

50376
1981
182-1

50376
1981
182-1

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

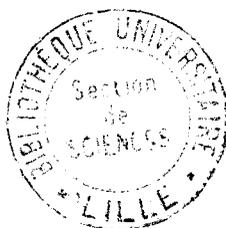
DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Gérard PRENSIER

**ETUDE CYTOPHYSIOLOGIQUE DE LA GREGARINE
DIPLAUXIS HATTI PARASITE COELOMIQUE DE
PERINEREIS CULTRIFERA GRÜBE**

(Reproduction - Infestation de l'hôte - Contrôle hormonal de la croissance)



Présentée le 12 FEVRIER 1981 devant la Commission d'Examen

JURY

Président	M. M. DURCHON	Professeur
Rapporteur et directeur de Thèse	M. E. VIVIER	Professeur
Rapporteurs	M. J. SCHREVEL	Professeur
	M. A. DHAINAUT	Professeur
Examineur	M. B. MONTUELLE	Professeur
Membre invité	M. M.E.J. HOLWILL	

ETUDE CYTOPHYSIOLOGIQUE DE LA GREGARINE DIPLAUXIS HATTI
PARASITE COELOMIQUE DE PERINEREIS CULTRIFERA GRÜBE
(REPRODUCTION - INFESTATION DE L'HOTE - CONTROLE HORMONAL
DE LA CROISSANCE)

PRENSIER GÉRARD

LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE
E.R.A. C.N.R.S. n° 184
UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE I
59655 VILLENEUVE D'ASCQ CEDEX

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, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A.LEBRUN.

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 - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire

PROFESSEURS - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
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. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GRANÉLLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie Organique Biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. CHAPOTON Alain	Electronique

M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et Environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la Réactivité Chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie Animale
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie Hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie Hertzienne
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des Cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie Mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. HOUDART René	Physique Atomique et Moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et Statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie Hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
Mle LEGRAND Denise	Algèbre
Mle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie Hertzienne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M. LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKÉ Bruno	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques

M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M ^{lle} MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquées
M ^{me} N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M ^{lle} PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie Animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie Structurale
M. RICHARD Alain	Biologie Animale
M. RIETSCH François	Physique des Polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
M ^{me} SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie Moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
M ^{lle} SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie Alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VERBERT André	Biochimie
M. VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
M ^{me} ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

AVANT - PROPOS

Avant d'aborder l'exposé de mon sujet de recherche, j'ai le plaisir d'exprimer ma très respectueuse gratitude aux membres de mon Jury de thèse, à :

Monsieur le Professeur M. DURCHON, qui me fait le grand honneur de présider mon jury de thèse, et pour m'avoir reçu dans le laboratoire avec beaucoup de gentillesse et aidé par ses remarques pertinentes sur certains aspects de mes recherches.

Monsieur le Professeur E. VIVIER, qui m'a proposé ce sujet et a su m'insuffler le goût de la recherche dans un domaine où sa compétence ne fait pas de doute. Bien que très occupé, il m'a toujours écouté d'une oreille attentive et par ses conseils et ses encouragements a su me redonner confiance.

Monsieur J. SCHREVEL, Professeur à POITIERS qui s'est intéressé à mes travaux depuis le début, et a bien voulu me consacrer une partie de son temps afin de m'éclairer de ses conseils judicieux et de ses critiques. Qu'il me soit permis également de le remercier pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire afin d'effectuer certains travaux avec un maximum d'efficacité.

Monsieur le Professeur A. DHAINAUT, qui en tant que spécialiste des techniques appliquées à la Microscopie électronique a accepté de juger et de critiquer ce travail.

Monsieur le Professeur B. MONTUELLE, qui bien que non spécialiste du sujet traité ici a bien voulu participer à mon jury de thèse. Etant tous deux dans le même groupe d'enseignement, ses encouragements et ses conseils m'ont permis de beaucoup progresser du point de vue pédagogique.

Monsieur le Professeur M.E HOLWILL, spécialiste de la motilité flagellaire qui a accepté d'examiner mon travail et saura sans nul doute me fournir de précieuses indications pour mener à bien certains aspects de l'orientation future de mes travaux.

Tous mes remerciements vont aussi aux responsables du Laboratoire de Biologie Marine de ROSCOFF (Messieurs J. BERGERARD et L. CABIOCH) qui m'ont aimablement accueilli et rendu le travail plus aisé.

Ma très vive reconnaissance va à mes parents et à mon épouse sans qui, je le pense sincèrement je n'aurai pu réaliser ce travail.

Ma cordiale amitié à tous les collègues qui m'ont encouragé, et dans certains cas grandement aidé afin de m'initier aux techniques auxquelles j'ai du faire appel pour résoudre certains de mes problèmes.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame E. FERREIRA qui a assuré une grande partie du travail technique, ainsi que Madame F. BONET qui a effectué plusieurs séries d'autoradiographie.

Que Monsieur M. GUILLOU, cinéaste à l'Université de LILLE I, avec qui j'ai réalisé le film d'introduction à ma soutenance de thèse, accepte mes plus vifs remerciements.

Je n'oublierai pas pour terminer Madame R. BEAUCAMP, Madame A. AUGER et Mr. D. LAZARECKI qui ont assuré pour l'essentiel la réalisation du volume de thèse.

ETUDE CYTOPHYSIOLOGIQUE DE LA GRECARINE DIPLAUXIS HATTI PARASITE
COELOMIQUE DE PERINEREIS CULTRIFERA GRÜBE .

(REPRODUCTION - INFESTATION DE L'HÔTE - CONTRÔLE HORMONAL DE LA CROISSANCE)

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION.</u>	1	
<u>MATERIEL ET METHODES .</u>	4	
I) MATERIEL .		
II) METHODES .	4	
1°) Obtention de parasites aux différents stades du cycle	4	
2°) Technique expérimentale en vue de l'étude du rôle de l'hormone cérébrale de <u>Perinereis</u> sur le développement de <u>Diplauxis</u> .	5	
3°) Etude du mécanisme d'infestation .	5	
4°) Techniques pour la microscopie électronique .	6	
<u>RAPPELS SUR LE CYCLE IN VIVO .</u>	8	
1°) Evolution naturelle .	8	
2°) Evolution expérimentale .	8	
3°) Mécanisme d'infestation .	10	
<u>ETUDE ULTRASTRUCTURALE .</u>	12	
<table border="1"><tr><td>CHAPITRE I : LA DIVISION NUCLEAIRE</td></tr></table>		CHAPITRE I : LA DIVISION NUCLEAIRE
CHAPITRE I : LA DIVISION NUCLEAIRE		
<u>INTRODUCTION:</u>	12	
<u>RESULTATS:</u>		
1°) Apparition des centres cinétiques et formation du fuseau de division.	13	
2°) La métaphase.	15	
3°) La montée anaphasique des chromosomes.	16	
4°) La télophase et le devenir des centres cinétiques.	17	

<u>DISCUSSION :</u>	19
1°) Les centres cinétiques et l'initiation du fuseau achromatique.	19
2°) Les cinétochores et les chromosomes.	21
3°) Le rôle des microtubules dans la séparation des génomes.	23

CHAPITRE II : LA GAMÉTOGÈSE	26
------------------------------------	----

I) <u>LES PHÉNOMÈNES QUI ACCOMPAGNENT LE DÉCOUPAGE CYTOPLASMIQUE</u>	26
1°) Formation et évolution de la paroi kystique.	26
2°) Le découpage cytoplasmique au cours des divisions progamiques et de l'individualisation des gamètes.	27
a) Origine et évolution des membranes des gamètes	27
b) Les noyaux et les centres cinétiques au cours de la gamétogénèse.	29
3°) L'individualisation des gamètes.	30
a) Perlage des gamètes mâles et femelles.	30
b) Le gamète mâle.	33
c) Le gamète femelle.	35

II) <u>DISCUSSION.</u>	36
1°) Les membranes dans la genèse des gamètes.	36
a) La membrane plasmique.	36
b) Les membranes du réticulum endoplasmique.	37
2°) Le gamète mâle.	38
a) Le mouvement et l'axonème flagellaire de <u>Diplauxis hatti</u> .	38
α) Mécanisme du mouvement flagellaire du gamète mâle.	39
β) Signification d'un axonème fonctionnel de base "3 + 0"	41

CHAPITRE III : LA FECONDATION.		42
I) <u>LE ZYGOTE</u> ,		42
II) <u>LE SPOROBlaste UNINUCLEE</u> ,		44
CHAPITRE IV : LA SPOROGENESE		45
I) <u>LA PAROI DU SPOROCYSTE.</u>		45
II) <u>LE SPOROZOITE MUR</u> ,		46
III) <u>ORIGINE ET EVOLUTION DES ELEMENTS DU FUTUR SPOROZOITE.</u>		48
1°) Le complexe membranaire interne et la membrane plasmique ⁴⁸		
2°) Les membranes ergastoplasmiques et le Golgi.		50
3°) Le centre cinétique et les microtubules sous-pelliculaires.		52
4°) Les réserves du sporozoïte.		52
IV) <u>DISCUSSION.</u>		53
1°) La formation de la paroi kystique et de la paroi du sporoblaste ⁵³		
2°) Les membranes du sporozoïte.		55
3°) Le centre cinétique .		58
4°) Le rôle du dictyosome dans la genèse des organites antérieurs (micronèmes , rhoptries)		59
5°) Les réserves.		60
CHAPITRE V : LE MECANISME DE L'INFESTATION		62
I) <u>L'EXCYSTATION.</u>		62
1°) Excystation in vitro.		62
2°) Excystation in vivo .		63
II) <u>LA CINETIQUE D'INFESTATION.</u>		64
1°) Temps 6 heures.		
2°) Temps 19 - 24 heures.		
3°) Temps 48 - 96 heures.		
III) <u>LES MODIFICATIONS ULTRASTRUCTURALES DES GERMES INFECTIEUX AU COURS</u>		65
<u>DU PASSAGE TRANSEPITHELIAL.</u>		
IV) <u>DISCUSSION.</u>		67

CHAPITRE VI. <u>ACTION DE L'HORMONE CEREBRALE DE PERINEREIS SUR LA CROISSANCE DE DIPLAUXIS</u>	70
--	----

I <u>INTRODUCTION</u>	70
-----------------------	----

II <u>ESSAIS DE MAINTIEN EN SURVIE DES TROPHOZOITES DE DIPLAUXIS EN MILIEU ARTIFICIEL</u>	71
---	----

III <u>EXPERIMENTATION IN VIVO</u>	73
------------------------------------	----

1) Expériences de greffes de cerveaux sur animaux décébrés depuis 7 jours - 20 jours - 28 jours	73
---	----

a) Contrôle après 3 jours.	74
----------------------------	----

b) Contrôle après 7 jours.	74
----------------------------	----

c) Contrôle après 12 jours.	74
-----------------------------	----

2) Modifications ultrastructurales subies par les trophozoïtes après action de l'hormone cérébrale de <u>Perinereis</u> .	75
---	----

a) Ultrastructure des trophozoïtes en croissance normale.	76
---	----

b) Jeunes trophozoïtes à mouvements pendulaires (100 μ m) après trois jours de blocage	76
--	----

c) Trophozoïtes à mouvements pendulaires péristaltiques après 3 jours et 12 jours de blocage	77
--	----

d) Trophozoïtes à mouvements péristaltiques après 12 jours de blocage.	77
--	----

<u>IV DISCUSSION.</u>	78
-----------------------	----

<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	80
------------------------------	----

INTRODUCTION

Les Grégarines constituent un groupe de Sporozoaires connus depuis très longtemps dans de nombreuses espèces d'invertébrés. Chez les Annélides Polychètes plus précisément, les premières découvertes remontent à la deuxième moitié du 19^{ème} siècle (KOLLIKER, 1849, DE SAINT JOSEPH, 1895, CLAPAREDE, 1861, LANKESTER, 1863, SCHNEIDER, 1875, GIARD, 1884). Quelques années plus tard, avec le développement des techniques cytologiques en microscopie optique les travaux de BRASIL (1905^a- 1905^b - 1907 - 1909) et de CAULLERY et MESNIL (1900 - 1900^a - 1901) font progresser rapidement les connaissances sur les Grégarines.

Le traité de GRASSE en 1953 apporte une remarquable mise au point sur leur systématique et à cette époque, le développement de la microscopie électronique va permettre en particulier à VIVIER et SCHREVEL, à partir des années 1964 d'avoir de nombreuses conceptions nouvelles sur la biologie de ce parasite. Les apports de la microscopie électronique sont indiscutables quant à la connaissance de la phase végétative et du germe infectieux (voir VIVIER et coll., 1970 - PORCHET-HENNERE et VIVIER, 1971). Par contre, il faut déplore le peu de travaux ayant trait aux autres phases du cycle, la gamétogenèse (DESPORTES, 1966, 1970 - BESSE, 1975) et surtout la sporogenèse (PORCHET-HENNERE et FISHER, 1973).

C'est en 1955 que HATT signale pour la première fois dans le coelome de Perinereis cultrifera des stades de Sporozoaires. Ces parasites intracoelomiques appartiennent à une espèce de Grégarine que VIVIER et coll. (1964) vont dénommer Diplauxis (1) hatti (2). Ce nom résulte d'une particularité de ce parasite, à savoir que dans le coelome des hôtes, on trouve toujours les trophozoïtes accouplés. Les plus petits stades observables sont déjà en syzygie et toute la croissance végétative s'effectue sous cette forme. Cet accouplement très précoce posait donc un double problème intéressant à éclaircir. Il fallait d'une part déterminer le mécanisme d'infestation, et d'autre part savoir à quel moment s'effectue la mise en syzygie. Ces points ont été abordés par l'étude des infestations naturelles et surtout à partir d'infestations expérimentales.

1) De Diplos= double et Auxein = croître

2) En hommage à HATT

La difficulté de l'étude de la phase enkystée est due essentiellement aux problèmes rencontrés lors de la fixation et de l'inclusion, par suite de la présence d'une épaisse paroi kystique. Chez Diplauxis, par contre, la coque kystique paraissait plus mince et il était dès lors possible d'envisager l'étude de la phase de reproduction avec toutes les chances de réussite. Au cours de ces travaux, plusieurs points se sont révélés particulièrement positifs.

Le premier concerne la division nucléaire qui est mal connue chez les Grégarines, et seule la division progamique a été étudiée (DESPORTES, 1970 PORCHET-HENNERE et FISHER, 1973 et BESSE, 1975). Nous étudierons ici la formation du fuseau de division et la séparation des chromosomes à l'anaphase, à la fois pour la division progamique et postgamique.

Un deuxième point original est relatif à la structure du gamète mâle. Dès 1973, nous avons montré que l'axonème flagellaire des éléments sexuels mâles de Diplauxis présente une structure très atypique (3 + 0), cependant parfaitement fonctionnelle (PRENSIER et coll., 1980). Si parmi les flagelles connus chez les Grégarines certains sont bâtis sur le schéma ennéanème (DESPORTES, 1966, 1970 - MOLON-NOBLOT, 1976, 1977), c'est dans ce groupe que l'on semble devoir trouver les plus grandes simplifications de la structure flagellaire (axonème 6 + 0 chez Lecudina tuzetae (SCHREVEL et BESSE, 1975), d'où l'intérêt majeur de leur étude.

La Grégarine Diplauxis, en dehors de l'avantage qu'elle présente pour l'étude de la gamétogenèse et de la fécondation s'est révélée être un matériel de choix pour ce qui concerne les recherches sur la genèse des sporozoïtes. Parmi les Sporozoaires, seuls quelques travaux traitent de cette phase du cycle et sont relatifs à peu d'espèces (Eimeria brunetti et Toxoplasma gondii (FERGUSON et coll., 1978-1979) - Coelotropha durchoni (PORCHET-HENNERE, 1971) - Diplauxis hatti (PRENSIER, 1970-1971) - Diplauxis schreveli (PORCHET-HENNERE et FISHER, 1973) et Aggregata eberthi (HELLER, 1969 - PORCHET-HENNERE et RICHARD, 1971). Mais les données acquises sont toujours très partielles et incomplètes, d'où la recherche de la séquence complète de la genèse des zoïtes, depuis le tout début de leur individualisation jusqu'au stade de l'excystation.

Là n'étaient pas les seuls intérêts de l'étude de notre matériel. Diplauxis hatti, en tant que grégarine coelomique possède une physiologie

toute particulière. Son développement végétatif est étroitement lié à l'évolution de son hôte Perinereis. Depuis les travaux de DURCHON (1948), on sait que le cerveau des Nereidae secrète une substance hormonale qui dans le cas de Perinereis cultrifera est inhibitrice des transformations hétéro-néréidiennes (DURCHON, 1948 à 1956', BOILLY-MARER, 1962) et de la croissance germinale et éléocytaire (CHOQUET, 1962 - DHAINAUT et PORCHET, 1967 - SICHEL, 1969). De plus l'hormone cérébrale de P. cultrifera est inhibitrice de la croissance de son parasite coelomique (DURCHON et VIVIER, 1961-1964). Parmi les Sporozoaires parasites d'invertébrés, plusieurs autres sont connus pour suivre étroitement le rythme vital de leur hôte^(VIVIER, SCHAEVEL et HENNERE 1963). C'est le cas de certaines Grégarines d'insectes (NOWLIN, 1922 - CORBEL, 1964) ou de Polychètes (CAULLERY et MESNIL, 1898 - BRASIL, 1905 - CUNNINGHAM, 1907 - HENTSCHEL, 1926-1930), et de certaines Coccidies (PORCHET-HENNERE, 1967-1969), toutes étant coelomiques Diplauxis, en raison du fait qu'il est possible de provoquer sa croissance par ablation du prostomium de son hôte, ou au contraire de bloquer celle-ci par implantation coelomique de cerveaux actifs semblait a priori être un matériel de choix pour l'étude des relations hôte-parasite. De fait, étant donné la complexité du mécanisme d'action de l'hormone, et surtout la difficulté due à l'irrégularité très importante des parasitémies, ce sujet n'a fait l'objet que d'une approche expérimentale relativement restreinte.

MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL

Les Perinereis utilisées lors de nos travaux proviennent en majeure partie de la Station de Biologie Marine de ROSCOFF, où nous avons effectué plusieurs séjours de récolte et de recherche qui ont beaucoup aidé à la réalisation de ce travail.

D'autres annélides nous ont été fournies par la Station de Biologie Marine de Luc-Sur-Mer, et ces deux dernières années, la plupart des animaux utilisés ont été récoltés sur les côtes de la Manche, dans les environs de AULT-ONIVAL.

Signalons ici, que suivant les biotopes, les infestations sont variables, les Perinereis de ROSCOFF étant les mieux parasitées. Par contre, les vers provenant de cette Station sont assez gros et se prêtent mal à des études expérimentales.

II - METHODES

1°) Obtention de parasites aux différents stades du cycle

La croissance des Grégarines coelomiques de Perinereis étant directement sous la dépendance de son hormone cérébrale inhibitrice de l'épitoquie, il suffit de décérébrer les Annélides pour déclencher le développement des parasites.

Les vers sont anesthésiés au MS 222 (Tricaine méthane sulfonate) à 1°/‰ dans l'eau de mer et l'ablation du prostomium est pratiquée selon la méthode de DURCHON (1952). Les animaux opérés sont maintenus en boîtes à une température voisine de 16° C.

Des ponctions coelomiques, réalisées à l'aide de micropipettes sont montées entre lame et lamelle lutée à la vaseline, et de cette façon il est aisé de déterminer le stade d'évolution du parasite. Sur des préparations de ce type, dont la pollution bactérienne a été ralentie par adjonction de quelques U. I. d'antibiotiques, des prises de vue cinématographiques des différents stades de développement de Diplauxis, particulièrement de la

gamétogenèse et de la danse des gamètes, ont été effectuées au laboratoire (Le microscope utilisé est un NACHET interférentiel et les prises de vues réalisées à la caméra ARRIFLEX sans objectif sur film Eastman colour négative II (Film 7247).

2°) Technique expérimentale en vue de l'étude du rôle de l'hormone cérébrale de Perinereis sur le développement de Diplauxis

Les premiers essais ont été réalisés in vitro, sur des trophozoïtes de différentes tailles, maintenus en survie dans un milieu nutritif liquide. Plusieurs milieux ont été testés, et les meilleurs résultats ont été obtenus en boîte Falcon, dans un milieu dérivé du milieu de COUSSERANS (1975).

Des essais d'incorporation de Leucine et d'Uridine tritiées ont été effectués sur des trophozoïtes en croissance soustraits à l'influence hormonale, et sur des individus placés dans le milieu auquel on a rajouté plusieurs cerveaux actifs de Perinereis.

Les résultats obtenus sont très peu concluants et avec une dose de produit radioactif de $25 \mu\text{Ci/ml}$ de milieu, nous n'avons pas obtenu de marquage significatif dans les deux lots.

Le même type d'expérience a alors été tenté in vivo. Des lots témoins de Néreis, décérébrées depuis 7 jours, 15 jours et 21 jours reçoivent des doses de produit radioactifs (Leucine et Uridine ^3H) équivalent à $30 \mu\text{Ci}$ par unité de poids de Néreis.

Sur un deuxième lot de Vers décérébrés depuis également 7, 15 et 21 jours, il est procédé à des réimplantations de cerveaux actifs (équivalent 1 cerveau 1/2 par unité de poids) et après 12 jours et 7 jours de blocage, des doses de Leucine et Uridine tritiées équivalentes à celles du lot témoin sont injectées.

Là non plus, les résultats autoradiographiques ne sont pas significatifs et le problème majeur est de retrouver des parasites dans les inclusions.

3°) Etude du mécanisme d'infestation

Le point de départ de cette étude consiste en l'obtention de larves viables indemmes de toute infestation naturelle .

Dans un premier temps, des fécondations artificielles sont réalisées en cristallisoirs à partir d'animaux parfaitement épitoques naturellement. Les oeufs fécondés sont lavés abondamment à l'eau de mer, et dès l'éclosion, les larves qui présentent trois segments sont isolées et placées dans de l'eau de mer propre. Ces larves sont observées régulièrement pour déterminer le moment approximatif du début de l'alimentation.

Parallèlement à ces fécondations, des sporokystes murs sont récupérés sur des Néréis épitoques. Les kystes sont lavés abondamment, puis centrifugés dans de l'eau de mer contenant quelques UI d'antibiotiques.

Quand les larves sont susceptibles de s'alimenter, elles sont placées dans un petit volume d'eau de mer stérile (dans des trous de plaque à microtitration) et on y additionne une certaine quantité de sporocystes de Diplauxis.

