piscicola geometra* L. Zool. Beitz., 9, 121-172.
- KESSEL, R.G. (1966) - The association between microtubules and nuclei during spermiogenesis in the dragonfly. J. Ultrastruct. Res., 16, 293-304.
- KESSEL, R.G. (1970) - Spermiogenesis in the dragonfly, with special reference to a consideration of the mechanism involved in the development of cellular asymmetry. In BACCETTI, Comparative Spermatology, 531-552 (Academic Press, New-York).
- KEYSSELITZ, G. (1906) - Generation und Wirtswechsel von *Trypanoplasma borreli* Laveran und Mesnil. Arch. Protistenk., 7, 1-74.
- KING, R.C., et BURNETT, R.G. (1959) - An autoradiographic study of uptake of triated glycine, thymidine and uridine by fruit fly ovaries. Science, 129, 1674-1675.
- KNAPP, M.F., et MILL, P.J. (1971) - The fine structure of ciliated sensory cells in the epidermis of the earthworm *Lumbricus terrestris*. Tissue and Cell, 3, 623-636.
- KNIGHT, D.P., et HUNT, S. (1974) - Molecular and ultrastructural characterization of the egg capsule of the leech *Eryobdella octoculata* L. Comp. Biochem. Physiol., 47 A, 871-880.
- KOEHLER, J.K. (1965) - An electron microscope study of the dimorphic spermatozoa of *Asplanchna (Rotifera)*. I. The adult testis. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 67, 57-76.
- KORSCHOLT, E. (1924) - In PAWLOWSKI, L.K. (1955).
- KRISHNAN, N., et RAJULU, G.S. (1969) - The integumentary mucous secretions of the earthworm *Megascolex mauritii*. Z. Naturforsch., 24b, 1620-1623.
- KÜHNELT, W. (1969) - Ecologie générale. Ed. Masson et Cie, Paris, 359 p.
- LANGERON, M. (1949) - Précis de microscopie. Ed. Masson et Cie, Paris.
- LANZA, B., et QUATTRINI, D. (1964) - Osservazioni sulla spermiogenesi e sugli spermii di *Vaginulus borellianus* (Colosi) (Gastropoda Soleolifera). Boll. Zool., 31, 1321-1334.
- LANZAVECCHIA, G., et LORA LAMIA DONIN, C. (1972) - Morphogenetic effects of microtubules. II. Spermiogenesis in *Lumbricus terrestris*. J. Submicr. Cytol., 4, 247-260.

- LECHENAULT, H., et PASTISSON, C. (1973) - Analyse cytochimique des protéines nucléaires du spermatozoïde d'*Hirudo medicinalis* L. Ann. Histochem., 18, 140-148.
- LEGENBRE, R. (1959) - Sur la présence de cellules neurosécrétrices dans les ganglions sous-oesophagiens de la sangsue médicinale (*Hirudo medicinalis* L.), suivie de quelques considérations sur la neurosécrétion. Bull. Biol. Fr. Belg., Fr., 93, 462-471.
- LEGORE, R.S., et SPARKS, A.K. (1971) - Repair of body wall incision in the rhynchobdellid leech *Piscicola salmositica*. J. Invert. Path., 18, 40-45.
- LENT, C.M. (1973) - Retzius cells : neuroeffectors controlling mucus release by the leech. Science, N.Y., 179, 693-696.
- LONGO, F.J., et ANDERSON, W.A. (1970) - Structural and cytochemical features of the sperm of cephalopod *Octopus bimaculatus*. J. Ultrastruct. Res., 32, 94-106.
- LORA LAMIA DONIN, C., et LANZAVECCHIA, G. (1974) - Morphogenetic effects of microtubules. III. Spermiogenesis in Annelida Hirudinea. J. Submicr. Cytol., 6, 245-259.
- LUKIN, E.I. (1962) - Fauna Ukraini. Pijavki. Inst. Zool. Akad. Nauk. Ukr. RSR, 30, 1-196.
- MALECHA, J. (1967) - Etude en culture organotypique de l'influence endocrine de la masse nerveuse péripharyngienne sur la maturation testiculaire chez *Hirudo medicinalis* L. C. R. Acad. Sc. Paris, 265, 1806-1808.