Les larves sont observées et fixées à différents temps après le début de l'infestation.

4°) Techniques pour la microscopie électronique

De nombreux essais de fixation ont été effectués en vue d'obtenir les meilleurs résultats concernant la gamétogenèse et la sporogenèse.

Les fixations selon KARNOVSKY (1965) et TERZAKIS (1968) n'ont donné que des résultats médiocres, et les meilleures images ont été obtenues par la technique classique de double fixation au glutaraldéhyde à 6,25 % en tampon phosphate 0,1 ou 0,15 M, suivie d'un passage dans l'acide osmique à 1 % dans le liquide de lavage. Le lavage intermédiaire s'effectue au tampon phosphate avec ou sans sucrose, sans différences notables.

L'inclusion est pratiquée soit à l'araldite, soit à l'épon épikote, en prolongeant fortement les temps d'imprégnation dans le mélange Résine, $\frac{1}{2}$ oxyde de propylène et dans la résine finale (au-delà de 24 H à $\frac{1}{2}$ T° du laboratoire pour les stades gamétokystes et sporokystes).

Les coupes sont effectuées au PORTER BLUM ou au REICHERT OMU2 et toujours recueillies sur grilles (mèche 100) recouvertes au préalable d'une membrane de parlodion à 0,8 %.

Les coupes sont contrastées à l'acétate d'uranyle à 1 % en solution alcoolique 50° pendant 5 mn puis au citrate de Plomb selon REYNOLDS (1963) pendant 1 à 3 mn.

La mise en évidence des polysaccharides est faite selon la technique à la thiocarbohydrazide - Protéinate d'argent selon SELIGMAN modifiée par THIERY (1967) sur coupes flottantes. La réaction au Lanthane est celle utilisée par BANNISTER (1972).

Pour l'étude des coupes sérieées, des rubans de 30 à 50 coupes sont déposées sur grilles à trou ovale unique recouvertes d'une membrane de parlodion à 0,8 % et carbonées avant examen. Les reconstitutions tridimensionnelles sont pratiquées sur plaque de verre.

Les observations ultrastructurales ont été faites aux microscopes HITACHI H S 7 S et HUITTE.

La technique d'autoradiographie est classique sur lames parlodionnées et carbonées.

RAPPELS SUR LE CYCLE IN VIVO

1°) Evolution naturelle

La Grégarine Diplauxis hatti est un parasite coelomique extra-cellulaire de Perinereis de tous âges.

Quel que soit le stade du développement, les trophozoïtes sont toujours en syzygie. Les plus petits couples sont observés sur des Perinereis d'un an, et ont une taille voisine de $15 \mu\text{m}$ de longueur sur 3 à $4 \mu\text{m}$ de diamètre (Fig. a.a₀). Ces syzygies sont douées de mouvements pendulaires énergiques et ont un épicyte présentant quelques microvillosités.

Les hôtes plus âgés, de deux à trois ans présentent dans leur coelome des couples de l'ordre de $100 \mu\text{m}$ de long sur $20 \mu\text{m}$ de diamètre, dont les mouvements pendulaires sont ralentis (Fig. b). L'épicyte présente alors de très nombreuses microvillosités.

Dans la nature, la croissance végétative des parasites s'effectue en majeure partie pendant les 2 à 3 derniers mois de la vie de l'hôte, en même temps que celui-ci subit sa transformation hétéronéréidienne. La gamétogenèse et la sporogenèse ont lieu vers la fin du cycle biologique des Annélides et les sporokystes mûrs sont expulsés en même temps que les produits génitaux des hôtes lors de leur danse de fécondation.

2°) Evolution expérimentale

La croissance, la gamétogenèse et la sporogenèse de Diplauxis peuvent être obtenues expérimentalement par décérébration d'hôtes de tous âges, dans un délai de 1 mois et demi à une température de 16°C . A des températures inférieures (vers 14°C) les parasites évoluent très lentement, malgré la suppression de l'hormone cérébrale inhibitrice de l'épitoquie. Les transformations hétéronéréidiennes de l'hôte semblent moins sensibles à la température que le développement de son parasite coelomique.

La croissance végétative de Diplauxis se subdivise en deux étapes bien distinctes, basées sur le mouvement des trophozoïtes. Depuis les plus petites tailles jusqu'à une longueur de syzygie de $250 \mu\text{m}$ et $40 \mu\text{m}$ de diamètre, les couples sont doués de mouvements pendulaires d'abord très rapides puis qui se ralentissent progressivement (Figs. a.a₀.b) .

Un stade intermédiaire se caractérise par l'apparition d'un deuxième type de mouvements qui se surimposent aux balancements pendulaires fortement ralentis et plus saccadés. Des ondes de constrictions localisées et brèves annoncent l'apparition des mouvements péristaltiques typiques (Fig. c).

Les ondes de péristaltisme intéressent très rapidement toute la longueur des trophozoïtes, alors que les battements pendulaires disparaissent (Fig. c). Par l'observation cinématographique, il apparaît que les ondes de péristaltisme provoquent une diminution de diamètre de près de 80 % et intéressent environ 1/6 de la longueur des couples. Ces ondes, parfois très rapides entraînent un brassage énergique du cytoplasme, et provoquent un mouvement incessant des noyaux qui migrent constamment d'une extrémité à l'autre de chacun des individus de la syzygie.

La croissance se poursuit rapidement au cours de la phase à mouvements péristaltiques et bientôt les deux gros noyaux végétatifs vont disparaître (Fig. d). Ceci annonce le début des divisions progamiques qui se poursuivent pendant environ 72 H en même temps que s'effectue l'enkystement. Dès l'entrée en gamétogenèse, les mouvements péristaltiques se ralentissent et la paroi kystique apparaît peu à peu (Fig. e. f.). Cette paroi consiste en une couche translucide mince d'environ 2 μ m d'épaisseur, qui englobe le cytoplasme. Les mouvements du contenu des gamontes persistent encore quelque temps à l'intérieur de l'enveloppe kystique puis s'interrompent.

Le cytoplasme subit alors un découpage en grosses masses, qui se subdivisent elles-mêmes, à leur périphérie en amas plus petits donnant au contenu cytoplasmique un aspect de mûres accolées les unes aux autres (Fig. g. h. i. j. k).

Ceci correspond au stade du perlage qui amène à la formation des gamètes mâles et femelles. Tout le cytoplasme des gamontes participe à l'élaboration des gamètes et il n'existe pas de reliquat cytoplasmique comme c'est le cas chez de nombreuses espèces de Grégarines.

Les gamètes mâles et femelles sont sphériques et d'une taille très voisine, de l'ordre de 3 à 4 μ m de diamètre (Fig. l). Par étude cinématographique, il a été possible de suivre le perlage et la danse des gamètes.

Quand les éléments sexuels sont complètement individualisés, les gamontes mâles et femelles apparaissent absolument identiques et la limite les séparant a disparu. A l'extrémité du gamonte mâle opposée au gamonte

femelle, quelques gamètes mâles flagellés se mettent en mouvement. Environ 15 mn plus tard, tous les éléments mâles sont mobiles, et certains commencent à s'insinuer sur le pourtour du gamonte femelle. Une demi-heure après la mise en mouvement des premiers gamètes mâles, ces derniers ont envahi tout le gamétokyste et l'on assiste alors à la danse typique des gamètes (Fig. 1). Le brassage du contenu du kyste est alors très énergique et progressivement les éléments sexuels mâles et femelles fusionnent pour former des zygotes (Fig. m).

L'analyse cinématographique du mouvement des gamètes mâles est facilitée par leur observation après libération dans l'eau de mer, par suite de l'éclatement artificiel du gamétokyste. Les éléments mâles sont doués de rapides mouvements de rotation sur eux-mêmes, accompagnés de légers mouvements de balancement. Les déplacements de translation sont très peu importants, mais la densité des éléments sexuels dans le gamétokyste facilite les rencontres entre gamètes mâles et femelles.

La fécondation débute par un accollement localisé entre deux gamètes de sexe opposé (Fig. 1), le mâle entraînant pendant un certain temps l'élément femelle dans son mouvement de rotation. Après fusion des cytoplasmes, les zygotes formés, légèrement piriformes et d'une taille de 5 à 6 μm continuent la danse pendant encore quelque temps par suite de la persistance du flagelle. Progressivement, quand toutes les fécondations sont achevées, les mouvements se ralentissent puis s'interrompent. On peut considérer que la fécondation dure entre 2 H 30 et 3 H.

On passe ensuite à la phase de la sporogénèse qui est assez longue (environ 96 H) et qui amènera la formation de sporocystes ovoïdes (Fig. o), associés en très longs chapelets (Fig. n) et contenant chacun huit sporozoïtes.

Les figures u à z montrent les principaux stades du cycle en microscopie à balayage.

3°) Mécanisme d'infestation

En ce qui concerne le mécanisme d'infestation des hôtes, il a d'abord été établi dans les conditions naturelles avant de passer à la phase expérimentale en vue de l'étude en microscopie électronique.

Au cours de la fécondation des Périnereis, leurs produits génitaux, mâles et femelles, sont rejetés dans l'eau de mer, et en même temps les formes de résistance de son parasite coelomique. Les sporokystes s'ouvrent au

passage de la zone pygidiale et libèrent ainsi un grand nombre de chapelets de sporocystes.

Les ovocytes de Néreïs, lorsqu'ils sont fécondés rejettent leurs mucopolysaccharides cytoplasmiques qui forment une gangue muqueuse épaisse et très collante. Une partie des sporocystes en suspension vont rester collés à cette gangue comme l'a montré l'observation microscopique. A l'éclosion, les larves qui sortent à trois segments restent un certain temps parmi les gangues des oeufs, et il semble que celles-ci constituent leur première alimentation, et donc automatiquement elles ingèrent des sporocystes, point de départ d'un nouveau cycle.

Des infestations expérimentales par de grosses quantités de sporocystes ont permis l'étude du déroulement de l'infestation. Environ 15 jours après éclosion, les larves de Perinereis qui présentent alors 4 à 5 segments ingèrent facilement nombre de sporocystes (Fig. p.s) qui s'ouvrent très rapidement dans l'intestin et libèrent quantité de sporozoïtes (Fig. t).

Environ trois semaines après l'éclosion, il a été possible d'observer de toutes petites syzygies dans le sinus sanguin periintestinal (Fig. et peu de temps après des couples coelomiques. Les infestations expérimentales ont grandement facilité l'étude de la cinétique d'infestation en microscopie électronique, mais il a fallu au préalable déterminer le temps approximatif de l'excystation.

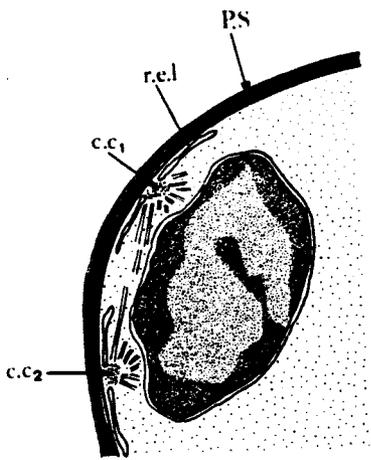
Nous avons donc été amenés à réaliser des excystations in vitro. Les produits utilisés pour l'excystation des spores de coccidies s'étant révélés inefficaces sur notre matériel, nous avons testé l'action du broyat d'intestin de jeunes Perinereis d'un an. Après centrifugation du broyat en pipette capillaire, le surnageant est mis en contact avec des sporocystes mûrs entre lame et lamelle lutée à la vaseline. L'observation au microscope interférentiel montre que le début du mouvement des sporozoïtes dans les spores se situe après 5 heures d'action du broyat. Puis très rapidement, les spores qui se sont dissociées s'ouvrent et laissent échapper leurs sporozoïtes. L'excystation dure environ 1 H in vitro (Fig. r). Nous avons ainsi un temps de base pour l'étude de l'excystation in vivo. Là aussi, c'est environ 6 H après ingestion des sporocystes que commence la libération des sporozoïtes (Fig. t).

La suite du processus d'infestation ne peut être suivi qu'en microscopie électronique.

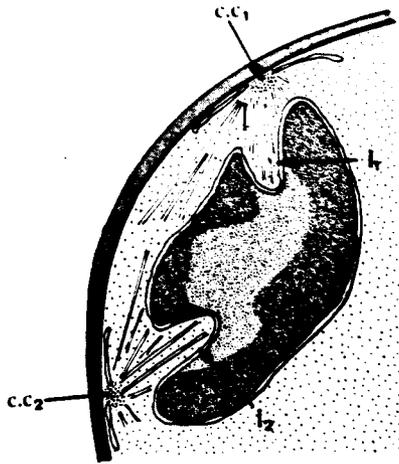
SCHEMA RECAPITULATIF DE LA DERNIERE DIVISION METAGAMIQUE.

L'on retrouve exactement le même processus que pour la division progamique, mais ici, l'extension du fuseau est limitée par la paroi rigide du sporoblaste. (P. S)

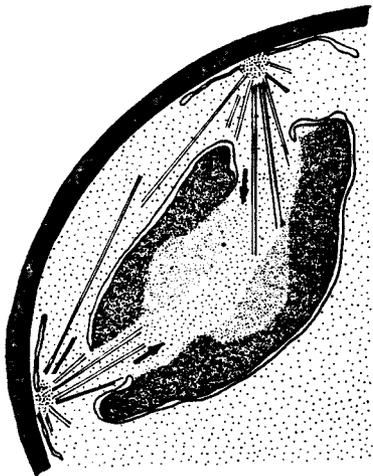
- 1 et 2 - Début de prophase avec formation des deux hémifuseaux et d'un fuseau extranucléaire reliant les deux centres cinétiques ($cc_1 - cc_2$)
- 3 - Rupture de l'enveloppe nucléaire sous la poussée des deux hémifuseaux (Flèches).
- 4 - Mise en plaque métaphasique.
- 5 - Anaphase A.
- 6 - Anaphase B.



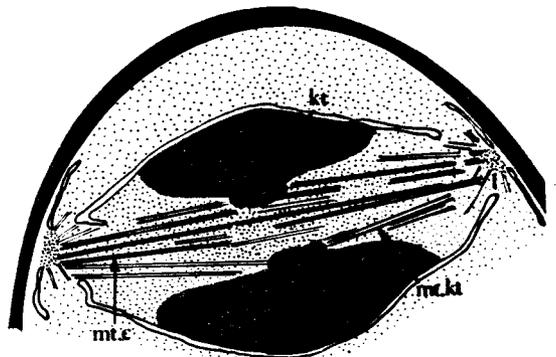
①



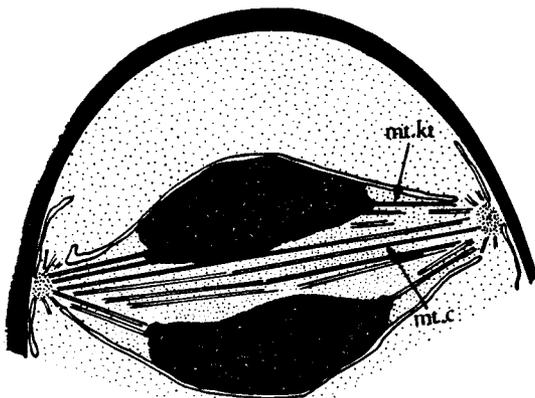
②



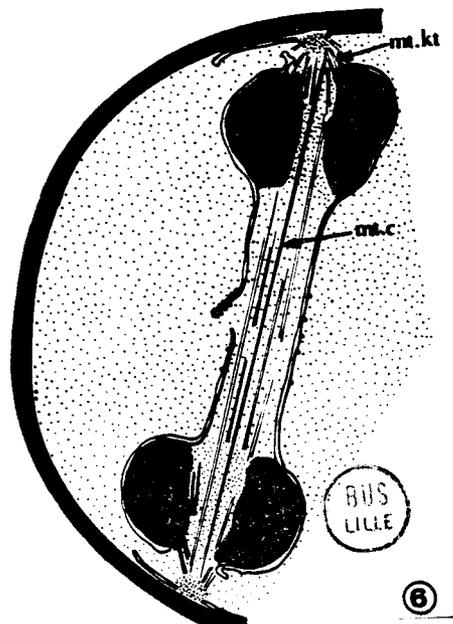
③



④



⑤



⑥

SCHEMA RECAPITULATIF DU DEROULEMENT DE LA DIVISION PROGRAMIQUE

Pour plus de clarté dans le dessin nous avons choisi de représenter l'une des dernières divisions.

Les centres cinétiques (c.c) sont toujours en relation avec des saccules dérivés du réticulum endoplasmique (r.e) et dans ce cas, ceux-ci sont doublés extérieurement par une membrane qui correspond à la limite de vacuoles qui se creusent dans le cytoplasme. (m.v)

1 - Début de la prophase où l'on assiste au dédoublement d'un centre cinétique issu de la division précédente. ($cc_1 - cc_2$) Des microtubules rayonnent à partir des centres cinétiques.

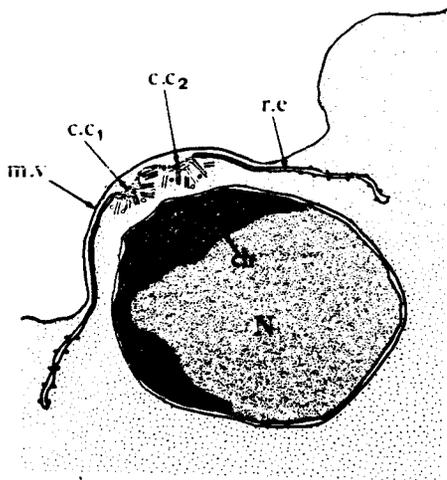
2 - Les centres cinétiques sont en cours de séparation. Deux hémifuseaux se dirigent vers le noyau et des microtubules relient les deux centres (Fu. ext. N = fuseau extranucléaire).

3 - Prophase plus avancée où les deux hémifuseaux provoquent deux invaginations obliques ($I_1 - I_2$) de l'enveloppe nucléaire.

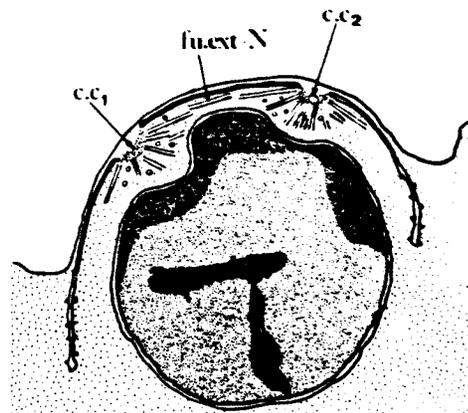
4 - Après rupture de l'enveloppe nucléaire les chromosomes se mettent en plaque métaphasique, et le fuseau est constitué d'un groupe de microtubules continus (mt. c) qui relient les deux pôles, et de plusieurs faisceaux de microtubules cinétochoriens (mt. kt) qui relient les cinétochores (kt) des chromosomes aux pôles.

5 - L'anaphase A se caractérise par un raccourcissement très net des microtubules cinétochoriens (mt. kt) alors que la longueur des microtubules continus (mt. c) ne change pratiquement pas.

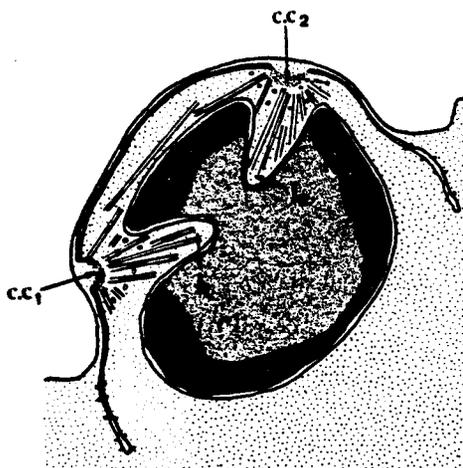
6 - L'anaphase B montre un allongement important du fuseau continu (mt. c), les deux futurs noyaux fils restant reliés par un manchon membranaire (m. mb). Les microtubules cinétochoriens (mt. kt) sont alors très courts.



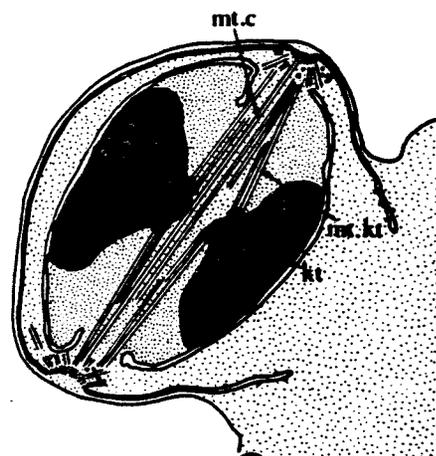
①



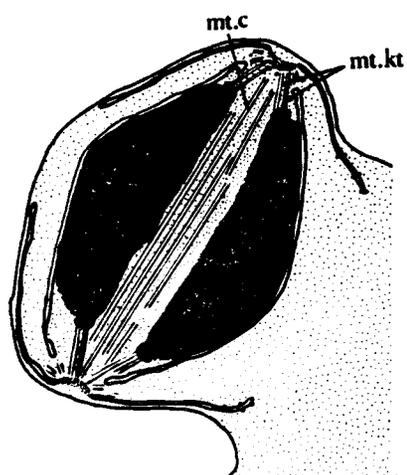
②



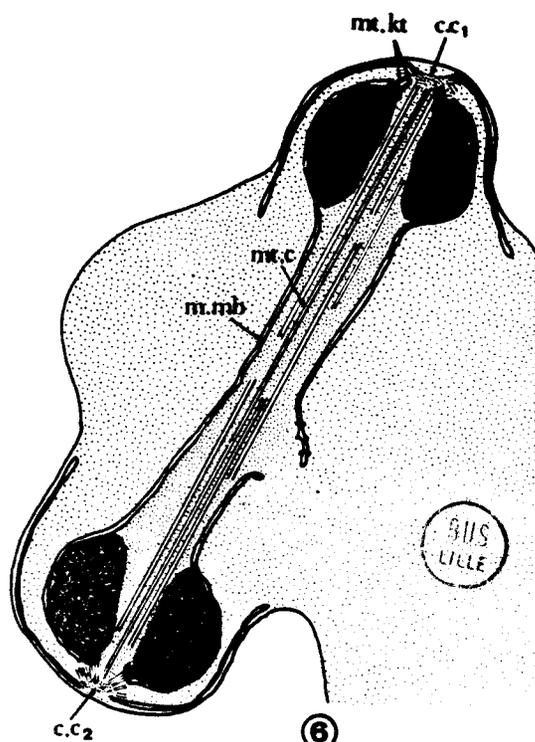
③



④



⑤



⑥

BUS
LILLE

ETUDE ULTRASTRUCTURALE

• Si les études de cytologie ultrastructurale portant sur les Grégarines sont nombreuses en ce qui concerne la phase végétative, assez peu de données précises et complètes sont relatives aux autres phases du cycle, telles la gamétogenèse et la sporogenèse (Cf. INTRODUCTION). De même, un mécanisme fondamental comme la mitose est encore mal connu dans ce groupe. Etant donné qu'avec Diplauxis nous nous trouvions en présence d'un matériel relativement favorable, l'étude approfondie de ces points a été entreprise et fera l'objet dans ce mémoire des quatre premiers chapitres.

CHAPITRE 1 : LA DIVISION NUCLEAIRE

Ce processus biologique universel, quoique très étudié dans un grand nombre de groupes, présente encore nombre de points obscurs, en particulier chez les Sporozoaires.

Par une étude approfondie des différentes phases de la division, et par l'utilisation de la technique de reconstitution tridimensionnelle à partir de coupes sériées de Métaphases et Anaphases, il nous est possible de décrire le processus complet de la mitose progamique et métagamique chez Diplauxis. De plus, les résultats acquis permettent de confirmer certaines hypothèses relatives au mécanisme de séparation des chromosomes à l'anaphase.

Le chapitre sur la division sera traité de telle manière que l'on ne dissocie pas la mitose progamique de la métagamique, et les illustrations équivalentes de l'une et de l'autre seront placées en parallèle sur les planches.

Les trophozoïtes de Diplauxis, en syzygie dès le début de leur développement présentent à la fin de leur croissance végétative un gros noyau contenant en général deux très gros nucléoles sphériques.

La gamétogenèse débute par la division de ce noyau qui n'a jamais été observée en microscopie électronique. Très vite les noyaux issus des premières divisions vont acquérir un diamètre variable, de l'ordre de 5 à 10 μm . Cette taille décroît au fur et à mesure des divisions qui progressivement se synchronisent, et elle devient homogène lors des dernières mitoses progamiques. Les noyaux ont alors une taille d'environ 1,5 μm . C'est sur des noyaux de ce type que nous avons observé les différentes phases de la caryocinèse progamique.

La sporogenèse quant à elle débute aussitôt après la fécondation. Les zygotes s'entourent rapidement d'une paroi complexe constituée de plusieurs couches. Dans les sporoblastes, les noyaux de fécondation vont subir trois divisions successives. C'est vraisemblablement à la première d'entre elles que s'effectue la réduction chromatique dont nous n'avons obtenu que de rares images non présentées dans ce chapitre.

Les phases de la caryocinèse métagamique ainsi que l'étude en coupes sériées n'intéressent que les 2ièmes et 3ièmes mitoses.

I RESULTATS

1°) Apparition des centres cinétiques et formation du fuseau de division

Dans le gamonte plurinucléé, le réticulum endoplasmique est très abondant et va participer à l'individualisation des gamètes. Sur des stades précoces de la gamétogenèse, le nombre de noyaux est encore faible mais on remarque que chacun d'entre-eux présente, parallèlement à son enveloppe nucléaire une lame de réticulum endoplasmique qui double en partie celle-ci (Fig. 14).

Sur des stades plus avancés, où le découpage cytoplasmique qui préfigure l'individualisation des gamètes a déjà commencé, cette couche bimembranaire (noter que les deux membranes sont toujours étroitement accolées) apparaît plus nettement, et de plus, elle est doublée par une simple membrane située à 20 nm environ (Fig. 15-16-17-18). Cette dernière correspond en fait à la limite de larges vacuoles qui apparaissent dans le gamonte (voir chapitre II). Sur le pourtour de ces vacuoles sont disposés les noyaux qui se trouvent

ainsi en partie doublés par un complexe trimembranaire (membrane limitante de la vacuole + complexe bimembranaire sous-jacent ayant pour origine le réticulum endoplasmique).

Au niveau de la lame bimembranaire sont situés les "centres cinétiques" qui vont polariser la division. Le "centre cinétique" (Figs. 1.14.15.16) est constitué par une accumulation de matériel finement granulaire, relativement dense aux électrons et qui se trouve toujours disposé de la même façon. Il est situé entre l'enveloppe nucléaire, légèrement déprimée à cet endroit, et une interruption circulaire de la cisterne ergastoplasmique (démonstré par l'étude en coupes sériées) qui constitue donc une sorte de large pore d'environ $0,1 \mu\text{m}$ de diamètre.

Dans le cas de la division métagamique, sont présentes des structures tout à fait analogues (Fig. 2.3.4 et 11.12). Quand le centre cinétique initial s'est déjà dédoublé, on retrouve à deux pôles du noyau des accumulations en cupule de matériel finement granulaire, où sont déjà présents de courts microtubules. On remarque nettement le "pore" dans une lame de réticulum endoplasmique parallèle à la membrane plasmique du sporoblaste à environ 20 nm de celle-ci. Ces structures sont présentes dès la première division métagamique et augmentent leur extension lors des deux divisions suivantes.

Dans les centres cinétiques, il n'a jamais été possible de déceler un organite structuré apparenté à un centriole, même modifié, comme cela a pu être observé chez d'autres Grégarines (DESPORTES, 1970, BESSE, 1975, MOLON-NOBLOT, 1976). Certaines images (Fig. 12) laissent supposer que les deux centres cinétiques polarisant la division sont issus d'un seul centre qui se dédouble et qui subsiste de la caryocinèse précédente.

C'est à partir du matériel constituant les centres cinétiques que s'individualisent les microtubules fusoriaux. Par l'étude en coupes sériées il a été possible de suivre la genèse du fuseau de division. A partir des centres cinétiques déjà bien séparés apparaissent de courts microtubules sans orientation particulière (Fig. 2.3.4). Puis, parmi ceux-ci, à chacun des pôles certains microtubules vont prendre des directions préférentielles. On peut alors constater que des microtubules sont orientés d'un centre cinétique à l'autre (Fig. 5 à 10, 11-13 et 15-16) et que d'autres forment deux faisceaux en direction du noyau. Ces groupes issus des centres cinétiques repoussent devant eux l'enveloppe nucléaire qui de ce fait s'invagine en doigt de gant, parfois très profondément (Fig. 5 à 7 pour la division métagamique et Fig. 15.16.17.18 pour la division progamique).

A ce stade sont donc présents deux faisceaux obliques de microtubules, formant entre eux un angle variable, et qui se trouvent engagés dans deux dépressions du noyau. Ceci apparaît très bien sur la Fig. 18 qui montre un plan de coupe longitudinal de l'une des invaginations (I_1) et transversal de l'autre (I_2).

Ainsi, l'initiation de la mitose grégarinienne a pour origine un centre cinétique (non structuré chez Diplauxis) qui en se dédoublant, d'une part forme deux faisceaux obliques de microtubules qui s'engagent dans le noyau sans rupture de l'enveloppe nucléaire, et d'autre part est à l'origine de microtubules reliant les centres cinétiques et favorisant vraisemblablement leur éloignement. On pourrait dans ce cas parler d'un "fuseau initial" continu voisin de celui décrit chez Eimeria necatrix par DUBREMETZ (1973).

L'angle formé entre les deux hémifuseaux s'ouvre de plus en plus provoquant au niveau nucléaire une répartition périphérique de la chromatine (Figs. 13-16). Puis l'enveloppe nucléaire se rompt à chaque invagination, mettant en contact direct les microtubules et le nucléoplasme (Fig. 13). C'est ainsi que se met progressivement en place le fuseau de division.

2°) La métaphase

Le passage en métaphase typique doit être très rapide, et de ce fait les images observées montrent presque toujours des débuts d'anaphase. Il semble cependant possible, par l'étude des coupes sériées de supposer ce qui se passe antérieurement. Dans le cas de la mitose classique (orthomitose), c'est avant la mise en plaque métaphasique que les chromosomes se mettent en relation avec les pôles du fuseau par l'intermédiaire des microtubules cinétochoriens. Les cinétochores, qui pourraient chez Diplauxis déjà être différenciés en fin de prophase (Fig. 25), sont reliés aux centres cinétiques par des microtubules cinétochoriens dont la formation n'a pu être suivie mais qui apparaissent nettement indépendants du reste du fuseau achromatique. Ce dernier est constitué par un groupe de trente à quarante microtubules classiques, d'un diamètre de 20 nm et parfaitement continus d'un pôle à l'autre du fuseau (Fig. 23 et démontré par l'étude en coupes sériées). Ce dernier passe au centre du matériel chromosomique réparti en anneau et accolé extérieurement à l'enveloppe nucléaire (Fig. 22).

Les cinétochores sont la plupart du temps visibles sur les micrographies et apparaissent généralement sous l'aspect d'une masse dense qui se différencie nettement du reste du chromosome (Figs. 20.24.30.35.36). Sur d'autres images par contre (Figs. 19.21), il est possible de définir plusieurs couches superposées dans le cinétochore. Ainsi, sur la Fig. 19, il apparaît constitué de trois couches denses séparant deux bandes plus claires. Chaque couche sombre a une épaisseur d'environ 15 nm sur une largeur de 90 nm et présente une sous-structure vésiculaire (Figs. 19.21.24). De plus, les bandes constitutives du cinétochore sont légèrement incurvées. A la métaphase, le fuseau de division progamique (Fig. 20) ou métagamique (Fig. 32) est constitué par un nombre relativement restreint de microtubules continus, et de plusieurs faisceaux divergents de microtubules cinétochoriens reliant les futurs chromosomes fils aux deux centres cinétiques opposés.

L'étude de coupes transversales de fuseaux permet dans les cas favorables d'observer 5 cinétochores, aussi bien dans la division progamique (Fig. 26) que dans la division métagamique (Figs. 27.28.29). De même, la plupart des coupes transversales d'anaphases montrent la répartition périphérique du matériel chromatique, assez étroitement associé à l'enveloppe nucléaire et entourant le fuseau achromatique continu.

3°) La montée anaphasique des chromosomes

La plupart des images d'anaphase (Figs. 21.31.33.34.35.36) montrent un noyau encore nettement fusiforme qui peut faire penser à des stades de métaphase si l'on se réfère aux divisions classiques. En fait, l'éloignement des cinétochores montre que la séparation des chromosomes fils est en cours (Figs. 21.31.33). Cette séparation est déjà bien avancée quand le noyau commence à prendre une forme de navette (Figs. 34.35.36). Dans certains cas, les chromosomes occupent une position anormale démontrée par la localisation parfois inversée des cinétochores (Figs. 35.36).

Jusqu'au stade de navette, du point de vue des microtubules, on assiste à un allongement relativement faible des microtubules continus, alors que le raccourcissement des microtubules cinétochoriens est très net. Les cinétochores se trouvent alors à proximité des centres cinétiques opposés.

A partir de ce moment commence à apparaître un étranglement équatorial du noyau qui prend une forme d'haltère (Figs. 38.39). Les deux lots de chromosomes fils sont alors nettement séparés. L'étranglement médian du noyau semble être consécutif à un allongement important des microtubules continus. L'extension de ceux-ci peut être très importante jusqu'à atteindre six fois la largeur des noyaux fils dans le cas de la division progamique (Figs. 42.43). Pour la division sporogonique, l'allongement du fuseau continu est limité par la paroi rigide du sporoblaste, mais atteint cependant trois à quatre fois la largeur des noyaux (Figs. 44.45).

En fin d'anaphase, le matériel chromatique est regroupé dans l'enveloppe nucléaire toujours présente, les cinétochores sont alors très proches des centres cinétiques (Fig. 38.44). Le faisceau de microtubules continus reste engainé par un complexe bimembranaire souvent discontinu et provenant de l'enveloppe nucléaire. Par endroits cependant, le manchon membranaire présente un aspect analogue à celui du Reticulum endoplasmique (Fig. 40) avec présence de ribosomes.

Il est donc possible que la formation du manchon requiert la participation du réticulum endoplasmique, mais également que ce soit l'enveloppe nucléaire qui reprenne un aspect de Réticulum. Il ne semble pas en effet qu'il y ait une forte augmentation de la surface totale des noyaux, car chaque division s'accompagne d'une réduction de taille de ceux-ci.

4°) La télophase et le devenir des centres cinétiques

A la télophase, on assiste à la disparition progressive du manchon membranaire qui repasse sous la forme ergastoplasmique, et à une dépolymérisation des microtubules fusoriaux. Les ouvertures de l'enveloppe nucléaire face aux centres cinétiques se referment, et le devenir de ces centres est variable selon la phase du cycle biologique du parasite.

Dans la plupart des cas, les centres cinétiques se dédoublent pour amorcer une nouvelle division (Fig. 12). Par contre, dans le gamonte, après la dernière division progamique, les noyaux fils issus de celle-ci vont participer à l'élaboration des gamètes. Dans ce cas, le centre cinétique sera à l'origine des microtubules du flagelle (Fig. 46 et 48) (voir Chapitre GAMETOGENESE).

Si l'on considère la dernière division sporogonique, qui précède l'individualisation des sporozoïtes, le centre cinétique garde une position identique à celle prise lors de la caryocinèse (Figs. 2.3.4). Dans ce cas, le rôle du centre cinétique sera toujours la synthèse de microtubules qui deviendront les microtubules sous-pelliculaires (voir chapitre SPOROGENESE).

DISCUSSION

La mitose, processus biologique commun à tous les groupes animaux et végétaux présente de nombreuses variations bien que le mécanisme général soit le même pour tous puisqu'il aboutit à la formation et à la séparation de deux génomes fils absolument identiques à celui de la cellule mère dont ils sont issus.

Considérant plus ponctuellement les Protistes, qui se caractérisent essentiellement par la persistance de l'enveloppe nucléaire au cours de la mitose, on retrouve une grande variabilité dans les mécanismes mitotiques, et il sera intéressant de discuter certains points qui nous semblent importants : les centres cinétiques et leur rôle dans la formation du fuseau de division, les cinétochores et les chromosomes, le rôle des microtubules dans la séparation des chromosomes à l'anaphase.

1°) Les centres cinétiques et l'initiation du fuseau achromatique

Le "centre cinétique" selon la terminologie de HOLLANDE (1972), terme actuellement utilisé par de nombreux auteurs (FEBVRE, 1977), peut être considéré d'un point de vue général comme l'inducteur de la division nucléaire et plus précisément responsable de la genèse des microtubules comme cela a été montré de nombreuses fois dans le cas de mitoses animales polarisées par des centrioles (MC GILL et BRINKLEY - SNYDER et MC INTOSH - WEISENBER et ROSENFELD (1975), GOULD et BORISY - TELZER et ROSENBAUM (1977), BYERS et coll. - GOULD et BORISY (1978), PEPPER et BRINKLEY - RAFF - TELZER et ROSENBAUM (1979) BERGEN et coll. (1980)).

Suivant le groupe auquel on s'adresse, le centre cinétique peut se présenter de différentes façons, mais dans tous les cas il est reconnu que c'est à partir de celui-ci, qu'il soit intra ou extranucléaire, pourvu ou dépourvu de centrioles, qu'est initié le fuseau de division (KUBAI, 1975).

Chez Diplauxis hatti, le centre cinétique est toujours extranucléaire, dépourvu de centrioles et associé à des structures membranaires (PRENSIER, 1972, 1973, 1975). Chez les autres Grégarines dont la division pro-gamique a été décrite (DESSPORTES, 1970 et BESSE, 1975), le centre cinétique paraît plus structuré, mais ses relations avec un système membranaire ne sont pas précisées bien que sur certaines images on puisse soupçonner leur existence.

Dans l'espèce étudiée ici, on peut supposer que les lames de réticulum endoplasmique associées aux centres cinétiques jouent un rôle dans leur éloignement, au moins dans le cas de la division progamique (la cisterne de réticulum est dans ce cas continue d'un centre à l'autre). Ceci est à rapprocher de ce qui a été décrit dans certaines divisions où les centres cinétiques sont fixés directement sur l'enveloppe nucléaire (MC KULLY et ROBINOW (1971) et FEBVRE (1977) ^{ou} et leur éloignement ^{est} provoqué par une synthèse membranaire localisée.

Dans le cas de la division métagamique, il est plus difficile de considérer cette hypothèse, les centres cinétiques étant toujours liés à des membranes du réticulum endoplasmique mais qui ne sont pas continues d'un centre cinétique à l'autre. Il faut donc envisager l'intervention d'un autre mécanisme qui met en jeu les microtubules reliant les deux centres cinétiques, ceci au moins au début de la mitose. Ces quelques microtubules se retrouvent chez d'autres espèces et correspondraient au "fuseau initial" décrit par DUBREMETZ (1973) et d'autres auteurs (HAMMOND et coll. (1969)- SNIGIREVSKAYA (1969 a et b) et ROBERTS et coll. (1970)) chez les Coccidies.

Le centre cinétique est sur notre matériel uniquement constitué par une accumulation de matériel finement granulaire, et l'on en retrouve des homologues dans de nombreuses espèces avec toutefois des appellations différentes telles que mixoplasme (AIKAWA, 1966, 1971), morphoplasme (HOLLANDE et VALENTIN, 1967), ou matrices nématopoiétiques selon FAURE-FREMIET, 1970 et que ^{les} anglo-saxons nomment souvent M. T. O. C. (Microtubule organising Centers) (PICKETT-HEAPS, 1969, 1975, SAKAI et SHIGENAGA, 1972, COSS et PICKETT HEAPS, 1973). Actuellement, les auteurs utilisent les termes de "centre cinétique" ou "spindle pole bodies" (S.P.B) (AIST et WILLIAMS, 1972) qui semblent mieux s'appliquer au rôle dévolu à ces zones particulières. Dans tous les cas, la mitose ne serait pas forcément polarisée par les centrioles et MAZIA (1964), PICKETT-HEAPS (1969), FULTON (1971) et HOLLANDE (1972) entre autres, supposent qu'il existe une "entité physicochimique responsable de l'induction de la division", qui correspondrait aux différentes structures énoncées précédemment. Le rôle des centrioles pourrait n'être que secondaire et chez Diplauxis ne jouerait même pas le rôle d'inducteur des formations flagellaires comme le soutiennent certains auteurs (PICKETT-HEAPS, 1969, 1971 - LUYX, 1970 et FUGE, 1974).

Il est remarquable cependant de constater sur notre matériel que le centre cinétique, en fonction du stade évolutif du parasite peut participer à la synthèse de microtubules ayant des rôles totalement différents (microtubules mitotiques, flagellaires ou sous-pelliculaires) ce qui apporte des données complémentaires quant à l'homogénéité de structure des microtubules.

2°) Les cinétochores et les chromosomes

En raison des nombreuses difficultés rencontrées lors de la préparation du matériel, les auteurs qui ont étudié la mitose grégarinienne apportent assez peu de renseignements précis sur la structure du cinétochore. DESPORTES (1970) y décrit une alternance de strates sombres et claires, et BESSE (1975), parle d'une structure pentalaminée assez mal définie. Les meilleures images chez Diplauxis, montrent une structure bien différenciée du cinétochore (Fig. 19.21.24.34). Celui-ci apparaît constitué de deux strates sombres courbes à sous-structure vésiculaire et rattaché au chromosome par une zone effilée de celui-ci.

A la liaison cinétochore-chromosome existe une bande un peu plus dense qui peut faire penser à l'existence d'une troisième strate, et qui donne à l'ensemble du cinétochore un aspect pentalaminé.

Malgré tout, la structure du cinétochore semble assez homogène chez les Grégarines malgré le peu de données précises, et ne diffère pas notablement de la structure trilaminée classiquement décrite (JOKELAINEN, 1967 - ROOS, 1973 et voir ALOV et LYUBSKII, 1977). De même DUBREMETZ (1973) montre chez la Coccidie Eimeria necatrix des cinétochores trilaminés d'une taille de 70 nm x 30 nm (90 nm x 30 nm chez Diplauxis) nettement inférieure cependant à celle trouvée chez la plupart des animaux et végétaux (voir ALOV et LYUBSKII, 1977).

Les cinétochores sont reliés aux pôles du fuseau par les microtubules cinétochoriens (Fig. 24) et la reconstitution de figures de métaphase et anaphase à partir de coupes sériées permet d'apprécier leur nombre à un peu moins d'une dizaine par cinétochore (6 à 8). Ils forment un faisceau légèrement divergent, et parfois les microtubules paraissent pénétrer dans le cinétochore. Parfois aussi, certains microtubules ne se fixent pas directement sur le cinétochore et pénètrent dans la chromatine sous-jacente.

Le rôle des cinétochores, auparavant assez mal défini (voir ALOV et LYUBSKII, 1977) se précise de plus en plus avec les travaux de MC GILL et BRINKLEY, 1975, TELZER et coll., 1975, 1977, GOULD et BORISY, 1978, et tout dernièrement la très belle démonstration de PEPPER et BRINKLEY, 1979, qui ont montré le rôle effectif du cinétochore dans la synthèse de microtubules. On peut donc considérer actuellement, comme cela avait d'ailleurs été largement supposé auparavant (ROTH et DANIELS, 1962, ALOV et LYUBSKII, 1977) que le cinétochore est bien le lieu de synthèse des microtubules cinétochoriens.

Si l'on considère ce qui se passe dans les divisions ouvertes avec persistance de l'enveloppe nucléaire, il est logique de penser que l'initiation de la synthèse des microtubules cinétochoriens s'effectue au moment de la rupture de l'enveloppe nucléaire, provoquée par la poussée des microtubules issus des centres cinétiques. Les cinétochores sont vraisemblablement déjà présents à la prophase (Fig. 25) constatation faite également par d'autres auteurs (BRINKLEY et STUBBELFIELD (1970), BAJER (1973) et ROOS (1973)) et l'initiation de la synthèse des microtubules cinétochoriens nécessiterait donc un contact direct entre les éléments constitutifs des microtubules et les cinétochores (voir PEPPER et BRINKLEY, 1979).

Cette explication est valable dans le cas où il se produit une disparition de l'enveloppe nucléaire ou formation d'ouvertures du type "polar fenestrae" (JOHNSON et PORTER, 1968), mais dans le cas des fuseaux intranucléaires, il est moins aisé d'imaginer un contact direct, bien qu'en fin de prophase on assiste souvent à une variation de l'abondance et de la répartition des pores nucléaires (TUCKER, 1967, JOHNSON et PORTER, 1968 et FEBVRE, 1977).