- MALECHA, J. (1968) - Contribution à l'étude de la gamétogenèse *in vivo* et *in vitro* chez *Hirudo medicinalis* L. (Hirudinée Gnathobdelliforme). Thèse Doctorat 3ème Cycle, Lille.
- MALECHA, J. (1970a) - Etude, en culture organotypique, du contrôle hormonal de la spermatogenèse chez *Hirudo medicinalis* (Hirudinée Gnathobdelliforme). Gen. comp. Endocrinol., 14, 313-320.
- MALECHA, J. (1970b) - Influence de la température sur la spermatogenèse et l'activité neurosécrétrice d'*Hirudo medicinalis* L. (Hirudinée Gnathobdelliforme). Gen. comp. Endocrinol., 14, 368-380.
- MALECHA, J. (1970c) - Etude expérimentale de la maturation sexuelle chez les Hirudinées. Bull. Soc. zool. Fr., 95, 517-528.
- MALECHA, J. (1975) - Etude ultrastructurale de la spermiogenèse de *Piscicola geometra* L. (Hirudinée Rhynchobdelle). J. Ultrastruct. Res., 51, 188-203.

- MALECHA, J. (1976) - Influence de la décérébration et de l'ovariectomie sur l'évolution des glandes clitelliennes de *Piscicola geometra* L. (Annélide Hirudinée Rhynchobdelle). C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, 283, 655-657.
- MALECHA, J. (1979) - Mise en évidence d'une action du système nerveux central sur les échanges d'eau chez l'Hirudinée Rhynchobdelle *Theromyzon tessulatum* (O.F.M.). C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, 288, 693-696.
- MALECHA, J., et PRENSIER, G. (1974) - Les glandes clitelliennes de *Piscicola geometra* L. Structure et cycle annuel. Bull. Soc. Zool. Fr., 99, 433-440.
- MANN, K.H. (1951) - On the bionomics and distribution of *Theromyzon tessulatum* (O.F. Müller) 1774 (= *Protocleipsis tesselata*). Ann. Mag. nat. Hist., 4, 956-961.
- MANN, K.H. (1953) - The life history of *Erpobdella octoculata* (Linnaeus, 1758). J. Anim. Ecol., 22, 199-207.
- MANN, K.H. (1954) - The anatomy of the horse leech, *Haemopis sanguisuga* L. with special reference to the excretory system. Proc. zool. Soc. London, 124, 69-88.
- MANN, K.H. (1955) - The ecology of the british freshwater leeches. J. anim. Ecol., 24, 98-119.
- MANN, K.H. (1956) - A study of the oxygen consumption of five species of leech. J. exp. Biol., 33, 615-626.
- MANN, K.H. (1957a) - A study of a population of the leech *Glossiphonia complanata* (L.). J. Anim. Ecol., 26, 99-111.
- MANN, K.H. (1957b) - The breeding, growth and age structure of a population of the leech *Helobdella stagnalis* (L.). J. Anim. Ecol., 26, 171-177.
- MANN, K.H. (1961) - The life history of the leech *Erpobdella testacea* Sav. and its adaptative significance. Oikos, 12, 164-169.
- MANN, K.H. (1962) - Leeches (Hirudinea). Their structure, physiology, ecology and embryology. International series of monographs on pure and applied biology. Pergamon Press, Oxford, London, New-York, Paris.
- MANTON, S.M. (1938) - In AFZELIUS, B.A. (1971).
- MARTINUCCI, G.B., et FELLUGA, B. (1975) - Early development of cytophorus in premeiotic male gonial cells of *Eisenia foetida* (Sav.). Boll. Zool., 42, 271-273.
- MARTINUCCI, G.B., FELLUGA, B., et CARLI, S. (1977) - Development and degeneration of cytophorus during spermiogenesis in *Eisenia foetida* (Sav.). Boll. Zool., 44, 383-398.

- McFARLANE, R.W. (1963) - The taxonomic significance of Avian sperm. Proc. 13e Intern. Ornithol. Congr., 91-102.
- McINTOSH, J.R., et PORTER, K.R. (1967) - Microtubules in the spermatids of domestic fowl. J. Cell Biol., 35, 153-173.
- MEYER, M.C. (1940) - A revision of the leeches living on freshwater fishes of North America. Trans. Amer. micr. Soc., 59, 354-376.