En ce qui concerne les chromosomes, ils gardent toujours un contact intime avec l'enveloppe nucléaire qui semble parfois les mouler étroitement (Fig. 30). Dès l'apparition des invaginations provoquées par les poussées microtubulaires, la chromatine prend une disposition annulaire, qu'elle garde pratiquement jusque la fin de l'anaphase. Le développement du fuseau; lié à la persistance de l'enveloppe nucléaire faciliterait en particulier la formation de la plaque métaphasique. De même KRISHAN et BUCK (1965) ont insisté sur le rôle joué par les microtubules dans les déformations de l'enveloppe nucléaire, et BAJER et MOLE BAJER (1969) ont mis en évidence les rapports étroits qui s'établissent entre les fibres fusoriales et la limite du noyau à la prophase.

La relation chromosome-enveloppe nucléaire atteint son maximum chez une autre Grégarine (DESSPORTES, 1970) et dans ce cas chaque chromosome est limité par des fragments de l'enveloppe du noyau. Ce phénomène existe à un degré moindre dans d'autres groupes (MURRAY et coll., 1965, HARRIS, 1965 et BAJER et MOLE-BAJER, 1969).

3°) Le rôle des microtubules dans la séparation des génomes

Considérant les données énoncées précédemment et compte tenu du nombre relativement important d'informations récentes concernant la mécanique mitotique (voir NIKLAS, 1975, MC GILL et BRINKLEY, 1975, TELZER et coll. 1975, 1977, GOULD et BORISY, 1977, PEPER et BRINKLEY, 1979 et BEGG et ELLIS, 1979 a et b entre autres) il nous est possible d'apporter des éléments complémentaires dans l'interprétation du mécanisme de la mitose chez Diplauxis. Bien que considérant uniquement l'aspect morphologique, l'étude en coupes sériées (réalisée par d'autres auteurs (OAKLEY et HEATH, 1978 et MC DONALD et coll., 1979) permet d'étayer certaines théories. De plus, l'intérêt de cette étude réside en grande partie dans le fait que la division chez les Sporozoaires est encore très mal connue. Il faut signaler cependant que HOLLANDE dès 1972 avait eu le mérite de clarifier énormément les différents mécanismes de la division chez les Protozoaires en les regroupant en un seul grand type, la cryptomitose (persistance de l'enveloppe nucléaire) par opposition à l'orthomitose. C'est HOLLANDE également qui l'un des premiers a préféré le terme de "centre cinétique", à ceux de centrosome, centrioles, diplosomes, car ces structures n'existent pas toujours.

Suivant la nouvelle nomenclature de HOLLANDE, la division chez Diplauxis est de type orthomitotique, avec formation d'une plaque métaphasique et persistance de l'enveloppe nucléaire et correspond donc à une cryptorthomitose, bien que la division débute comme une cryptomitose à hémifuseaux.

Si l'on se réfère maintenant aux différentes phases de la mitose étudiée ici, deux éléments essentiels en ressortent :

1°) Il existe un fuseau de fibres continues d'un pôle à l'autre visible sur certaines images, et démontré parfaitement par la reconstitution tridimensionnelle à partir de coupes sériées. Ces microtubules sont souvent arqués et leur nombre varie de 20 à 40 environ suivant la mitose considérée. Leur longueur est très variable entre la métaphase et la fin d'anaphase

(ils passent de 1 μm à 6 à 7 μm à la mitose progamique et de 1 μm à 3 à 4 μm à la mitose métagamique.

2°) On peut mettre en évidence un certain nombre de faisceaux de microtubules cinétochoriens, légèrement divergents et constitués d'une petite dizaine de microtubules. Chacun de ces groupes est nettement séparé du fuseau continu à la métaphase et, au début de l'anaphase, une zone d'intrication est visible au niveau des pôles.

Au cours de l'anaphase, les microtubules cinétochoriens qui se raccourcissent s'intègrent peu à peu au faisceau continu.

Actuellement, trois grands courants tentent d'expliquer le mécanisme de séparation des chromosomes à l'anaphase, le "sliding-filament model" (NICKLAS, 1971, MC INTOSH et coll., 1969, 1975) le "zipper mechanism" (BAJER, 1973) et le système faisant intervenir des forces produites par la polymérisation-dépolymérisation des microtubules. C'est OSTERGREN (1949) qui fut le premier à suggérer que la fibre chromosomique "is in a dynamic equilibrium with the rest of the spindle". L'idée fut reprise plus tard et expérimentée par de nombreux auteurs (voir DIETZ, 1969, 1972, STEPHENS, 1972, FUSELER, 1975, SALMON, 1975^{et} INOUE, 1976).

Chez Diplauxis, la disposition relative des microtubules cinétochoriens et non cinétochoriens et leur variation de longueur au cours de l'ascension polaire des chromosomes confirment cette hypothèse. La séparation des chromosomes fils à l'anaphase semble en effet résulter d'un net raccourcissement des fibres cinétochoriennes, qui précède l'allongement des fibres continues. Ceci est à rapprocher des observations de INOUE et RITTER, 1975 qui subdivisent l'anaphase, en anaphase A (raccourcissement des fibres chromosomiques) et anaphase B (allongement du fuseau continu).

Il ne semble pas exister dans le fuseau de zone médiane où les microtubules se chevauchent, ce qui pourrait faire penser à l'intervention d'un mécanisme de glissement par formation de ponts entre microtubules (MC DONALD et coll., 1977 et OAKLEY et HEATH, 1978). Le faible nombre de microtubules fusoriaux et leur longueur peu importante du fait de la taille réduite des noyaux ^{peuvent} en être la cause.

Cependant, la seule variation de longueur des deux types de microtubules, par dépolymérisation-polymérisation ne peut à notre sens expliquer de façon valable l'ascension polaire des chromosomes. Il nous semble logique de supposer une relation entre le fuseau continu et les différents faisceaux de microtubules cinétochoriens, suivant le mécanisme proposé par

BAJER (1973). Ce modèle peut en effet s'appliquer à la mitose de Diplauxis car on remarque qu' au fur et à mesure du raccourcissement des microtubules cinétochoriens, ceux-ci s'intègrent progressivement au fuseau continu, et il existe toujours une zone proche des pôles où les deux types de microtubules sont imbriqués les uns dans les autres. Toutefois, l'observation de liaisons directes entre microtubules cinétochoriens et non cinétochoriens, qui pourraient assurer une force de cohésion aux pôles du fuseau, n'a jamais été faite de façon démonstrative sur notre matériel.

CHAPITRE II

LA GAMETOGENESE

I - LES PHENOMENES QUI ACCOMPAGNENT LE DECOUPAGE CYTOPLASMIQUE

La gamétogenèse chez les Grégarines s'accompagne de profondes modifications ultrastructurales qui intéressent plusieurs zones de la syzygie. L'un des premiers aspects consiste en la formation d'une paroi complexe qui s'élabore au fur et à mesure du déroulement de la gamétogenèse, et qui acquiert sa structure définitive à la sporogenèse.

Un autre point qui mérite l'attention est le découpage particulier du cytoplasme lors de la formation des gamètes, où interviennent de profonds remaniements membranaires.

Le troisième aspect intéresse les noyaux et surtout les centres cinétiques dont la structure et le rôle dans la division progamique ont été décrits et discutés dans le chapitre précédent.

1°) Formation et évolution de la paroi kystique

Comme tous les Sporozoaires (VIVIER et coll., 1970), la Grégarine Diplauxis hatti au stade végétatif est limitée par une paroi complexe constituée de trois membranes superposées. Le complexe membranaire des trophozoïtes présente de très nombreuses évaginations en doigt de gant, du type microvillosités (VIVIER et PETITPREZ, 1968 et VIVIER, PETITPREZ et PRENSIER, 1969). Le cytoplasme contient, en dehors des inclusions classiques des Sporozoaires (globules lipidiques et grains d'amylopectine) un type de sécrétions particulier, constitué par des globules sphériques volumineux (diamètre variant entre 0,5 μ m et 1 μ m) au contenu très dense plus ou moins hétérogène, limités par une membrane nettement décollée de l'inclusion elle-même (PRENSIER, 1971). Ce type de granule, très abondant à la périphérie des jeunes gamontes (Figs. 51-52) disparaît rapidement au cours de la genèse de la paroi kystique et participe très vraisemblablement à l'élaboration d'une couche anhyste qui apparaît

La paroi du gamétokyste n'est pas représentée.

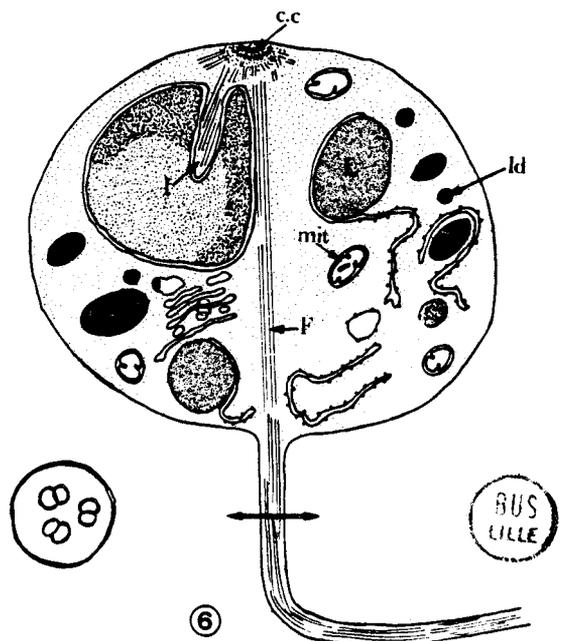
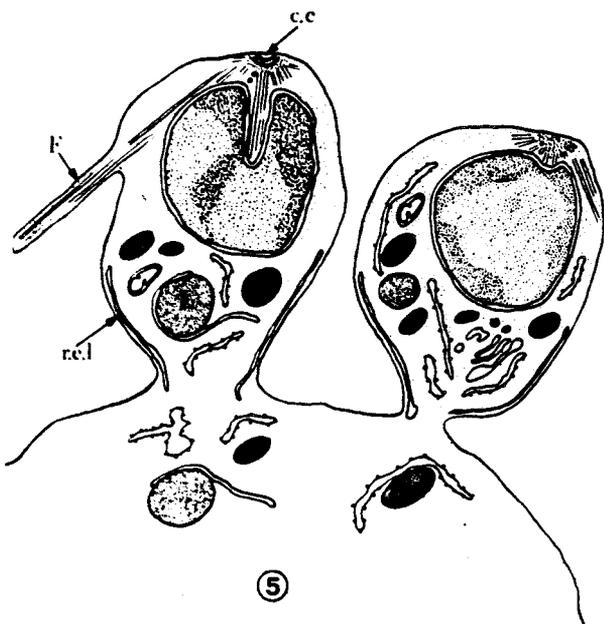
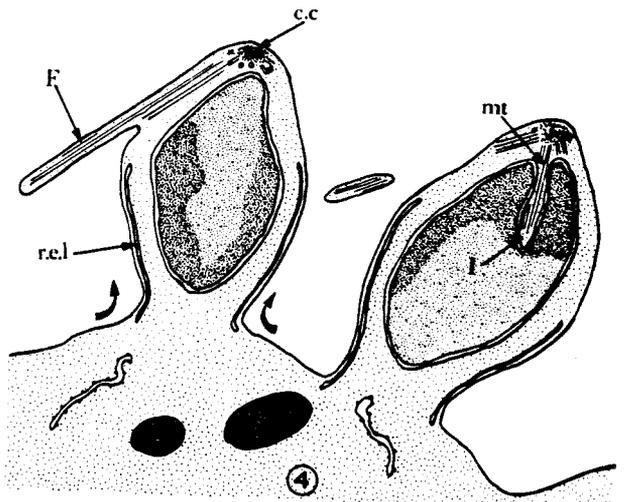
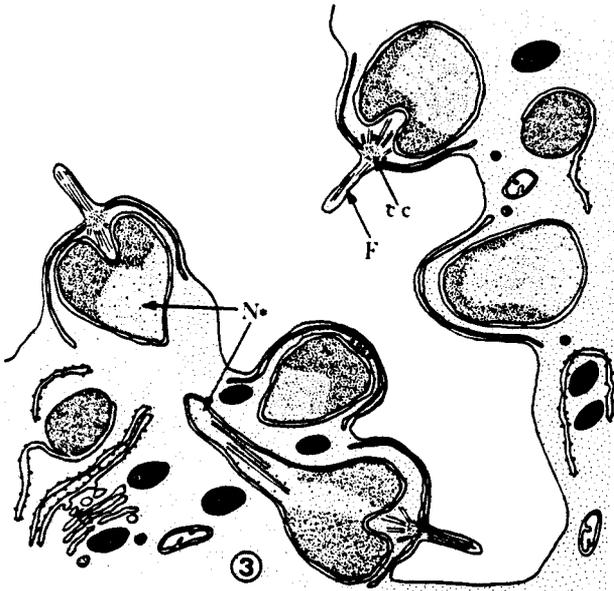
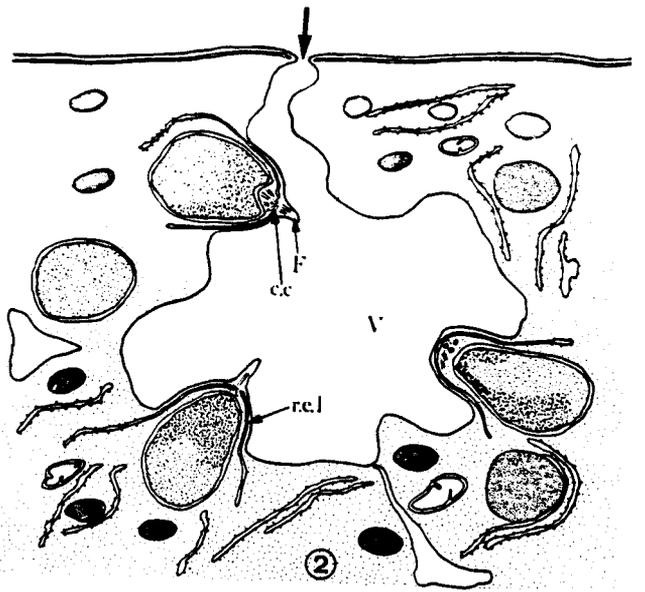
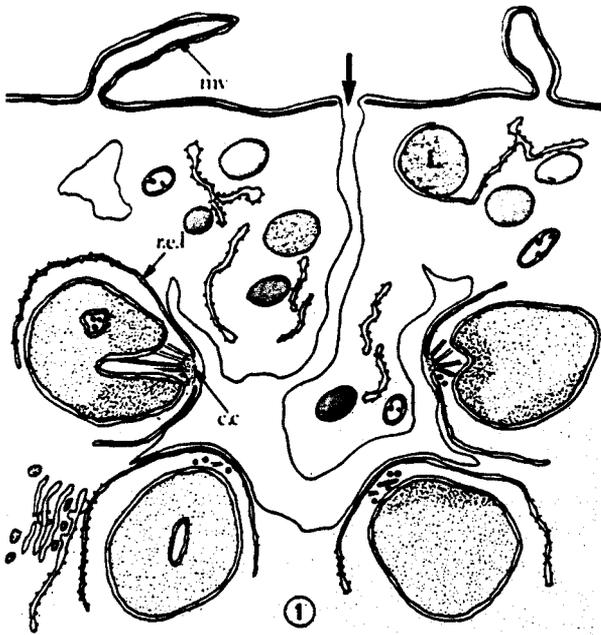
- 1 - Le cytoplasme des gamontes se creuse de larges vacuoles qui résultent de l'invagination de la membrane plasmique (flèche). Les noyaux pro-gamiques se divisent sur le pourtour des vacuoles.
- 2 - A la dernière division, les vacuoles (v) sont très larges. Les microvillosités épicytaires ont complètement disparu. A partir des centres cinétiques (c.c.) se synthétisent des microtubules en direction opposée à celle du noyau, qui constituent l'ébauche du flagelle (F).
- 3 - Stade équivalent au dessin 2 qui montre que l'ébauche du flagelle (F) se forme alors que les noyaux fils (N) ne sont pas encore complètement séparés. Le perlage a débuté et les noyaux provoquent des boursouflures périphériques des travées cytoplasmiques.

On remarque qu'il existe toujours un complexe trimembranaire au niveau de la zone d'évagination

G = Golgi

- 4 - Phase plus évoluée du perlage. Tout le noyau est englobé dans la zone cytoplasmique évaginée et le flagelle (F) en cours d'allongement s'incline vers l'arrière. Un groupe de microtubules (mt) issus du centre cinétique (c.c.) provoque une invagination (I) de l'enveloppe nucléaire. Les lames de réticulum endoplasmique (r. e. l.) ne suivent pas l'évagination de la membrane plasmique et forment un manchon au niveau de la zone de rattachement (flèches).
 - 5 - Les gamètes mâles sont en cours d'incorporation du cytoplasme des travées. Le flagelle s'intègre peu à peu au corps du gamète en s'inclinant de plus en plus. Les saccules de réticulum (r. e. l.) sont encore présents.
 - 6 - Gamète mâle mûr libre. Du centre cinétique antérieur (c.c.) partent deux poussées microtubulaires dont l'une constitue le flagelle, (il présente trois doublets de tubules en coupe transversale) et l'autre provoque une invagination (I) de l'enveloppe nucléaire (système d'ancrage). Les inclusions cytoplasmiques sont classiques ; Amylopectine (Am) - globules lipidiques et inclusions denses (I. d).
- On note la présence d'un dictyosome (G) et de mitochondries (mit.) assez nombreuses.

Rem : La gamétogénèse femelle se déroule de la même façon sauf qu'il n'y a pas de poussée flagellaire.



tout d'abord à la limite externe des microvillosités (Fig. 51). Ce dépôt de substances rejetées par les jeunes gamontes se structure et forme une lame continue ($m-k_1$, Fig. 53) sur tout le pourtour du parasite, vers l'intérieur de la couche anhyste. Cette dernière, qui recouvre la première membrane kystique (mk_1) est formée de matériel finement granulaire et fibrillaire présentant en outre de petites vésicules. On assiste au cours de la formation de la paroi kystique à une structuration de la couche anhyste qui acquiert un aspect orienté, parallèlement à la première membrane kystique. En même temps, l'agencement des microvillosités se perturbe fortement (Fig. 54.55) et progressivement, les expansions disparaissent. Ce phénomène important est à mettre en relation avec le découpage cytoplasmique au cours de la genèse des gamètes (voir paragraphe suivant).

Quand les divisions progamiques sont sur le point de s'achever, le complexe trimembranaire délimitant encore les gamontes (Fig. 54) se modifie fortement et apparaît sous forme de membranes discontinues (Fig. 55) qui sont appelées à disparaître complètement au cours du perlage des gamètes (Fig. 56). La couche anhyste se structure davantage pour prendre un aspect nettement fibrillaire. En même temps elle s'épaissit (Fig. 57).

Vers la fin du perlage, le complexe trimembranaire des trophozoïtes a disparu complètement, la première membrane kystique devenant la première limite de la paroi (Fig. 56). En même temps, la limite externe de la couche anhyste s'est structurée en une deuxième membrane kystique (mk_2), plus mince et moins régulière que la première. On aboutit alors à la structure définitive de la paroi kystique présente chez le sporokyste (Fig. 57).

Comme la formation de la paroi des sporocystes relève d'un processus voisin de celui de la genèse de la paroi kystique, nous ne ferons qu'une discussion concernant les deux phénomènes (voir chapitre III).

2°) Le découpage cytoplasmique au cours des divisions progamiques et de l'individualisation des gamètes

a - Origine et évolution des membranes des gamètes

Une attention toute particulière doit être accordée au mécanisme d'individualisation des gamètes, surtout en ce qui concerne l'origine de leur membrane plasmique.

Lors des premières divisions progamiques, le cytoplasme des gamontes est relativement pauvre en réticulum endoplasmique et en dictyosomes (Fig. 52). Au fur et à mesure que les divisions s'effectuent, le cytoplasme s'enrichit en structures membranaires de différents types.

Les dictyosomes deviennent beaucoup plus abondants, généralement situés à proximité des noyaux progamiques (Fig. 58). Leur nombre semble croître parallèlement à celui des noyaux.

De même, on assiste à une nette hypertrophie du Réticulum endoplasmique granulaire, regroupé en zones compactes (Figs. 58-60) elles aussi situées à proximité des noyaux en division.

Un troisième groupe de membranes apparaît dans le cytoplasme des jeunes gamontes. Ces membranes, dépourvues de ribosomes, forment une sorte de réseau lamellaire présent dans toutes les zones des gamontes (Fig. 62). Ce réseau membranaire, de plus en plus important au cours de l'évolution de la gamétogenèse, se dilate en certains endroits pour former de larges vacuoles autour desquelles sont disposés les noyaux (Fig. 60). L'importance de ces systèmes membranaires dans la division progamique a été détaillée dans le chapitre précédent, et nous nous limiterons ici à décrire leur rôle dans le découpage cytoplasmique ainsi que leur origine.

On peut considérer que ces membranes ont un rôle double. Elles interviennent dans la formation de la membrane plasmique des gamètes, et associées étroitement à des cisternes du réticulum endoplasmique lisse (Fig. 62), elles servent de support aux centres cinétiques qui polarisent la division (Fig. 63-64).

Le système membranaire vacuolaire, doublé en de nombreux endroits par du Réticulum endoplasmique lisse typique forme un réseau fortement ramifié, qui dirige les divisions nucléaires et préfigure le découpage cytoplasmique au cours de la formation des gamètes (Fig. 66-67).

Si on observe maintenant ce qui se passe à la périphérie des gamontes, on remarque l'existence de communications très nettes entre la membrane externe de la paroi trimembranaire encore présente (membrane plasmique proprement dite) et le réseau de membranes vacuolaires (Fig. 59). Cette constatation nous amène à penser que le découpage cytoplasmique en vue de l'élaboration des gamètes s'effectue avec une participation très importante de la membrane plasmique des gamontes (Fig. 66-67). Ceci est confirmé par un deuxièm

fait; la disparition progressive des microvillosités de l'épicyte, corrélative à une vacuolisation du cytoplasme plus nette et une augmentation du nombre de noyaux progamiques (Fig. 58). Ce processus particulier laisse supposer une synthèse de membrane relativement restreinte, puisque c'est la membrane plasmique des gamontes qui fournit en grande majorité les membranes plasmiques des gamètes.

Le phénomène d'invagination de membranes périphériques semble débiter très tôt, dès les premières divisions progamiques (Fig. 59), et d'ailleurs, sur de jeunes stades végétatifs on note déjà l'existence d'invaginations digitiformes qui s'enfoncent assez profondément dans le cytoplasme (PRENSIER, 1971). La vacuolisation des gamontes s'accroît au moment du perlage proprement dit des gamètes, et les gamontes sont découpés en tranches cytoplasmiques, présentant des noyaux périphériques qui commencent à perler (Fig. 68-69).

Au cours de cette phase de formation des gamètes, l'activité golgienne paraît moins importante, par contre celle du réticulum endoplasmique granulaire devient quant à elle prédominante (Fig. 68).

En remarque, on peut signaler que chez Diplauxis, l'aspect des gamontes mâles et femelle est absolument identique, à un stade intermédiaire d'évolution (Fig. 70) et on ne peut les différencier (G_1 G_2). La limite entre les deux gamontes est constituée par une double membrane fortement contournée qui n'est pas en continuité directe avec le complexe membranaire périphérique. La zone de séparation apparaît donc très lâche et est appelée à se résorber rapidement au cours de la gamétogenèse.

b - Les noyaux et les centres cinétiques au cours de la gamétogenèse

Au cours des divisions successives, les noyaux progamiques diminuent rapidement de taille. De 5μ m au début de la gamétogenèse (Fig. 51-52), ils passent à $2-3\mu$ m au stade intermédiaire, pour atteindre lors des dernières divisions leur diamètre définitif d'environ 1μ m. La réduction du volume nucléaire s'accompagne d'une condensation de la chromatine qui devient plus distincte. Elle est située en position périphérique, à proximité des pôles de division et les nucléoles sont toujours absents (Fig. 63-64).

Considérant la taille des noyaux, la quantité de matériel génétique est peu abondante.

Quelques aspects sont remarquables au cours de l'évolution de la gamétogenèse.

Après quelques divisions, les noyaux de taille inégale, sont souvent entourés par des cisternes du Réticulum endoplasmique (Fig. 51-52). Les centres cinétiques paraissent alors diffus (Fig. 14). Puis les noyaux issus des divisions ultérieures vont être un peu à la fois doublés au moins à un de leur pôle par les membranes provenant de l'invagination de la membrane plasmique des gamontes (Fig. 62). A ce stade, les centres cinétiques sont bien apparents, et présentent une structure particulière. Ils sont constitués de densifications disposées selon une certaine périodicité (Fig. 63-64) bien visible en coupe tangentielle (Fig. 65). Cette structure périodique se retrouve entre les deux centres cinétiques en cours de séparation (Fig. 64) et cet aspect est peut-être le signe d'un début de structuration de microtubules, ou alors d'une organisation particulière des molécules précurseurs des microtubules. A ce stade de séparation des centres cinétiques, les microtubules ne sont pas visibles.

Signalons cependant que sur les autres stades de la gamétogenèse, il n'a jamais été observé cette périodicité de structure des centres cinétiques, qui semble être le fait d'une phase bien particulière de la gamétogenèse.

Au cours des mitoses successives, le nombre de pores nucléaires semble augmenter fortement, plus particulièrement au cours de l'extension du système vacuolaire (Fig. 61).

3°) L'individualisation des gamètes

a) Perlage des gamètes mâles et femelles

A la dernière division progamique, les gamontes fortement vacuolisés apparaissent en microscopie optique constitués de nombreux amas muriformes, à la périphérie desquels perlent les gamètes (Fig. h-i). Le processus d'individualisation des éléments sexuels est identique dans les deux gamontes, la seule différence étant l'apparition des flagelles chez les gamètes mâles.

En microscopie électronique, l'aspect particulier du découpage cytoplasmique se retrouve, et sur les coupes ultrafines, on observe des masses cytoplasmiques plus ou moins indépendantes les unes des autres, sur le pourtour desquelles sont disposés les noyaux qui terminent leur dernière division (Fig. 71-72). Chaque noyau se trouve orienté de façon précise, l'ancien pôle de division en direction de la lumière des vacuoles. On peut encore observer les vestiges du fuseau de division qui traversent les noyaux fils dans un tunnel médian de l'enveloppe nucléaire (Fig. 71). Parfois on devine le tunnel membranaire cytoplasmique qui relie les noyaux en télophase (Fig. 72) avant leur séparation complète (voir division). La limite des masses cytoplasmiques présente des boursouffures peu marquées, doublées intérieurement par des saccules de réticulum lisse très collapsés situés parallèlement à la membrane limitante externe. L'ancien pôle de division subsiste et présente l'aspect classique du centre cinétique, situé dans un pore de la lame bimembranaire interne.

Au cours de toutes les divisions progamiques, les poussées microtubulaires se font en direction du noyau, mais à la fin de la dernière mitose, dans le gamète mâle seulement, la synthèse de microtubules se fait en sens inverse. A partir de chaque centre cinétique se forme un groupe de microtubules, peu organisé, dont la poussée provoque une évagination de la membrane limitante des travées cytoplasmiques. Cette structure qui se met en place correspond à l'ébauche du flagelle (Fig. 72-73-74).

Dans le gamète femelle, la disposition des centres cinétiques est exactement semblable, mais dans ce cas il ne se forme pas de poussée flagellaire (Fig. 71).

Le perlage se poursuit, par augmentation des excroissances périphériques, dans lesquelles s'engagent les noyaux. L'ébauche du flagelle s'incline alors pour venir se disposer obliquement (Fig. 73-77). La lame bimembranaire (réticulum endoplasmique lisse) s'étend au cours de l'individualisation du gamète mâle (Fig. 73) et double toute la zone de membrane cytoplasmique évaginée.

Le noyau, sphérique au début du perlage s'ovalise alors que les gamètes s'individualisent, et il présente une cupule antérieure vers le centre cinétique. Approximativement à ce stade, un groupe de microtubules^{est} synthétisé en direction du noyau, provoquant une invagination de l'enveloppe nucléaire (Fig. 73-79). Simultanément, les flagelles s'inclinent fortement

vers l'arrière et leur point de départ est peu à peu incorporé dans le cytoplasme antérieur déjà évaginé (Figs. 75-77 a.b). La lame bimembranaire ne suit pas l'expansion de la membrane externe, et reste localisée, sous forme d'une couche cylindrique, vers l'arrière du gamète en cours de perlage (Fig. 75).

L'incorporation du flagelle dans le gamète s'accroît au cours de l'extrusion du noyau accompagné d'une petite portion du cytoplasme des travées (Figs. 77 a - b) qui présente encore très peu d'organites cytoplasmiques. Les gamètes en cours de perlage sont rattachés par une sorte de pédoncule aux masses cytoplasmiques, et sont cependant encore loin d'avoir atteint leur taille définitive.

La dernière phase de la gamétogénèse consiste en l'incorporation, dans le corps des éléments sexuels d'une quantité de cytoplasme assez importante, comprenant toutes les inclusions classiques des Sporozoaires (globules lipidiques, granules d'amylopectine, réticulum endoplasmique granulaire et mitochondries) (Figs. 78-79). Les dictyosomes quant à eux ne semblent pas être incorporés sous leur forme typique, subissant une différenciation avant la maturation des gamètes.

Les gamètes mâles et femelles présentent dans leur cytoplasme quelques inclusions de petite taille (environ $0,1 \mu\text{m}$ de diamètre), limitées par une membrane simple, et qui sont déjà présentes dans les gamontes. Ces granules pourraient provenir d'une activité golgienne, et servir après la fécondation (voir chapitre Fécondation).

A noter qu'au cours de la genèse des éléments sexuels, tout le cytoplasme des gamontes est utilisé et que donc il n'existe pas de reliquat cytoplasmique.

L'évolution du flagelle est intéressante à suivre. Comme nous l'avons signalé, la courte racine flagellaire présente très tôt, s'incline vers l'arrière, en même temps qu'elle s'allonge en venant s'incorporer au cytoplasme du futur gamète mâle.

Le flagelle se rabat de plus en plus, jusqu'à venir se coucher sur le noyau, qui présente parfois à ce niveau une légère dépression. (Fig. 78-79). La deuxième poussée microtubulaire vers le noyau est très nette sur la Fig. 79.

b- Le gamète mâle

Le gamète mâle mûr, de forme subsphérique, parfois légèrement piriforme a une taille de 3,5 à 4 μ m. Le noyau, excentré provoque souvent une légère protubérance qui donne au gamète son aspect piriforme (Fig. 88). Le flagelle prend naissance au centre cinétique, traverse toute l'épaisseur du cytoplasme (Fig. 80) en longeant en partie le noyau souvent déprimé à la zone de passage du flagelle (Fig. 89-90). Ce dernier ressort à l'antipode du centre cinétique (Fig. 80) et atteint sur le gamète mûr une longueur d'environ 12 à 15 μ m, d'après les observations effectuées sur le vivant.

La deuxième baguette microtubulaire, disposée obliquement par rapport au flagelle (l'angle formé entre les deux groupes de microtubules est d'environ 30°) (Fig. 81-82) s'enfonce profondément dans une invagination digitiforme de l'enveloppe nucléaire et assure en quelque sorte une zone d'ancrage au départ du flagelle qui favorise très vraisemblablement le mouvement du gamète mâle (Fig. 82).

En ce qui concerne le centre cinétique, bien que toujours situé à proximité de la membrane plasmique, il ne se trouve plus en association étroite avec des membranes du réticulum endoplasmique, mais semble acquérir une structure plus compacte, en forme de double croissant (Fig. 81-82). Suivant le plan de coupe, le centre cinétique présente une structure périodique, déjà signalée précédemment (Fig. 83).

La particularité essentielle du flagelle du gamète mâle de Diplauxis réside dans son ultrastructure. Observé en coupe transversale, il ne présente pas la structure énnéanème classique, avec 9 doublets périphériques et un doublet central. On ne peut en effet dénombrer que trois doublets périphériques, sans tubules centraux (Fig. 86). Cette structure est encore plus simplifiée que celle décrite par SCHREVEL et BESSE (1973-1975) chez Lecudina tuzetae dont le gamète mâle est muni d'un flagelle à 6 doublets périphériques. Dans les deux cas cependant, les flagelles sont parfaitement fonctionnels

La structure des doublets est analogue à celle des flagelles 9 + 2 et chaque tubule mesure respectivement 34 nm (sous tubule B) et 26 nm (sous tubule A). Si les doublets sont orientés avec les sous-tubules A se faisant face dans le sens des aiguilles d'une montre et que l'on construit un triangle avec les lignes coupant les deux tubules en leur milieu, l'un des

angles de ce triangle est toujours plus grand que les deux autres. Il a été possible sur plusieurs micrographies de mesurer correctement ces angles, et de ces calculs il en ressort les valeurs suivantes : le plus grand angle a une valeur de $72^{\circ} \pm 2^{\circ}$, et en considérant les deux autres dans le sens des aiguilles d'une montre, ils mesurent respectivement $52^{\circ} \pm 6^{\circ}$ et $56^{\circ} \pm 7^{\circ}$. Les deux doublets qui forment entre eux l'angle le plus important sont distants de $24 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$, et les distances qui séparent chacun de ces doublets du troisième sont de $20 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$.

Cette distance entre le sous tubule A et le sous tubule B de deux doublets adjacents est plus grande que celle calculée sur un flagelle $9 + 2$ (WARNER, 1974) qui est de $17,5 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$.

Dans les conditions actuelles de la fixation des flagelles, il n'est pas possible de mettre en évidence des structures du type bras de dynéine entre les doublets, mais on ne peut exclure leur existence. Des travaux en cours permettront peut-être de préciser davantage l'ultrastructure du flagelle du gamète mâle de Diplauxis. L'observation de colorations négatives confirme l'existence des trois doublets sur environ les 2/3 du flagelle (Fig. 91-92), doublets parfaitement visibles sur des flagelles dont la membrane limitante a disparu par suite d'un choc osmotique (Fig. 93). La résolution des préparations n'était pas suffisante pour déterminer la sous-structure des tubules flagellaires et donc savoir si l'on retrouve le même aspect que sur la plupart des microtubules (voir BEHNKE, 1974 et WARNER et MEZA, 1974).

En ce qui concerne le mouvement des gamètes mâles, il peut être observé facilement à travers la paroi kystique, mais pour l'étude photographique, il est nécessaire de craquer l'enveloppe du gamétokyste de façon à observer les gamètes libres dans l'eau de mer. Le mouvement des éléments sexuels mâles ne semble pas perturbé par rapport à celui qui les anime dans le kyste.

Le flagelle, qui sur des préparations de gamètes isolés peut s'arrêter ou se remettre à battre spontanément produit des courbures hélicoïdales (Fig. 87). qui se propagent depuis le corps du gamète jusque l'extrémité du flagelle, à une fréquence d'un peu moins de 2 Hertz. Souvent, l'extrémité du flagelle adhère au verre de la lame de montage et dans ce cas, il effectue un certain nombre de battements hélicoïdaux dans un sens, puis inverse son sens de battement quand il se remet en mouvement. Dans le kyste, le sens de battement est toujours le même, entraînant une rotation dextre du corps du gamète.

Parfois, l'observation en fond noir permet de remarquer qu'une oscillation de faible amplitude se surimpose à l'oscillation de base, et dont la fréquence apparaît être de deux à trois fois celle du battement normal. Il n'est pas possible cependant de voir si cette oscillation est fixe ou se déplace le long du flagelle.

Le mouvement d'ensemble du gamète mâle, bien visible sur des prises de vues cinématographiques est essentiellement une rotation sur lui-même, les mouvements de translation étant très peu importants. Au cours de l'accolement entre deux gamètes de sexes opposés, qui annonce la fécondation, le gamète mâle entraîne l'élément sexuel femelle dans son mouvement de rotation.

c - Le gamète femelle

D'un point de vue ultrastructural, le gamète femelle diffère très peu du gamète mâle, si ce n'est l'absence de flagelle (Fig. 94). Il faut d'ailleurs sur coupes ultrafines rechercher attentivement la présence ou l'absence de flagelle pour déterminer s'il s'agit d'un gamète mâle ou femelle. Sur le vivant, la détermination est beaucoup plus aisée, les gamètes femelles étant immobiles et d'un diamètre légèrement supérieur (4 à 4,5 μ m) à celui des éléments mâles.

Dans les gamètes femelles se retrouvent toutes les inclusions caractéristiques des trophozoïtes : globules lipidiques, grains d'amylopectine, et comme dans le gamète mâle quelques petits granules de densité électronique moyenne et limités par une membrane légèrement décollée (Fig. 95). Les mitochondries sont relativement nombreuses et le réticulum endoplasmique abondant. Ce dernier est souvent plus ou moins associé aux inclusions lipidiques (Fig. 95) mais également aux grains d'amylopectine.

Certaines zones de la membrane plasmique sont, comme chez le gamète mâle, doublées par des saccules fortement collapsés.

Le noyau, légèrement plus volumineux que celui du gamète mâle présente une chromatine peu dense, formant un réseau irrégulier,

le centre cinétique subsiste mais ne produit pas de poussée flagellaire

II - DISCUSSION

Deux points essentiels de discussion seront retenus dans la gamétogénèse. Ce sont, d'une part les membranes dans la genèse des gamètes, d'autre part la structure du gamète mâle et en particulier celle de son flagelle.

1°) Les membranes dans la genèse des gamètes

a - La membrane plasmique

D'après nos observations, nous pouvons admettre que la majeure partie des membranes plasmiques des gamètes dérivent de la membrane externe des gamontes. Ce processus d'invagination de la membrane plasmique du gamonte semble relativement courant chez les Sporozoaires, en particulier chez les Grégarines. Ainsi BESSE, 1975 le signale au cours de la gamétogénèse chez Lecudina tuzetae, à un moindre degré cependant, et elle suppose en outre une intervention des dictyosomes par apport de vésicules golgiennes. Ceci ne nous semble pas indispensable, et il est probable que le Golgi, en extension importante lors de la gamétogénèse joue un rôle autre (voir chapitre suivant). Chez Stylocephalus, (DESPORTES, 1970) le découpage cytoplasmique au cours du perlage des gamètes s'effectue vraisemblablement selon un processus analogue, bien que cet auteur ne le signale pas clairement.

Si on se réfère aux données de la microscopie optique (voir GRASSE, 1953), ce phénomène doit être général chez les Grégarines. Dans de nombreuses espèces, au cours de l'élaboration des gamètes, il subsiste un reliquat cytoplasmique important, les gamètes s'individualisant uniquement à la périphérie des gamontes. Cette constatation renforce notre conviction, en ce sens que le nombre de gamètes formés est fonction de la quantité de membranes plasmiques disponibles à la périphérie du gamonte, et indirectement donc de la complexité de la structure périphérique des trophozoïtes.

Chez les Coccidies, PORCHET-HENNERE décrit de belle façon un système identique pour la formation de la membrane externe des mérozoïtes au cours de la schizogonie chez un Globidium. Chez cette espèce, l'auteur décrit l'apparition de "schizontes unités" que déjà CHATTON en 1910 avait parfaitement étudiés et nommés "morulas". Chez Diplauxis, l'observation de la gamétogénèse en microscopie optique (Fig. h-i) montre un stade de "morulas" tout à fait identique à celui décrit par CHATTON.

Chez Globidium, l'apparition des "schizontes unités" résulte de profondes invaginations de la membrane plasmique du schizonte, ceci étant parfaitement démontré par la présence de micropores (structures uniquement superficielles) dans la profondeur du cytoplasme.

On aboutit chez Diplauxis au même résultat, un découpage du cytoplasme en de nombreuses masses subsphériques à la périphérie desquelles sont situés les noyaux. Tout le système vacuolaire intermédiaire forme un réseau continu, vide de toute inclusion.

D'autres exemples se retrouvent dans la littérature. SHEFFIELD et HAMMOND (1967) décrivent la formation des mérozoïtes d'Eimeria bovis autour de "blastophores" qui sont des sphères ou lobes découpés dans le cytoplasme du schizonte. Chez Aggregata, PORCHET-HENNERE et RICHARD (1971) montrent des figures analogues sur des schizontes de grande taille. De même ces phénomènes ont des points communs avec la vacuolisation des oocystes de Plasmodium (TERZAKIS, 1971), et on peut remarquer que dans tous ces cas, la cellule utilise au maximum les structures membranaires préexistantes. On peut d'ailleurs se poser la question de savoir si la cellule parasite, étant donné la rapidité de la gamétogenèse ou de la sporogenèse (quelques heures), pourrait synthétiser une quantité aussi importante de membranes plasmiques si elle n'utilisait les membranes préexistantes. Il est cependant certain que de nombreuses synthèses membranaires se produisent, mais à notre avis essentiellement au niveau du Réticulum endoplasmique et en dérivé du Golgi.

b - Les membranes du Réticulum endoplasmique

Ce type de membrane paraît indispensable dans la détermination de la polarité du gamète. Il semble en effet qu'une phase trois membranes soit nécessaire à la bonne individualisation des éléments sexuels. Cette constatation est valable également pour la genèse des germes infectieux à la sporogenèse (voir chapitre IV).

Dans les gamontes, dès les premières divisions progamiques alors que le découpage cytoplasmique n'a pas encore débuté, les saccules du réticulum endoplasmique viennent doubler l'enveloppe nucléaire et servent de support aux centres cinétiques (cf DIVISION).

Cette relation toujours étroite entre le centre cinétique et des membranes du réticulum lisse nous laisse supposer que ce dernier pourrait déterminer une accumulation localisée des molécules précurseurs des microtubules. La

présence de ces structures membranaires est souvent notée au cours de la genèse des schizozoïtes et mérozoïtes chez les coccidies, et il nous semble plus intéressant de reprendre la discussion après l'étude de la sporogénèse.

2°) Le gamète mâle

L'organisation ultrastructurale du gamète mâle de Diplauxis hatti présente plusieurs caractères originaux : axonèmes de base 3 + 0, relative abondance de réserves glucidiques et lipidiques, système mitochondrial bien représenté, et par contre Golgi peu important.

Un axonème flagellaire de base 3 + 0 est jusqu'alors la structure fonctionnelle la plus simple décrite dans le monde vivant. Cette exception au schéma classique 9 + 2 semble être l'apanage des Grégarines puisque chez Lecudina tuzetae SCHREVEL et BESSE (1975) décrivent un axonème de base 6 + 0 également fonctionnel.

Ce type de flagelle, engendré à partir de zones morphopoiétiques (centres cinétiques) non structurées, dépourvues de centriole pose le problème des propriétés jusqu'alors dévolues aux structures centriolaires.

a - Le mouvement et l'axonème flagellaire du gamète mâle de Diplauxis hatti

Comme pour le gamète mâle de Lecudina tuzetae (SCHREVEL et BESSE, 1975), l'étude cinématographique montre chez celui de Diplauxis un mouvement flagellaire de type ondulant hélicoïdal, dont le rythme de battement est d'environ 2 Hertz. Celui-ci est nettement plus rapide que chez Lecudina qui est de 1 battement toutes les 2 secondes.

Cette fréquence lente néanmoins, s'écarte des fréquences classiques des mouvements flagellaires comprises entre 6 et 70 cycles/sec. (HOLWILL, 1966) ou des fréquences des battements ciliaires comprises entre 4 et 33 cycles/sec. (SLEIGH, 1968). Notons cependant que ce battement entraîne une rotation assez énergique des gamètes mâles qui arrivent à s'insinuer entre les gamètes femelles et provoquer un mélange homogène des deux catégories d'éléments sexuels au cours de la fécondation.

En ce qui concerne la longueur du flagelle qui est de 12 à 15 μ m, elle ne présente pas un caractère exceptionnel si l'on considère les valeurs rapportées par SLEIGH (1962) qui montrent que si certains flagelles mesurent 100 μ m de longueur, d'autres ne mesurent que 3 à 4 μ m (flagelle de Chromulina pussilla)

Pour le diamètre, alors qu'il est de 0,15 à 0,18 μ m chez Lecudina et se rapproche assez de la valeur normale qui est de 0,2 μ m, il n'est chez Diplauxis que de 0,12 à 0,14 μ m, mais l'axonème lui ne dépasse guère 70 nm, valeur égale à peu près au 1/3 de l'axonème de cils et flagelles de base 9 + 2. Cette différence est en relation directe avec le nombre de doublets périphériques, la valeur chez Lecudina étant de 100 nm environ.

Dans les flagelles de base 9 + 2, deux doublets adjacents sont séparés par un espace d'environ 18 nm (WARNER et SATIR, 1973) et la valeur observée chez Diplauxis est du même ordre de grandeur pour les doublets 1 et 2 et 2 et 3 (Fig. 85) mais les deux d'entre eux qui forment l'angle le plus grand (3 et 1) sont distants de 24 nm. Cependant les doublets ont une taille identique à la normale.