- MICHON, J. (1954) - Contribution expérimentale à l'étude de la biologie des *Lumbricidae*. Les variations pondérales au cours des différentes modalités du développement postembryonnaire. Thèse, Poitiers, 192 p.
- MILLER, F., et PALADE, G.E. (1964) - Lytic activities in renal protein absorption droplets. An electron microscopical cytochemical study. J. Cell Biol., 23, 519-552.
- MISHRA, N.K. (1967) - Neurosecretory cells in the ventral nerve cord of leech (*Hirudinaria granulosa*). Experientia, Suisse, 23, 1055-1059.
- MYERS, R.J. (1935) - Behavior and morphological changes in the leech *Placobdella parasitica* during hypodermic insemination. J. Morphol., 53, 617-653.
- NAGABHUSHANAM, R., KULKARNI, G.K., et HANUMANTE, M.M. (1976) - Hormonal control of spermatogenesis in the leech, *Poecilobdella viridis*. Nat. Sc. J., Marathwada University, Aurangabad, 15, 197-203.
- NAGAO, Z. (1957) - Observations on the breeding habits in a freshwater leech *Herpobdella lineata* O.F. Müller. J. Fac. Sci. Hokkaido (VI), 13, 192-196.
- NAGAO, Z. (1958) - Some observations on the breeding habits of a freshwater leech *Glossiphonia lata* Oka. Jap. J. Zool., 12, 219-228.
- NAMBUDIRI, P.N., et VIJAYAKRISNAM, K.P. (1958) - Neurosecretory cells of the brain of the leech *Hirudinaria granulosa* Sav., Curr. Sci., India, 27, 350-351.
- NEKHAEV, V.M. (1957) - Le problème de la spermatogénèse chez la sangsue officinale. Zh. Obshch. Biol., SSSR, 18, 208-216.
- NEKHAEV, V.M. (1959) - Cycle annuel du développement des testicules chez la sangsue officinale (*Hirudo officinalis*) et la sangsue *Haemopsis sanguisuga* (Berg.). Zool. Zh., SSSR, 38, 280-282.
- NICANDER, L. (1970) - Comparative studies on the fine structure of vertebrate spermatozoa. In BACCETTI Comparative spermatology, 47-55 (Academic Press, New-York).

- PARDUCZ, B. (1967) - Ciliary movements and coordination in ciliates. *Int. Rev. Cytol.*, 21, 91-128.
- PARENTY, M.-D. (1977) - Variations spatio-temporelles du plancton des bassins de lagunage alimentés par la station d'épuration d'Aniche-Auberchicourt, Nord. Mémoire pour l'obtention du D.E.A., Université des Sciences et Techniques de Lille.
- PASTEELS, J. (1966) - La réaction corticale de fécondation de l'oeuf de *Nereis diversicolor*, étudiée au microscope électronique. *Acta Embryol. Morph. Exp.*, 9, 155-173.
- PASTISSON, C. (1965) - Recherches préliminaires sur l'ultrastructure du spermatozoïde de la sangsue *Hirudo medicinalis* L. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 261, 2950-2953.
- PASTISSON, C. (1966) - Anatomie ultrastructurale du spermatozoïde de la sangsue *Hirudo medicinalis* L. *Ann. Univ. A.R.E.R.S., Reims*, 4, 67-75.
- PASTISSON, C. (1977) - L'ultrastructure des cellules séminales de la sangsue *Hirudo medicinalis* au cours de leur différenciation. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Animal.*, 19, 315-347.
- PAWLOWSKI, L.K. (1936) - Pijawki (Hirudinea). *Fauna slodkowodna Polski*, 26, 1-176.
- PAWLOWSKI, L.K. (1955) - Observations biologiques sur les sangsues. *Bull. Soc. Sci. Lettr. Łódź*, 6, 1-21.
- PEREZ, C. (1907) - Notes histologiques sur le Branchellion de la Torpille. II. Ovogenèse. *Trav. Soc. Sci. Sta. Zool. Arcachon*, 10, 307-328.
- PERRET, J.-L. (1952) - Les Hirudinées de la région neuchâteloise. *Bull. Soc. Neuchâteloise Sc. Nat.*, 75, 89-138.
- PHILLIPS, D.M. (1970) - Development of spermatozoa in the woolly opossum with special reference to the shaping of the sperm head. *J. Ultrastruct. Res.*, 33, 369-380.