α) Mécanisme du mouvement flagellaire du gamète mâle

L'ultrastructure du flagelle étudié montre que les fibres axiales ne sont pas nécessaires pour engendrer un mouvement ondulant.

Ce phénomène est intéressant car la participation de ces fibres dans le mécanisme des mouvements flagellaires fait l'objet de situations contradictoires.

Les études expérimentales de RANDALL et coll. (1964) et de WARR et coll. (1966) démontrent que des mutants non motiles de Chlamydomonas présentent un flagelle de structure anormale où les fibres centrales sont absentes ou altérées.

Cependant, les flagelles du spermatozoïde du ver Myzostomum (AFZELIUS, 1963) du turbellarié Childia (COSTELLO, MENLEY et AULT, 1969) et des gamètes mâles de la Grégarine Stylocephalus (DESPECTES, 1966) tous de base 9 + 0, ainsi que celui du gamète mâle de Lecudina (6 + 0) sont parfaitement mobiles. De même NAKAMURA et KAMIYA (1978) montrent que des portions longitudinales de flagelles de Chlamydomonas sont encore capables de mouvements de courbure.

COSTELLO (1973) pense que dans l'axonème de base $9 + 0$, une impulsion issue de la plaque basale produirait des vagues de courbure des doublets périphériques selon un ordre séquentiel.

On peut signaler en outre que des flagelles inhabituels, de base $12 + 0$ et $14 + 0$ (Spermatozoïdes de Protura) (BACCETTI et coll., 1973) sont immobiles. De même le gamète mâle de l'Eimeria parasite de Cypridopsis sp. de base $8 + 0$ est considéré comme non motile (REGER et FLORENDO, 1970). Par contre les flagelles de Sciara, constitués de 70 doublets sont mobiles, bien que capables uniquement de torsions peu marquées (PHILIPPS, 1969). L'étude du gamète mâle de Diplauxis, ainsi que celui de Lecudina montre qu'un mouvement flagellaire relativement complexe peut être engendré par un axonème très réduit, $3 + 0$ ou $6 + 0$.

La force impliquée dans le mouvement flagellaire du gamète mâle de Diplauxis s'explique assez difficilement selon le schéma décrit par de nombreux auteurs (SATIR, 1968, WARNER et SATIR, 1974, WARNER, 1976 et 1978, WARNER et MITCHELL, 1978 et ZANETTI et coll., 1979) qui fait intervenir l'existence des bras de dynéine ou de densifications de la matrice en relation avec les fibres périphériques. En effet, l'observation ultrastructurale ne montre jamais de structures qui pourraient y être apparentées comme c'est le cas chez Lecudina. Ainsi, les doublets chez Diplauxis semblent dépourvus de bras de dynéine, et il faudrait donc supposer qu'il n'y a pas possibilité d'interaction dynéine-tubuline selon les données de GIBBONS et coll. (1973)

Des études ultérieures permettront peut-être d'apporter des données complémentaires relatives au mouvement de ce flagelle très atypique.

Un dernier point de discussion concerne l'origine de l'énergie nécessaire au mouvement flagellaire, fournie par l'ATP qui diffuse du chondriome (SUMMERS et GIBBONS, 1971, GIBBONS et GIBBONS, 1974). Chez Lecudina, le chondriome est peu abondant, et les auteurs supposent l'intervention d'un autre mécanisme dans l'apport énergétique, qui pourrait être lié à la "dégradation glycolytique" d'abondantes réserves glucidiques (amylopectine) et lipidiques (SCHREVEL et BESSE, 1975). Un système analogue de production d'énergie doit se retrouver chez Diplauxis (les réserves sont abondantes dans le gamète) mais il est à noter tout de même que l'appareil mitochondrial est bien représenté dans le gamète mâle, par rapport à ce qu'il peut être dans le trophozoïte.

B) Signification d'un axonème fonctionnel de base "3 + 0"

Ainsi que l'envisagent SCHREVEL et BESSE chez Lecudina, il nous semble également que seules les propriétés morphopoiétiques des structures centriolaires méritent d'être retenues pour tenter d'expliquer l'origine de modèles aussi atypiques que 3 + 0 et 6 + 0.

L'organisation ennéanème des cils et flagelles mobiles et des centrioles à 9 triplets est apparue très tôt dans l'évolution des cellules Eucaryotes, et déjà les Chlamydomonas (Phytoflagellés) possèdent ce type d'organisation.

L'existence de flagelles 9 + 2 semble liée en majeure partie à la présence dans les cellules de structures centriolaires typiques (9 triplets) ou de centrioles à base 9, bien que parfois particuliers (DUBREMETZ, 1971, DESPORTES, 1970 et MOLON-NOBLOT, 1976).

Chez Diplauxis, le flagelle prend naissance à partir d'un centre cinétique non structuré, dans lequel aucune différenciation particulière n'a pu être observée. Ceci pourrait déjà dans une certaine mesure expliquer la structure très originale du flagelle. Pourquoi trois doublets chez Diplauxis ou six chez Lecudina, la question reste posée. Toujours est-il que le centre cinétique est capable d'exprimer des informations précises, qui, suivant les stades, se font tout à fait différemment : microtubules du fuseau de division, microtubules flagellaires ou microtubules sous-pelliculaires.

Rappelons de plus que chez Diplauxis, le centre cinétique engendre une poussée microtubulaire vers la partie antérieure du noyau, dont l'enveloppe nucléaire s'invagine. Ainsi se forme une sorte de baguette axiale, ancrée dans le noyau, à peu près parallèle au flagelle lui-même. Cette structure n'est pas décrite chez Lecudina, mais DESPORTES (1970) montre chez le gamète mâle de Stylocephalus l'existence de microtubules qui rayonnent à partir de la base du flagelle (équivalent du centre cinétique) et englobent la partie antérieure du noyau de forme conique à cet endroit.

La baguette axiale doit assurer une certaine rigidité à la zone d'implantation du flagelle, et de ce fait favoriser l'entraînement du corps du gamète à la suite du battement flagellaire.

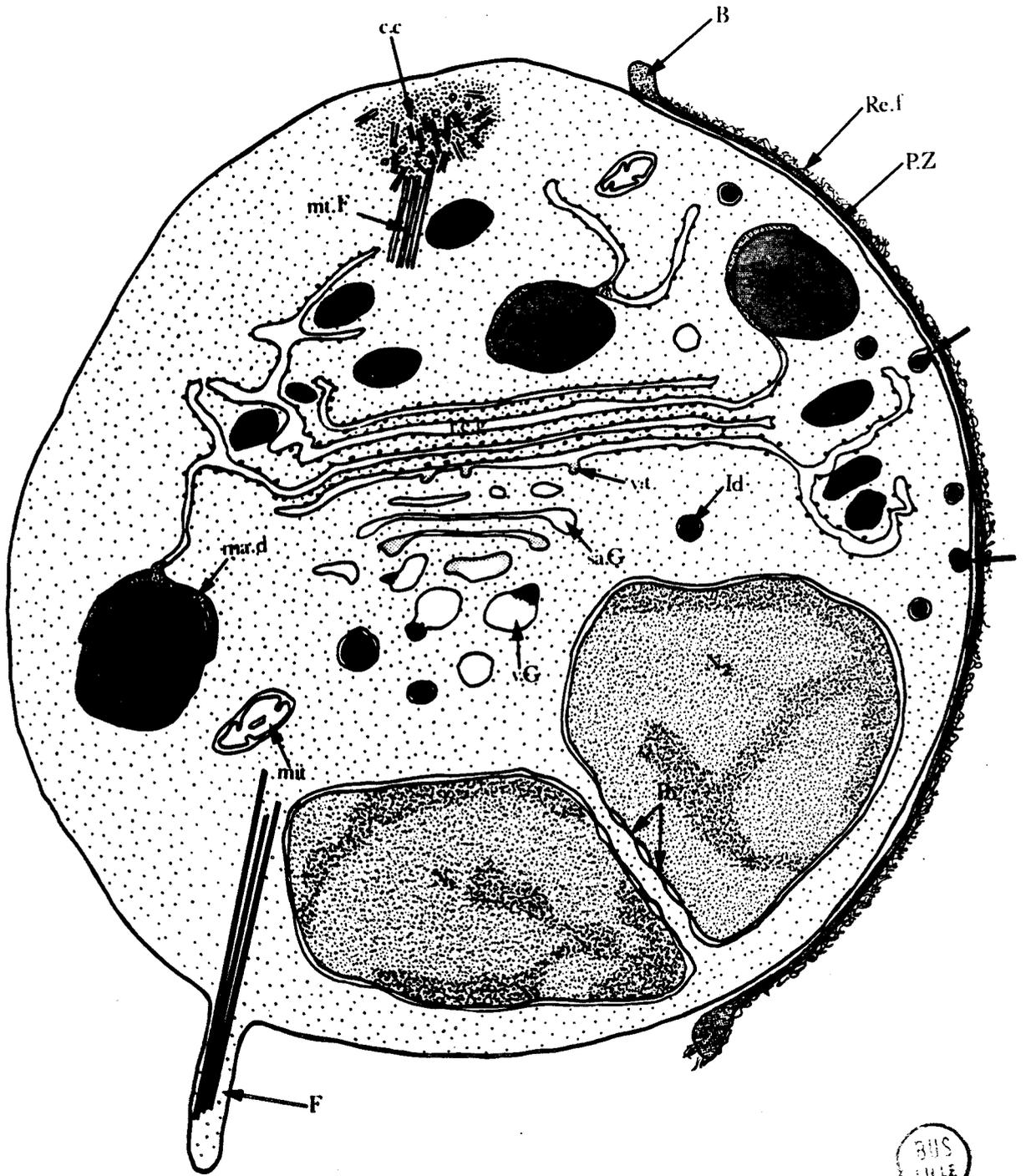
LE ZYGOTE.

Vue schématique d'un jeune zygote.

Le flagelle (F) issu du centre cinétique (c. c.) traverse tout le cytoplasme. Les noyaux gamétiques ($N_1 - N_2$) sont proches l'un de l'autre et les portions d'enveloppes nucléaires qui sont en vis à vis présentent de nombreux pores.

Le réticulum endoplasmique granulaire (r. e. g) est nettement différencié sous forme d'un empilement de 4 à 5 saccules. La face externe du ou des saccules externes bourgeonne des petites vésicules de transition (v. t) qui sont à l'origine de saccules golgiens (sa. G) au contenu peu dense qui se concentre latéralement, à l'origine d'inclusions denses (I. d) formatrices de la paroi (P.Z.) Cette dernière se structure en deux lames denses qui présentent à la surface extérieure un réseau fibrillaire (Re. f.) et sur le pourtour une sorte de bourrelet (B).

Le réticulum endoplasmique granulaire vient par ses extrémités latérales en relation à la fois avec les grains d'amylopectine (Am) et les globules lipidiques (L). A proximité de ces derniers, un matériel dense (ma. d.) est présent dans la cavité du saccule de réticulum.



BUS
LILLE

CHAPITRE III

LA FECONDATION

I - LE ZYGOTE

Le déroulement de la fécondation, étudié en cinématographie (voir chapitre I) est très rapide. Les différentes phases de la fusion des gamètes n'ont pu être suivies en microscopie électronique, seuls les zygotes mûrs seront étudiés ici.

Le gamétokyste contient de nombreux zygotes, pratiquement tous au même stade d'évolution. Ils sont légèrement ovipides, d'un diamètre voisin de $5 \mu m$, et continuent à se mouvoir pendant encore environ 1 H après la fusion des gamètes mâles et femelles. Le flagelle qui subsiste est parfaitement fonctionnel (Fig. 98). Il apparaît encore ancré au centre cinétique (Fig. 99) et traverse tout le diamètre du zygote (Fig. 98-), les noyaux des gamètes mâle et femelle se trouvant rejetés sur le côté (Fig. 96). Au début de la fécondation, ils sont situés dans des positions diamétralement opposées (Fig. 100) puis ils se rapprochent et présentent alors une zone d'affrontement de leur enveloppe nucléaire respective (Fig. 96-97). Celles-ci sont pourvues de nombreux pores nucléaires, particulièrement au niveau des zones qui se font face (Fig. 96-97-103). Parfois même, l'un des noyaux vient s'enfoncer dans l'autre comme par un processus de phagocytose (Fig. 103) et cette image correspond très vraisemblablement à un début de fusion des noyaux gamétiques. La chromatine est répartie en un réseau peu compact.

Le réticulum endoplasmique granulaire subit au cours de la fécondation une extension très importante et une localisation bien particulière. Les saccules ergastoplasmiques, au nombre de 4 ou 5 se disposent parallèlement les uns aux autres, leurs faces externes portent de nombreux ribosomes (Fig. 96). Les extrémités latérales des saccules s'élargissent, perdent une partie de leurs ribosomes et viennent entourer, à la fois les grains d'amylopectine et les globules lipidiques. Les cisternes qui viennent en contact avec une partie de la surface des inclusions lipidiques présentent un contenu homogène, dense aux électrons qui semble être un produit très voisin du contenu des globules lipidiques. Le même saccule peut entrer en relation avec plusieurs d'entre eux (Fig. 96-105) et ne porte pas de ribosome.

De même, les relations entre les grains d'amylopectine et les extrémités latérales des empilements de saccules ergastoplasmiques sont très étroites. Les réserves polysaccharidiques sont englobées complètement par le réticulum, ce qui laisse supposer des activités métaboliques importantes.

Le réticulum présente de plus une autre polarité : il se trouve en relation avec l'appareil de Golgi. Le ou les saccules ergastoplasmiques périphériques présentent une membrane externe dépourvue de ribosomes (Fig. 101-102-106-107). Celle-ci bourgeonne de petites vésicules de transition au contenu peu dense (Fig. 106), vésicules qui se soudent entre elles pour donner des saccules golgiens typiques, au nombre de 3 à 4. Les extrémités latérales des saccules se dilatent fortement et forment de grandes vacuoles, qui peuvent apparaître également à la face externe du dictyosome, ^{et sont} formées par dilatation des saccules. Le contenu de ces vacuoles apparaît très clair et sur certaines d'entre elles on peut observer une accumulation latérale de matériel dense aux électrons (Fig. 102-105) qui finit par se retrouver dans une vésicule de sécrétion typique, limitée par une membrane unitaire (Fig. 107). La taille des vésicules ainsi formée se réduit et son contenu se condense, donnant des inclusions globuleuses de petite taille ($0,1 \mu\text{m}$) qui migrent vers la périphérie du zygote (Fig. 108). Elles ne sont pas sans rappeler les granules denses décrits dans les gamontes au début de leur évolution. Comme dans ce cas, les petites inclusions vont participer à l'élaboration de la paroi du futur sporoblaste. De nombreuses images montrent ces éléments cytoplasmiques venant crever à la surface du cytoplasme (Fig. 104-108), leur membrane limitante se soudant à la membrane plasmique du zygote. La couche ^{ainsi} formée se structure en une bande dense de 25 nm d'épaisseur, recouverte extérieurement par une couche plus lâche présentant des expansions filiformes qui peuvent être en relation avec celles d'un zygote voisin (Fig. 100). Ces structures sont les premiers signes de la disposition en très longs chapelets qu'acquiert les spores mûres. La couche dense externe sur des plans de coupe bien transversaux apparaît constituée de deux bandes sombres de 7 nm environ séparées par un espace clair de même épaisseur. Des plans de coupe légèrement obliques laissent apparaître une striation périodique de la couche externe (Fig. 104) qui se retrouve sur la paroi des spores.

Sur les stades observés, seule la moitié environ de la surface du zygote est recouverte de la paroi en cours de formation, épaisse localement sur le pourtour en un bourrelet de matériel dense (Fig. 98).

II - LE SPOROBlaste UNINUCLEE

Après fusion des noyaux gamétiques, le zygote évolue en sporoblaste uninucléé immobile (Fig. 109), de forme nettement ovale (6 μ m de grand axe sur 4 μ m de petit axe) et entouré d'une paroi continue dont la différenciation n'est pas encore achevée. Les inclusions sont nombreuses, identiques à celles du zygote pour les granules lipidiques et polysaccharidiques, mais il n'existe pratiquement plus d'inclusions denses formatrices de la paroi. Le réticulum endoplasmique, ainsi que l'appareil de Golgi sont fortement réduits par rapport à ce qu'ils étaient quelque temps auparavant. Le noyau de fécondation va entrer progressivement en première division. D'après les données de la microscopie optique (GRASSE, 1953), il est admis que c'est au cours de cette première division que s'effectue la réduction chromosomique. La seule figure correcte que nous ayons obtenue de ce stade montre un sporoblaste uninucléé (Fig. 110) dont le noyau présente un aspect très particulier. La chromatine est répartie en cinq masses compactes bien séparées, accolées à l'enveloppe nucléaire légèrement boursouflée à ces endroits. Cette disposition du matériel génétique est à rapprocher de ce que l'on peut observer sur des coupes transversales d'Anaphase des divisions suivantes et pourrait correspondre à l'individualisation des chromosomes à la prophase de 1ère division de méiose.

CHAPITRE IV

LA SPOROGENESE

Les études concernant la formation des germes infectieux du type schizozoïte ou mérozoïte ainsi que leur structure fine sont nombreuses chez les Sporozoaires, mais sont relatives essentiellement au groupe des Coccidimorphes. Par contre la genèse des sporozoïtes dans le sporoblaste est de très loin moins bien connue. Seuls quelques résultats ont été obtenus par FERGUSON et coll. (1978-1979) chez Eimeria brunetti et Toxoplasma gondii et par PORCHET HENNERE (1972) chez Diplauxis schreveli. Nous avons nous-même montré partiellement l'origine des membranes lors de la différenciation des sporozoïtes chez Diplauxis hatti (PRENSIER, 1970 a - b). Chez aucune autre grégarine des images de la sporogénèse n'ont été montrées.

Nous nous proposons dans ce chapitre de présenter tous les éléments acquis jusqu'alors sur ce stade de développement de Diplauxis et d'en faire la synthèse avec les données acquises sur des stades équivalents d'autres Sporozoaires.

Ce qui concerne l'origine de la paroi kystique est décrit précédemment, mais la différenciation subie par la paroi mérite qu'on s'y attarde un peu. Cependant, l'essentiel de ce chapitre aura trait à deux points très importants dans la compréhension du processus de la sporogénèse qui sont, d'une part l'origine et l'évolution des membranes limitantes, d'autre part la formation des organites propres aux germes infectieux des Sporozoaires (microtubules sous-pelliculaires, micronèmes, rhoptries).

I - LA PAROI DU SPOROCYSTE

Le noyau de fécondation va subir trois divisions successives qui amèneront la formation de huit noyaux. Au cours de ces divisions, la paroi du sporoblaste acquiert sa structure définitive. Elle apparaît alors parfaitement continue et d'épaisseur régulière (Figs. 111-112). En coupe transversale, elle est formée de deux couches denses de 20 nm, séparées par un espace clair, d'épaisseur variable (20 à 30 nm) que l'on peut assimiler à une endospore et

LE SPOROZOÏTE MUR.

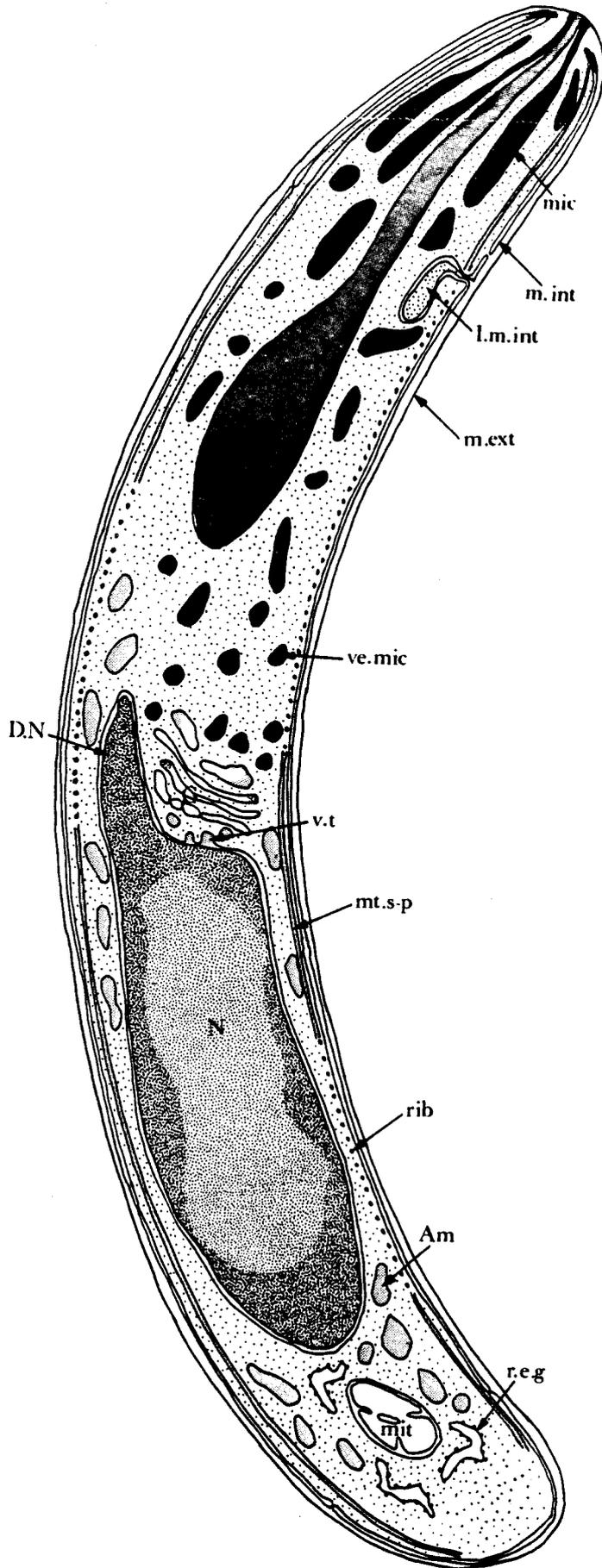
Le sporozoïte est vermiculaire, d'une longueur de $7 \mu\text{m}$ sur $1 \mu\text{m}$ de diamètre. Il est limité par une pellicule trimembranaire composée d'une membrane externe (m. ext) continue et d'un complexe interne (m. int) constitué par l'apposition de saccules aplatis ayant pour origine le réticulum endoplasmique

Les membranes internes, qui sont interrompues à la partie antérieure, présentent souvent de profondes invaginations (I. m. int).

Des microtubules sous-pelliculaires (mt. s. p.) fixés sur le pourtour de l'interruption apicale du complexe interne courent sur toute la longueur du germe et entre ceux-ci on voit des alignements réguliers de ribosomes (rib.)

Le noyau allongé est situé dans le tiers postérieur et émet vers l'avant un diverticule (D. N) qui délimite une sorte de cupule où est logé un dictyosome (G) celui-ci se forme à partir de vésicules (v. t) bourgeonnant à partir de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire. Le Golgi est à l'origine de petites vésicules au contenu dense (ve. mic.) qui vont par coalescence constituer les micronèmes typiques (mic). Ceux-ci sont en forme de bouteille allongée dont le goulot vient se terminer sur la membrane externe apicale. Une grosse inclusion en massue, la rhoptrie (R) également d'origine golgienne vient s'aboucher au même endroit.

Sur le pourtour du noyau et dans la zone postérieure à celui-ci on trouve les grains d'amylopectine (Am.), les mitochondries (mit) et le réticulum endoplasmique granulaire (r. e. g).



une exospore qui sont souvent décollées l'une de l'autre (Fig. 111). Sur des grossissements plus importants, chacune des bandes sombres apparaît constituée par la superposition de deux lames continues de 6 nm d'épaisseur séparées par une bande moins compacte d'épaisseur équivalente (Fig. 112). La couche la plus externe porte un revêtement de matériel fibrillo-granulaire comme celui décrit lors de la formation de la paroi du zygote et rappelle également la texture de la couche anhyte de la paroi kystique du gamonte.

Certains plans de coupes légèrement obliques montrent une certaine périodicité (Fig. 132) des lames externes de l'endospore (C₂) et de l'exospore (C'2) (Fig. 112). Sur coupe tangentielle, les deux striations forment entre elles un angle d'environ 30° (PRENSIER, 1971).

La partie antérieure du sporocyste est différenciée en goulot. L'exospore et l'endospore sont nettement décollées, la couche interne de l'endospore s'épaissit pour former une sorte de capuchon dense avec une striation périodique orientée dans le sens du grand axe du sporocyste (Fig. 132). Des spores qui ont subi un traitement par du broyat d'intestin de Néréis, et qui sont sur le point de libérer leurs sporozoïtes présentent une désorganisation de la couche compacte du goulot (Fig. 139) et cette zone apparaît alors constituée de sortes de microtubules d'environ 10 nm d'épaisseur. Ceux-ci semblent être l'objet de l'attaque enzymatique et leur désorganisation entraîne l'ouverture de la spore qui libère ses sporozoïtes (Fig. 143).

II - LE SPOROZOÏTE MUR

Pour une meilleure compréhension du processus de la sporogénèse, il semble utile de connaître d'abord la structure fine du sporozoïte achevé. Celui de Diplauxis a une structure très voisine de celle des germes infectieux de la plupart des Sporozoaires, qu'ils soient des schizozoïtes, mérozoïtes, endozoïtes ou sporozoïtes (PORCHET-HENNERE et VIVIER, 1971). Ces organismes en forme de banane sont limités par un complexe tri membranaire. La membrane externe, du type membrane unitaire classique est continue, d'une épaisseur voisine de 7,5 nm (Fig. 137). La couche bimembranaire interne est constituée de membranes plus minces (environ 6 nm) et est interrompue à l'apex du sporozoïte (Fig. 131-134). Le complexe interne est interrompu par endroits, ce qui permet de voir qu'il est en fait constitué par des saccules aplatis qui deviennent

jointifs (Fig. 137). Cette structure particulière des membranes internes, supposée par REGER (1967) et VIVIER et PETITPREZ (1972) a été démontrée parfaitement par la technique de cryofracture (DUBREMETZ et TORPIER, 1978 et PORCHET HENNERE et TORPIER, 1977).

Chez la plupart des germes infectieux de Sporozoaires est présent à la partie antérieure un organite en tronc de cône, le conoïde. Cette structure est absente chez Diplauxis comme chez d'autres groupes tels que les Hémosporiidies et les Piroplasmies.

Sous le complexe interne du sporozoïte courent longitudinalement 16 microtubules sous-pelliculaires, à peu près régulièrement répartis (Fig. 142) et qui s'ancrent à la partie antérieure, sur le pourtour de l'interruption circulaire du complexe membranaire interne légèrement plus dense (Fig. 132). Cette zone correspond à l'emplacement des centres cinétiques. Dans la région antérieure, les membranes internes présentent parfois des structures du type micropore (Fig. 141) ou encore de profondes invaginations de la membrane la plus interne (Fig. 132).

Le noyau du sporozoïte, de forme ovoïde a une polarité très nette. La face dirigée vers l'avant du germe infectieux envoie une expansion latérale en forme de lame (Fig. 129), délimitant une sorte de cupule qui présente une activité importante de l'enveloppe nucléaire. Cette dernière émet, par sa membrane externe de nombreuses petites vésicules (Fig. 129-138) qui se soudent pour former les saccules d'un dictyosome.

A l'avant de ce dictyosome, de nombreuses inclusions occupent la majeure partie de la zone apicale. Ces inclusions sont de deux types. La majorité d'entre elles sont constituées de granules sphériques, à proximité des faces latérales du dictyosome, et qui prennent une forme de navette au fur et à mesure que l'on s'approche de l'apex du sporozoïte (Fig. 132, 133, 134, 135, 137). Ces organites sont en réalité des inclusions en forme de bouteille, se prolongeant par un long goulot étroit qui vient se terminer au niveau de la membrane externe du sporozoïte, en passant par l'interruption antérieure du complexe interne (Fig. 132-134). Toutes ces inclusions constituent des stades différents de l'évolution des micronèmes, présents chez la plupart des germes infectieux des Sporozoaires et dont le rôle précis n'a jusqu'alors pas été démontré.

La partie antérieure du sporozoïte comprend également une grosse inclusion limitée par une membrane, au contenu homogène moins dense que celui

SCHEMAS MONTRANT QUELQUES PHASES ESSENTIELLES
DE LA GENESE DES GERMES INFECTIEUX DANS LE
SPOROBLASTE.

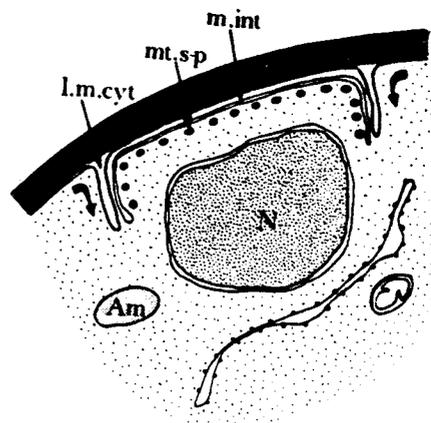
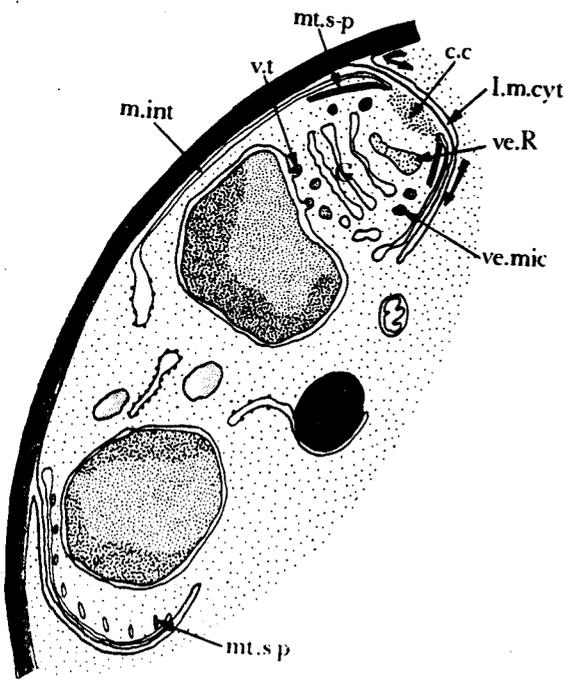
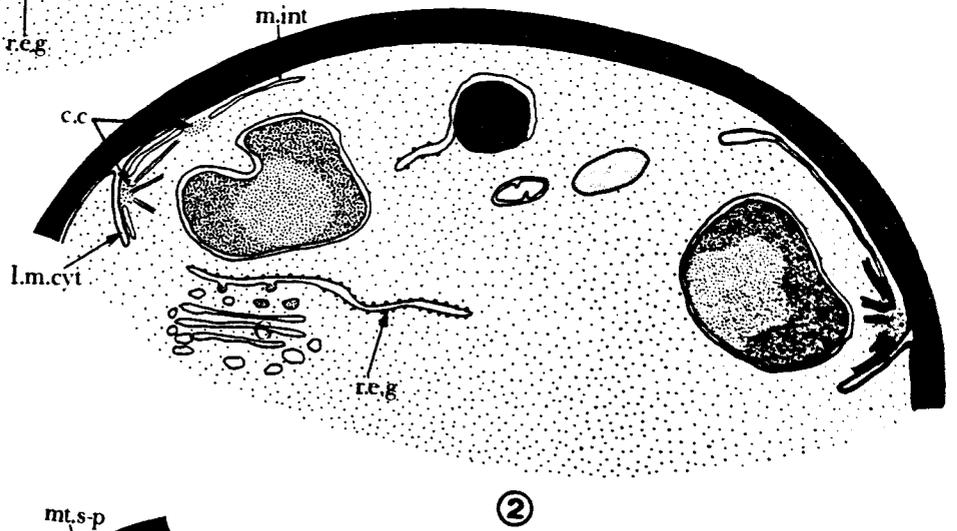
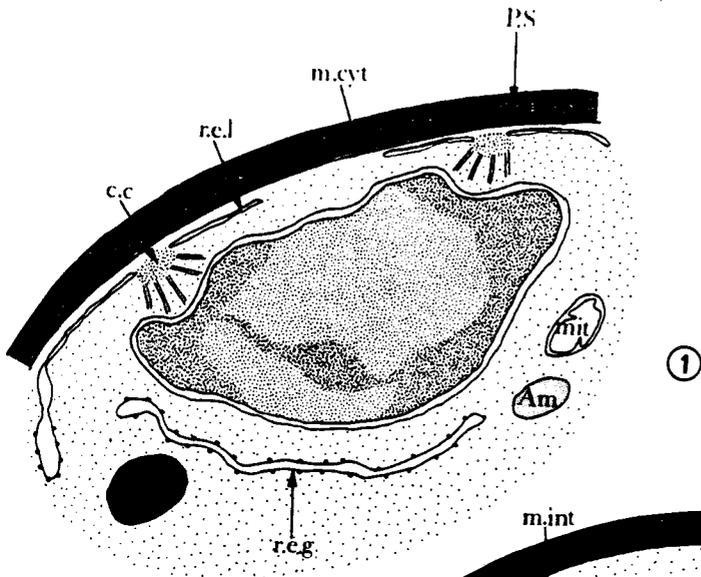
1 - Déjà au cours des divisions métagamiques, une partie du complexe membranaire des futurs zoïtes est présent. Il est constitué par la membrane cytoplasmique du sporoblaste (m. cyt.) et des saccules de réticulum endoplasmique lisse (r. e. l) parallèles à celle-ci. Les centres cinétiques (c.c.) vont déterminer la polarité des germes.

P. S. = Paroi du sporoblaste.

2 - A la fin de la 3ème division métagamique, la membrane cytoplasmique du sporoblaste s'invagine (I. m. cyt) à proximité du centre cinétique (c.c.) qui vraisemblablement se dédouble encore une fois.

3 - L'invagination de la membrane cytoplasmique (I. m. cyt) se poursuit (flèches) suivie par une extension des futures membranes internes (m. int) et délimite de cette façon une zone de cytoplasme qui englobe progressivement le noyau. A l'avant de celui-ci se constitue un dictyosome (G) qui donnera par ses extrémités latérales des vésicules précurseur des micronèmes (ve. mic.) et par sa face externe une grosse vacuole qui donnera la rhoptrie (ve. R). Le centre cinétique dirige la synthèse des microtubules sous-pelliculaires qui suivent toujours l'extension des membranes internes.

4 - En coupe transversale à un niveau médian du noyau (N) on retrouve de chaque côté la membrane cytoplasmique en cours d'invagination (I. m. cyt.) suivie par les membranes internes (m. int.), ceci face au noyau. Les microtubules sous-pelliculaires suivent la progression des membranes internes.

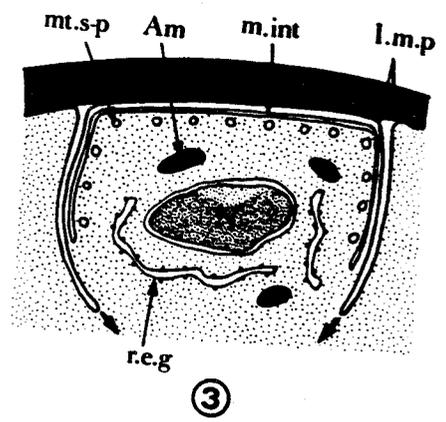
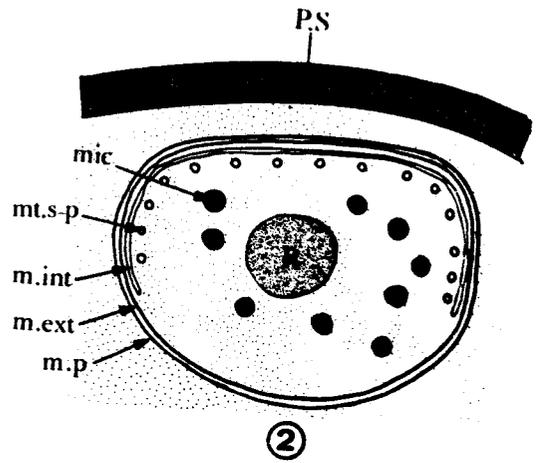
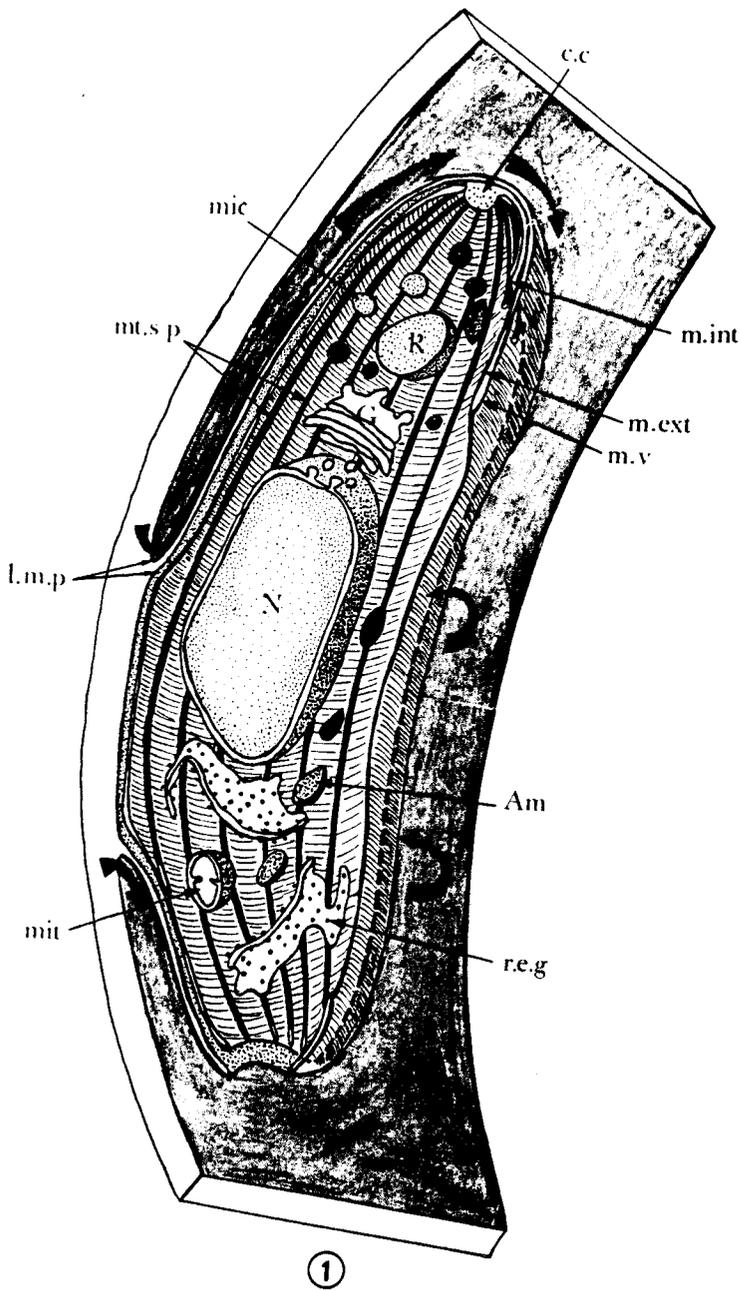


BUS
LILLE

- 1 - Essai de représentation schématique dans l'espace du processus de délimitation des germes infectieux dans le sporoblaste.
Les flèches indiquent la progression des membranes externes (m. ext. + m. v = membrane de la vacuole qui englobe l'ensemble du germe) et internes (m. int.) à l'avant et l'arrière du noyau, et également le processus d'enveloppement latéral.

- 2 - Coupe transversale à l'avant du germe. Les membranes externes (m. ext + m. v) ont atteint leur extension maximum, mais pas encore le complexe interne (m. int). Noter la position des microtubules sous-pelliculaires (mt. s. p).

- 3 - Coupe transversale au niveau médian. Les différentes membranes ne se sont pas encore rejointes.



des micronèmes. Cette inclusion en forme de massue constitue la rhoptrie, organe antérieur dont le rôle est semble-t-il primordial au cours de la pénétration des germes infectieux dans l'épithélium intestinal (voir chapitre V).

Autour du noyau et dans la zone cytoplasmique postérieure au noyau sont localisés essentiellement les organites cellulaires classiques. De nombreux grains d'amylopectine occupent cette région (Fig. 137,138). Ils sont de petite taille, allongés, et tout à fait différents des grosses inclusions polysaccharidiques du reliquat cytoplasmique (Fig. 130,131). La réaction de mise en évidence des polysaccharides permet de bien différencier les grains d'amylopectine des micronèmes (Fig. 131) et il semble que l'on ait affaire ici à une synthèse de nouveaux polysaccharides par le sporozoïte en cours d'individualisation. Les globules lipidiques ne semblent pas non plus être incorporés au cours de la formation des germes infectieux et ceux présents plus tard doivent également provenir de nouvelles synthèses.

Les mitochondries sont contenues dans la portion cytoplasmique postérieure (Fig. 137-138). Notons en dernier lieu une disposition particulière des ribosomes, situés en périphérie du germe sous le complexe membranaire interne (Fig. 130, 136, 137). Sur coupes tangentielles (Fig. 141), ils apparaissent disposés en alignements réguliers longitudinaux parallèles entre les microtubules sous-pelliculaires. Ces alignements sont au nombre de 4 ou 5 entre chaque microtubule et témoignent peut-être de l'origine ergastoplasmique du complexe interne.

III - ORIGINE ET EVOLUTION DES ELEMENTS DU FUTUR SPOROZOÏTE

On considérera dans ce paragraphe plusieurs catégories de membranes, qui toutes jouent un rôle essentiel dans la genèse des sporozoïtes ; à la fois dans la constitution de sa paroi complexe, et dans la formation de certains de ses organites.

a) Le complexe membranaire interne et la membrane plasmique

Dans le chapitre de la division, il est décrit que les centres cinétiques qui polarisent la division sont toujours situés à proximité immédiate d'un pore assez large présent à peu près au centre d'une couche bimem-

branaire formant un saccule aplati disposé parallèlement à la membrane plasmique du sporoblaste, à 20 nm environ de celle-ci. Ces saccules ont un pourtour souvent dilaté, et l'on peut remarquer dans certains cas qu'ils sont en continuité directe avec le reticulum endoplasmique dont ils dérivent très vraisemblablement.

En début de 3ème division, alors que les centres cinétiques sont peu éloignés l'un de l'autre, chacun d'eux est accompagné de son saccule bimembranaire (Fig. 111-112). Au cours de la séparation des centres cinétiques, les saccules suivent leur déplacement et augmentent en surface. Ces membranes vont constituer les premières portions du complexe membranaire interne du sporozoïte.

Vers la fin de la dernière division sporogonique les membranes internes s'étendent toujours parallèlement et à égale distance de la membrane cytoplasmique du sporoblaste, et atteignent un diamètre équivalent approximativement à celui des noyaux qui leur font directement face (Fig. 113, 114, 115). Ces derniers sont toujours situés en périphérie du sporoblaste (résultat de la 3ème mitose) et c'est à proximité immédiate de chacun d'eux, que vont se structurer les germes infectieux.

Pour bien saisir la suite du processus d'individualisation des sporozoïtes, il faut considérer des plans de coupe transversaux et longitudinaux de ceux-ci. Le germe est polarisé très tôt et déjà au stade décrit précédemment on peut constater une évolution différente des structures membranaires.

En coupe transversale, l'extension du complexe membranaire interne s'effectue d'abord parallèlement à la membrane plasmique du sporoblaste (Fig. 114) puis ensuite à peu près perpendiculairement à celle-ci, à partir du moment où l'extension latérale est suffisante pour pouvoir englober le noyau (Fig. 116-117). A partir de ce degré d'évolution, la membrane cytoplasmique du sporoblaste va s'invaginer parallèlement à la lame bimembranaire (Fig. 118) On trouve alors une superposition de quatre membranes dont les deux plus externes (membrane plasmique) sont disposées bien régulièrement à 20 nm l'une de l'autre. A 20 nm également de celles-ci sont placées les membranes constitutives du complexe bimembranaire interne, qui sont un peu plus minces (6 nm contre 7 à 8 nm) et étroitement accolées. Un certain nombre de microtubules (futurs microtubules sous-pelliculaires, courent sous les membranes, uniquement en vis à vis du complexe interne déjà mis en place (Fig. 11). Les membranes constituent alors une sorte de "berceau" dans lequel est logé le noyau.