- PHILLIPS, D.M. (1976) - Nuclear shaping during spermiogenesis in the whip scorpion. *J. Ultrastruct. Res.*, 54, 397-405.
- PORCHET, M. (1976) - Données actuelles sur le contrôle endocrine de la maturation génitale des Néréidiens (Annélides Polychètes). *Ann. Biol.*, 15, 329-377.
- POTSWALD, H.E. (1967) - An electron microscope study of spermiogenesis in *Spirorbis (Laeospira) mörchi* Levinsen (Polychaeta). *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 83, 231-248.
- POTSWALD, H.E. (1971) - A fine structural analysis of the epidermis and cuticle of the oligochaete *Aeolosoma bengalense* Stephenson. *J. Morph.*, 135, 185-212.

- PRENSIER, G., et MALECHA, J. (1974) - Particularités ultrastructurales de la méiose chez *Branchellion torpedinis* (Sav.) (Hirudinée, Rhynchobdelle). *J. Microscopie*, 20, 81a-82a.
- RATNER, S.C., et BOICE, R. (1971) - Behavioral characteristics and functions of pheromones of earthworms. *Psychol. Rec.*, 21, 363-371.
- REGER, J.F. (1967) - A study of the fine structure of developing spermatozoa from oligochaete *Enchytraeus albidus*. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 82, 257-269.
- REGER, J.F. (1970) - Some aspects of the fine structure of filiform spermatozoa (Ostracod, *Cypridopsis* sp.) lacking tubule sub-structure. In BACCETTI Comparative spermatology, 237-246. (Academic Press, New-York).
- RESSLER, R.H., CIALDINI, R.R., GHOCA, M.L., et KLEIST, S.M. (1968) - Alarm pheromone in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Science, N.Y.*, 161, 597-599.
- RETZIUS, G. (1904) - Zur Kenntnis der Spermien der Evertebraten. I. *Biol. Untersuch. N.F.*, 11, 1-32.
- RETZIUS, G. (1905) - Zur Kenntnis der Spermien der Evertebraten. II. *Biol. Untersuch. N.F.*, 12, 79.
- REVEL, J.P., et KARNOVSKY, M.J. (1967) - Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.*, 33, C, 7-12.
- REYNOLDS, E.S. (1963) - The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 208-212.
- RICHARD, A. (1971) - Contribution à l'étude expérimentale de la croissance et de la maturation sexuelle de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). Thèse Doctorat d'Etat, Université de Lille.
- RICHARDS, K.S. (1974) - The ultrastructure of the cuticle of some british lumbricids (Annelida). *J. Zool., Lond.*, 172, 303-316.
- RICHARDS, K.S. (1975) - The ultrastructure of the metachromatic mucous cells of some British lumbricids (Annelida). *J. Zool., Lond.*, 177, 233-246.
- RICHARDS, K.S. (1977a) - Structure and function in the Oligochaete epidermis (Annelida). *Symp. Zool. Soc. Lond.*, 39, 171-193.
- RICHARDS, K.S. (1977b) - The histochemistry and ultrastructure of the clitellum of the enchytraeid *Lumbricillus rivalis* (Oligochaeta : Annelida) *J. Zool., Lond.*, 183, 161-176.

- ROUSSEAU, E. (1912) - Les Hirudinées d'eau douce d'Europe. Ann. Biol. Lac., 5, 259-295.
- RUDE, S.S., et LINDER, H.J. (1964) - The effect of the brain on spermatogenesis in the Oligochaete, *Eisenia foetida*. Amer. Zoologist, 4, 327.
- RUTSCHKE, E. (1970) - Zur Substruktur der Cuticula der Egel (Hirudinea). Z. Morph. Tiere, 67, 97-105.
- SANDNER, H. (1951) - Badania nad fauną pijawek. Acta Zool. oecol. Univ. Lodziensis, 4, 1-50.
- SAPKAREV, J.A. (1967-1968) - The taxonomy and ecology of leeches (Hirudinea) of Lake Mendota, Wisconsin. Trans. Wisconsin Acad. Sci. Arts Letters, 56, 225-253.
- SAPKAREV, J.A. (1969) - Seasonal changes in a population of *Eryobdella octoculata* L. (Hirudinea) in the large lakes of Macedonia (DOJRAN, PRESPA and OHRID). Ann. Fac. Sc. Univ. Skopje, 22, 19-31.
- SAUSSEY, M. (1963) - Effets de la décérébration et de l'amputation caudale sur la spermatogenèse d'*Allobophora icterica* Savigny (Oligochète, Lumbricidae). C. R. Acad. Sc. Paris, 257, 511-513.
- SAWYER, R.T. (1970) - Observations on the natural history and behavior of *Eryobdella punctata* (Annelida : Hirudinea). American Midland Naturalist, 83, 65-80.
- SAWYER, R.T. (1971) - The phylogenetic development of brooding behaviour in the Hirudinea. Hydrobiologia, 37, 197-204.
- SAWYER, R.T. (1972) - North american freshwater leeches, exclusive of the Piscicolidae, with a key to all species. Illinois Biological Monographs, 46, 154 p.
- SCHALLER, F. (1965) - Action de la photopériode croissante sur les larves en diapause d'*Aeschna cyanea* Mull. maintenues à basse température. Compt. Rend. Soc. Biol., 159, 846-849.
- SCHARRER, B. (1937) - Über sekretorisch tätige Nervenzellen bei wirbellosen Tieren. Naturwissenschaften, 25, 131-138.
- SCRIBAN, I.A., et AUTRUM, H. (1934) - Ordnung der Clitellata Hirudinea = Egel. In "Handbuch der Zoologie", KUKENTHAL, W., et KRUMBACH, t. 2, 119-352. De Gruyter, Berlin et Leipzig.
- SCUDDER, G.G.E., et MANN; K.H. (1968) - The leeches of some lakes in the Southern Interior Plateau Region of British Columbia. Syesis, 11, 203-209.
- SELENSKY, W.D. (1907) - Studien über die Anatomie von *Piscicola* (En russe, résumé en allemand). Trav. Soc. Natural. St. Petersb., 36, 36-111.

- SHAY, J.W. (1972) - Ultrastructural observations on the acrosome of *Lumbricus terrestris*. J. Ultrastruct. Res., 41, 572-578.
- SHOUP, J.R. (1967) - Spermiogenesis with special reference to nuclear differentiation in wild type and in male sterility mutant of *Drosophila melanogaster*. J. Cell Biol., 32, 663-676.
- SILVEIRA, M., et PORTER, K.R. (1964) - The spermatozooids of flatworms and their microtubular systems. Protoplasma (Wien), 59, 240-265.
- SOÓS, Á. (1964) - A revision of the Hungarian fauna of Rhynchobdellid leeches (Hirudinea). Opusc. Zool. Budapest, V, 1, 107-112.
- SOÓS, Á. (1965) - Identification key to the leech (Hirudinoidea) genera of the world, with a catalogue of the species. I. Family : Piscicolidae. Acta Zool. Hung., 11, 417-463.
- SSYNEWA, M.W. (1940) - Quelques observations sur l'influence de la température sur la croissance et la reproduction de *Protolepsia maculosa*. (En russe). Revue de Zoologie (U.R.S.S.), 19, 422-427.
- STANLEY, H.P., BOWMAN, J.T., ROMRELL, L.J., REED, S.C., et WILCKINSON, R.F. (1972) - Fine structure of normal spermatid differentiation in *Drosophila melanogaster*. J. Ultrastruct. Res., 41, 433-466.
- STRANG-VOSS, C. (1970) - Zur Entstehung des Golgi-Apparates Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Spermatiden von *Eisenia foetida* (Annelidae). Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 109, 287-296.
- STRANG-VOSS, C. (1972) - Ultrastrukturen der zellulären Autophagie Elektronenmikroskopische Beobachtungen an Spermatiden von *Eisenia foetida* (Annelidae) während der cytoplasmatischen Reduktionsphase. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 127, 580-590.
- SUZUTANI, C. (1977) - Light and electron microscopical observations on the clitellar epithelium of *Tubifex*. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool., 21, 1-11.
- TANDLER, B., et MORIBER, L.G. (1966) - Microtubular structures associated with the acrosome during spermiogenesis in the water-strider *Gerris remigis* (Say). J. Ultrastruct. Res., 14, 391-404.
- TEREKHOV, P.A. (1966) - On the conditions and time of the sexual maturity onset in leeches *Piscicola geometra*. Zool. Zh. S.S.S.R., 45, 1721-1723.
- TEREKHOV, P.A. (1967) - On the duration of life cycle of the leech *Piscicola geometra*. Zool. Zh. S.S.S.R., 46, 846-849.

- THIERY, J.-P. (1967) - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie*, 6, 987-1018.
- TILLMAN, D.L., et BARNES, J.R. (1973) - The reproductive biology of the leech *Helobdella stagnalis* (L.) in Utah lake, Utah. *Freshwater Biol.*, 137-146.
- TOKUYASU, K.T. (1974) - Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. IV. Nuclear transformation. *J. Ultrastruct. Res.*, 48, 284-303.
- TUMPLING, W. (1965) - Untersuchungen über Neurosekretion bei Hirudineen. *Z. Wissensch. Zool. Dtsch*, 171, 1-43.
- TUZET, O. (1950) - Le spermatozoïde dans la série animale. *Rev. Suisse Zool.*, 57, 433-451.
- VAN DAMME, N. (1974) - Organogenèse de l'appareil génital chez la sangsue *Erpobdella octoculata* L. (Hirudinée - Pharyngobdelle). *Arch. Biol. (Bruxelles)*, 85, 373-397.
- VAN DAMME, N. (1976) - Maturation génitale précoce par destruction des ganglions buccaux chez la sangsue *Erpobdella octoculata* L. (Hirudinée - Pharyngobdelle). *C. R. Acad. Sc. Paris, Série D*, 283, 967-969.
- VAN DAMME, N. (1977) - Etude histologique et ultrastructurale des ganglions buccaux chez la sangsue *Erpobdella octoculata* L. (Hirudinée - Pharyngobdelle). *Arch. Biol. (Bruxelles)*, 88, 31-52.
- WEBSTER, P.M., et RICHARDS, K.S. (1977) - Spermiogenesis in the Enchytraeid *Lumbricillus rivalis* (Oligochaeta Annelida). *J. Ultrastruct. Res.*, 61, 62-77.
- WILKIALIS, J. (1970a) - Investigations on the biology of leeches of the Glossiphoniidae family. *Zool. Poloniae*, 20, 29-54.
- WILKIALIS, J. (1970b) - Some regularities in the occurrence of leeches (Hirudinea) in the waters of the Bialistok region. *Ekol. Pol.*, 18, 647-680.
- WILKINSON, R.F., STANLEY, H.P., et BOWMAN, J.T. (1974) - Genetic control of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster* : the effects of abnormal cytoplasmic microtubule population in mutant ms (3) 10 R and its colcemid-induced phenocopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 48, 242-258.
- WILKINSON, R.F., STANLEY, H.P., et BOWMAN, J.T. (1975) - The effect of vinblastine on spermiogenesis in *Drosophila melanogaster* : evidence for two functional classes of cytoplasmic microtubules. *J. Ultrastruct. Res.*, 53, 354-365.

- WINBERG, G.G. (1971) - Methods for the estimation of production of aquatic animals. Academic Press, London and New-York, 175 p.
- WISSOCQ, J.-C., et MALECHA, J. (1974) - Ultrastructure du spermatozoïde de *Piscicola geometra* (Hirudinée Rhynchobdelle). C. R. Acad. Sc. Paris, Série D, 278, 487-490.
- WISSOCQ, J.-C., et MALECHA, J. (1975) - Etude des spermatozoïdes d'Hirudinées à l'aide de la technique de coloration négative. J. Ultrastruct. Res., 52, 340-361.
- WOJTAS, F. (1959) - Pijawki (Hirudinea) rzeki Grabi. Soc. Sci. Lodz. Sect. III, 58, 1-64.
- WURTZ, A. (1958) - Peut-on concevoir la typification des étangs sur les mêmes bases que celle des lacs ? Verh. Intern. ver. Limnol., 13, 381-393.
- ZICK, K. (1933) - Weiteres über Zucht und Fortpflanzung des Medizinischen Blutegels. Zool. Anz., 103, 49-55.
- ZISSLER, D. (1969) - Die Spermiohistogenese des Süßwasser-Ostracoden *Notodromas monacha* O.F. Müller. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 96, 87-133.