BUS
LILLE

Si l'on considère maintenant ce qui se passe sur des plans de coupe longitudinaux (futur plan antéro-postérieur du sporozoïte) le mode d'extension des systèmes membranaires est analogue. Une invagination de la membrane plasmique s'effectue à proximité de l'ancien centre cinétique qui a polarisé la dernière division (Fig. 113). L'interruption dans la lame binembranaire est toujours présente, le centre cinétique y est logé. Certaines images (Fig. 119) nous laissent supposer que celui-ci se dédouble encore une fois comme pour amorcer une mitose, mais dans ce cas, la poussée microtubulaire ne s'effectue pas en direction du noyau, mais parallèlement à la paroi du sporoblaste (Fig. 119) et provoque en quelque sorte un glissement des systèmes membranaires limitants. Au fur et à mesure du glissement, une zone cytoplasmique se délimite à l'avant du noyau, les membranes en cours d'extension formant une sorte de chapeau (Fig. 121, 122, 123, 125). Les mouvements simultanés d'extension latérale et d'enveloppement vers l'avant vont isoler un volume cytoplasmique en forme de banane dans lequel sont incorporés une partie du cytoplasme ainsi que certains organites du sporoblaste. Les sporozoïtes s'individualisent deux par deux, leurs parties antérieures opposées (Fig. 121, 122) mais ne sont pas disposés dans le prolongement l'un de l'autre. Ils se forment obliquement et vont se retrouver en position tête bêche dans le sporocyste mûr. (Fig. 135)

En résumé, la paroi des sporozoïtes se constitue en majeure partie avec des membranes présentes dans le sporoblaste. La membrane plasmique provient de la membrane limitant le sporoblaste, qui présente très vraisemblablement des zones de synthèse pour compenser l'importante augmentation de surface

Le complexe membranaire interne se forme à partir du réticulum endoplasmique, et son extension est toujours retardée par rapport à l'invagination des membranes plasmiques. Il semble que ce soient ces dernières qui dirigent le développement du complexe interne. Dans le sporocyste mûr, les huit sporozoïtes se trouvent englobés dans une sorte de vacuole et sont disposés à la périphérie de la spore (Fig. 136-137) qui présente en son milieu un reliquat cytoplasmique important.

b) Les membranes ergastoplasmiques et le Golgi

Les cisternes ergastoplasmiques sont abondantes dans le sporoblaste (Fig. 111). Ces éléments du réticulum ont essentiellement deux fonctions. Ils participent d'une part de façon majeure à l'élaboration du complexe interne des sporozoïtes, et d'autre part ils interviennent directement dans la différenciation des dictyosomes (Fig. 113). Cette dernière s'effectue de façon clas

sique, comme nous l'avons déjà signalé lors de la fécondation. Ce qu'il faut remarquer en ce qui concerne les dictyosomes, c'est qu'ils sont toujours formés à proximité des noyaux (Fig. 114) et en nombre équivalent à ceux-ci (Fig. 115). Ce phénomène est à rapprocher de ce qui a été décrit lors des divisions progamiques. Les dictyosomes, dès le début de l'individualisation des sporozoïtes présentent une activité propre. Ils forment, à la périphérie des saccules de leur face active, des petites vésicules au contenu homogène peu dense aux électrons (Fig. 114). Ces vésicules, en migrant dans le cytoplasme, s'opacifient pour donner des inclusions analogues du point de vue aspect aux vésicules formatrices de la paroi du zygote (Fig. 113).

Dans le sporoblaste en évolution, on trouve donc un dictyosome proche de chaque germe en formation. Quand la calotte antérieure est mise en place (Fig. 124), le dictyosome migrera dans la zone de cytoplasme ainsi délimitée (Fig. 126). Les sporozoïtes en cours d'individualisation prennent alors un aspect caractéristique, avec une nette polarité. L'élément directeur semble être le noyau. La membrane externe de son enveloppe bourgeonne de petites vésicules en direction du dictyosome (Fig. 122, 126), et devient alors à l'origine de son renouvellement, rôle joué auparavant par l'ergastoplasme. Ce processus se poursuit dans le sporozoïte mûr.

D'après nos observations, l'activité du Golgi est essentielle à la genèse des organites antérieurs (micronèmes - rhoptrie) du germe infectieux des Sporozoaires. Le pourtour des saccules du dictyosome forme de petites vésicules (Fig. 123) dont le contenu est peu dense aux électrons, et qui donnent par coalescence les micronèmes caractéristiques du sporozoïte mûr (Fig. 127, 128, 129).

La rhoptrie quant à elle se forme à partir de grosses vacuoles issues de la face externe du dernier saccule du dictyosome (Fig. 126). Ces vacuoles en fusionnant vont constituer une grosse inclusion, d'abord sphérique au contenu clair et hétérogène (Fig. 125, 127). Puis au cours de la maturation du sporozoïte, cette inclusion s'ovalise puis se pédiculise à la partie antérieure, en même temps, son contenu s'opacifie et devient homogène (Fig. 133). Ainsi se constitue une rhoptrie typique dont l'évolution sera décrite au chapitre du mécanisme de l'infestation.

De plus, l'appareil de Golgi semble participer en partie à la croissance du complexe membranaire interne du sporozoïte, mais il n'est pas possible de l'affirmer, nos conclusions se basant uniquement sur des aspects morphologiques (Fig. 123, 125).

c) Le centre cinétique et les microtubules sous pelliculaires

A la fin de la 3^{ème} division sporogonique, le centre cinétique localisé dans l'interruption circulaire de la lame ergastoplasmique sous-jacente à la membrane plasmique du sporoblaste va très vraisemblablement se dédoubler (Fig. 119). Une poussée microtubulaire se produit entre les deux centres cinétiques, parallèlement à la paroi du sporoblaste. Cette force exercée par les microtubules pourrait favoriser l'importante progression du complexe membranaire qui forme la partie antérieure du sporozoïte et en même temps déterminer la polarité antéro-postérieure du germe. Les microtubules ainsi mis en place sont les futurs microtubules sous-pelliculaires, au nombre de 16 chez le germe mûr. Sur des coupes transversales de sporozoïte en cours d'individualisation (Fig. 118) le nombre de microtubules définitifs est déjà présent, et ceux-ci sont toujours disposés face au complexe interne déjà mis en place. Ils suivent ensuite l'extension de celui-ci, un peu comme les baleines d'un parapluie qui s'ouvre. Il est donc logique de penser que très tôt les microtubules jouent le rôle de cytosquelette et qu'ils sont indispensables à la bonne mise en place du complexe membranaire du sporozoïte.

d) Les réserves du sporozoïte

Les réserves du sporozoïte, amylopectine et lipides ne proviennent pas de la cellule mère. Au cours de l'individualisation des germes infectieux, il se forme un reliquat cytoplasmique important qui comprend en particulier une grosse quantité de paraglycogène, constitué de gros granules, ainsi que de nombreux globules lipidiques. Les réserves glucidiques apparaissent assez tardivement, dans les sporozoïtes déjà bien délimités (Fig. 130). La mise en évidence des polysaccharides selon la technique de SELIGMAN modifiée par THIERY montre bien que les grains d'amylopectine du sporozoïte sont nettement plus petits que ceux du sporoblaste (Fig. 131), et ils sont essentiellement localisés dans la zone postérieure et sur le pourtour du noyau (Fig. 137, 138). Les réserves polysaccharidiques sont en relation assez étroite avec des cisternes du réticulum endoplasmique qui doit participer à leur synthèse et leur accumulation en petits granules (Fig. 136). On peut constater la très grande abondance de réserves glucidiques sur les sporozoïtes mûrs, et surtout sur ceux qui sont en cours d'excystation (Fig. 145).

Par contre, les réserves lipidiques sont très peu abondantes et rarement visibles sur les coupes. Tout au plus trouve-t-on 1 ou 2 petits globules lipidiques dans la partie postérieure du sporozoïte.

En remarque, signalons la présence dans le sporoblaste en évolution, d'inclusions à structure paracrystalline (Fig. 120, 121) qui sont constitués par des agencements réguliers de tubules de 2 nm de diamètre.

IV - DISCUSSION

1°) La formation de la paroi kystique et de la paroi du sporoblaste

Nous avons remis à ce chapitre la discussion sur la formation de la paroi kystique lors de la gamétogenèse, car en effet celle-ci relève d'un processus très voisin de la constitution de la paroi du sporoblaste. Dans les deux cas, on assiste à une structuration de matériel provenant soit du jeune gamétokyste soit du jeune sporoblaste, structuration qui s'effectue extérieurement et parallèlement à la membrane plasmique limitante. Dans le cas de la paroi kystique, le trophozoïte âgé présente dans son cytoplasme de très nombreuses inclusions à aspect compact et limitées par une membrane légèrement décollée du contenu. Dans le zygote, toutes proportions gardées, nous trouvons un type de granule voisin. Ces inclusions viennent se vider à la périphérie du zygote et constituent une couche compacte d'environ 20 nm d'épaisseur, couche qui se structure peu à peu pour former deux lames denses séparées par un espace plus clair.

Dans le cas de la paroi kystique, le processus de genèse de la paroi doit être semblable bien que nous n'ayons jamais pu voir les grosses inclusions denses crever en surface. Ceci ne peut être supposé qu'à partir d'observations indirectes. Les inclusions denses disparaissent rapidement au cours de la formation de la paroi du gamétokyste.

Un mécanisme analogue a été décrit chez d'autres Grégarines, en particulier par DESPORTES (1969-1970), chez Stylocephalus longicollis. Dans ce cas, de nombreuses inclusions opaques, d'origine golgienne sont accumulées sous l'épicyte des trophozoïtes en syzygie, et selon l'auteur pourraient participer à la formation de l'enveloppe kystique. De même, BESSE (1975) décrit chez Lecudina tuzetae l'existence de nombreuses vacuoles de type mucopolysaccharidique sous l'épicyte des gamétokystes dont la paroi est en cours de formation. Dans ces différents cas, il y a apparition, en surface du gamétokyste d'une lame dense continue, bien structurée, et qui se double extérieurement d'une

couche de matériel à aspect fibrillaire se structurant parallèlement à la lame dense. Chez Lecudina et Stylocephalus, le degré d'organisation et de densification est beaucoup plus important que chez Diplauxis, ce qui s'explique par la difficulté de fixer correctement les stades enkystés.

Il faut remarquer que la réaction de mise en évidence des polysaccharides montre des granulations THIERY positives (Fig. 131), mais qui ne semblent pas provenir des inclusions denses formatrices de la paroi kystique. Ces granulations pourraient résulter de la dégradation d'une certaine quantité de grains d'amylopectine non incorporés dans les gamètes.

Si l'on considère maintenant la genèse de la paroi des sporoblastes, elle semble relever d'un processus équivalent à celui de la formation de l'enveloppe kystique. Les petits granules denses d'origine golgienne migrent à la périphérie du zygote, viennent crever à la surface de celui-ci et constituent progressivement une couche dense qui se différencie en une lame continue portant extérieurement des expansions fibrillaires du type cell-coat.

Puis cette couche dense se différencie en deux lames très rapprochées présentant une structure périodique. Au cours de l'évolution du sporoblaste, une deuxième lame apparaît, sans doute selon le même mécanisme, de même aspect que la première mise en place. L'espace relativement large entre les deux couches de la paroi constitue une zone de moindre résistance et permet de parler d'une exospore et d'une endospore comme le décrivent PORCHET-HENNERE (1969) et PORCHET-HENNERE et RICHARD (1971) chez certaines Coccidies. Nous n'avons pas chez Diplauxis d'anneau de déhiscence comme chez Coelotropha, Aggregata ou Toxoplasma (FERGUSON et coll., 1979), l'ouverture de la spore se faisant au niveau du goulot antérieur (voir mécanisme d'infestation).

La genèse de la paroi sporocystique chez les Grégarines présente des analogies avec celle de la paroi de l'oocyste chez les Coccidiomorphes. Dans ce cas, les structures périphériques sont constituées d'un nombre de couches variables (MC LAREN (1969), SELIVERSTOVA (1970), DUBREMETZ et YVORE (1971), DOENS-JUTEAU et SENAUD (1974), CHOBOTAR et coll. (1975), VARGHESE (1975)) mais leur origine fait toujours intervenir des inclusions particulières dénommées "Wall forming bodies" (W. F. B.) qui sont de deux types, W F B I et W F B II. Leur aspect ultrastructural est voisin de celui observé chez Diplauxis dans les jeunes gamontes ainsi que dans le sporoblaste. Leur origine selon WHEAT et coll. (1976) est à rechercher dans l'ergastoplasme pour les W F B II et dans le Golgi pour les W F B I. Les auteurs montrent une polarité

allant des globules W F B II entourés par l'ergastoplasme, ce dernier formant un dictyosome à l'origine des vésicules W F B I. Ceci est à rapprocher de ce que nous-mêmes avons observé à propos des relations entre l'ergastoplasme, et les globules lipidiques d'une part, et l'ergastoplasme et les dictyosomes d'autre part (voir Fécondation). Une partie des réserves lipidiques pourrait être reprise par le réticulum endoplasmique granulaire et servir ensuite, par transformation dans le Golgi, à la synthèse des inclusions formatrices de membranes. Dans ce cas, on s'accorde parfaitement au schéma classique de la synthèse des Protéines chez les Eucaryotes (PALADE, 1975, BLODEL, 1980) qui a lieu au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique granulaire. Les Protéines y pénètrent, puis transitent par le Golgi où elles subissent les transformations nécessaires à la constitution des sécrétions définitives. De plus, il faut remarquer l'utilisation très vraisemblable d'une partie des réserves de nature lipidique au cours de cette synthèse. Dans le cas de l'élaboration de la paroi du gamétokyste, certaines observations bien qu'incomplètes montrent que l'on pourrait également la rattacher à ce schéma (PRENSIER, 1971a).

2°) Les membranes du sporozoïte

L'étude de la formation des sporozoïtes dans le sporoblaste nous a permis de mettre en évidence la précocité de l'initiation de sa genèse, et surtout le rôle prédominant joué par les membranes préexistantes ainsi que l'importance du centre cinétique dans la polarité du futur germe.

Dès la deuxième division sporogonique (la première n'a été observée que très incomplètement) les premières portions du futur complexe membranaire interne sont présentes et ont pour origine le réticulum endoplasmique. Des observations similaires ont été effectuées chez les Coccidies lors de la genèse des mérozoïtes au cours de la schizogonie. Dans ce cas, il apparaît sous la membrane cytoplasmique du schizonte des lames de matériel dense de définition variable selon les travaux, mais dont la correspondance avec le réticulum endoplasmique est plus que probable comme le signale DUBREMETZ (1975) chez Eimeria necatrix. Cet auteur suppose en outre une intervention importante du Golgi, par apport de vésicules aux membranes déjà en place. Chez Diplauxis également, certaines images peuvent laisser penser à une intervention des dictyosomes dans l'extension du complexe interne, mais qui n'est pas certaine, bien qu'avancée par nous-même (PRENSIER, 1970). En effet, la locali-

sation du dictyosome dans le sporozoïte en formation n'est pas en faveur de cette hypothèse, en tout cas en ce qui concerne la partie postérieure du germe

Dans les cas de schizogonie, qu'elle se fasse par exogenèse ou endogenèse, ou que l'on considère la formation des individus fils

chez Toxoplasma, il y a toujours relation étroite entre le début de la formation des germes infectieux et la dernière division mitotique. L'association entre les pôles du fuseau de dernière division et le plasmalemme ou des structures membranaires du type réticulum endoplasmique, est indispensable semble-t-il à l'initiation de la genèse des germes infectieux. Chez les Coccidies, cette initiation s'effectue sous le plasmalemme où se différencie une lame bimembranaire à proximité immédiate du centre cinétique qui détermine une interruption circulaire du futur complexe interne (Apex du germe). Chez Toxoplasma (VIVIER, 1970 - VIVIER et PETITPREZ, 1969-1972) l'initiation des individus fils nécessite la mise en place de membranes du réticulum endoplasmique ou du complexe interne de la cellule mère, centrée sur les pôles de division du noyau.

Ce phénomène est nettement observable chez Diplauxis et le processus de genèse des sporozoïtes relève d'un mécanisme tenant à la fois de l'exogenèse et de l'endogenèse. Normalement, la délimitation des germes pourrait se faire par évagination de la membrane plasmique du sporoblaste, mais la présence d'une paroi rigide oblige la membrane plasmique à s'invaginer, et on pourrait en quelque sorte parler d'exogenèse interne" comme l'avance PORCHET-HENNERE (1972). Le processus est très voisin de celui décrit lors de la formation des gamètes. Là aussi, en effet, c'est la membrane plasmique du gamonte qui par invagination est à l'origine de celle des gamètes.

Tous les phénomènes membranaires intervenant dans la constitution des germes infectieux des Sporozoaires semblent être calqués sur le même schéma, que l'on s'adresse à des groupes aussi différents en apparence que les Grégarines, les Coccidies ou les Hémosporidies, et nécessitent donc une intervention essentielle et directe des membranes préexistantes. La membrane plasmique forme la membrane externe du parasite et le complexe bimembranaire interne est probablement d'origine ergastoplasmique, quel que soit le groupe considéré. La difficulté essentielle de l'interprétation dans de nombreux travaux réside dans le fait que la résolution de la couche interne n'est pas toujours suffisante pour bien observer la structure en vésicules aplaties. Cependant, les travaux de MEHLHORN et coll. (1973) chez Eimeria falciformis

SENAUD et CERNA (1969) chez Eimeria magna et tenella, SHEFFIELD et HAMMOND (1967) chez Eimeria bovis, COLLEY (1968) chez Eimeria nieschulzi et de SCHMIDT JOHNSTON et STEHBENS (1967) chez Isospora montrent la constance de ce phénomène chez les Coccidies.

Chez Plasmodium, le processus d'apparition des membranes internes est équivalent (HEPLER, HUFF et SPRINZ, 1966), et dans le cas des Toxoplasmes VIVIER et PETITPREZ, 1968 et VIVIER, 1970, montrent parfaitement que le complexe interne des endozoïtes trouve son origine dans la couche membranaire interne de la cellule mère, qui n'est autre que du réticulum endoplasmique particulier. Des mécanismes similaires sont observés chez Besnoitia (SHEFFIELD 1966), Sarcocystis (SENAUD, 1967) et Frenkelia (KEPKA et SCHOLTYSECK, 1970).

Une particularité supplémentaire relative au complexe interne consiste en la présence face à celui-ci d'un certain nombre de microtubules, qui très tôt au cours de la genèse des sporozoïtes ont ^{atteint} apparemment leur nombre définitif. Leur mise en place terminale s'effectue parallèlement à l'extension des membranes internes. Cette évolution est à rapprocher des structures en écailles observées par DUBREMETZ (1975) lors de la genèse des mérozoïtes d'Eimeria necatrix, écailles bimembranaires, situées sous la membrane plasmique du germe en cours de formation, et qui se prolongent vers le cytoplasme. Deux microtubules sont associés à chaque écaille. Ceci est décrit pour la première fois très nettement chez les Coccidies et confirme les observations antérieures de ROBERTS et coll. (1970) et SHEFFIELD et HAMMOND (1966) chez Eimeria callospermophili. D'après DUBREMETZ, ces écailles pourraient être en partie formées par la coalescence de vésicules provenant de l'appareil de Golgi.

Plus récemment, les travaux de FERGUSON (1976) et DUBREMETZ et ELSNER (1979) confirment l'association entre écailles et paires de microtubules, et à partir des données nouvelles apportées par la cryofracture (PORCHET-HENNERE et TORPIER, 1977 et DUBREMETZ et TORPIER, 1978), ces auteurs supposent un rôle important joué par les microtubules dans la mise en place du complexe membranaire interne. Cette technique a également permis de démontrer que la pellicule interne est constituée par une juxtaposition de plaques dont le nombre est de moitié celui du nombre de microtubules sous-pelliculaires pour certaines espèces étudiées jusqu'alors. Chez le sporozoïte Plasmodium yoelii, il semble n'y avoir qu'une seule plaque constituant le complexe interne (DUBREMETZ et coll, 1979).

A signaler encore parmi les résultats acquis en cryofracture l'existence d'alignements longitudinaux de particules intramembranaires, dont la signification fonctionnelle n'est pas établie, mais dont les relations avec des structures sous-jacentes sont avancées. DUBREMETZ et TORPIER (1978) pensent en effet que face aux microtubules sous-pelliculaires, on trouve dans les membranes internes (faces Pm et Pi) des alignements doubles de particules, avec entre chacun d'eux un certain nombre de rangées simples. Cette disposition rappelle les alignements de ribosomes entre microtubules chez Diplauxis, mais là s'arrête la comparaison, et toute relation entre ribosomes et particules intramembranaires est purement spéculative (Il n'a jamais été montré d'agencements réguliers de ribosomes sous-pelliculaires chez les espèces étudiées en cryofracture).

3°) Le centre cinétique

Chez la plupart des germes infectieux de Sporozoaires, à l'apex de ceux-ci, en avant du noyau et à proximité du centrocône ou du centriole lorsqu'ils existent, se différencie un organe particulier en forme de tron de cône, le conoïde. DUBREMETZ (1971-1975) observe même une relation entre centriole et centrocône en cours de genèse sous la forme d'un élément allongé en "bandelette dense venant se terminer à l'intérieur de l'organe apical".

Le conoïde est présent chez les sporozoïtes de toutes les Coccidies et la plupart des Grégarines, mais absent chez les Hémospories et les Piroplasmes (SCHOLTYSECK, MELHORN et FRIEDHOFF (1970), PORCHET-HENNERE et VIVIER (1971) et également chez les Diplauxis (PRENSIER (1971), PORCHET-HENNERE et FISHER (1973)). L'absence de conoïde chez Diplauxis sp., comme chez les Hémospories et Piroplasmes, est peut-être à mettre en relation avec l'absence de structure centriolaire définie. En effet, il n'a jamais été décrit de centriole chez ces espèces alors qu'il en existe chez celles dont le sporozoïte présente un conoïde. BEYER (1978), par contre, établit une relation entre présence ou non de conoïde et mécanisme de transmission de l'agent infectieux. Cet auteur pense que le conoïde est présent dans les cas où le cycle implique une transmission par voie intestinale et donc un passage transépithélial. Ceci est en contradiction avec nos propres observations et nous penchons plutôt pour une relation centriole-centrocône.

En ce qui concerne les microtubules sous-pelliculaires, DUBRE-METZ (1975) chez Eimeria necatrix montre que "leur naissance est associée à un anneau discontinu de structure périodique constitué de 11 unités correspondant aux 11 paires de microtubules". Cet élément devient l'anneau d'insertion décrit chez les germes infectieux mûrs des Sporozoaires (PORCHET-HENNERE et VIVIER, 1971). PORCHET-HENNERE et RICHARD, (1971) observent pour leur part une convergence de microtubules autour d'un centriole lors de la différenciation des mérozoïtes d'Aggregata et supposent que cet organite est responsable de leur genèse. Pour notre part, nous n'avons jamais observé d'anneau d'insertion antérieur, les microtubules sous pelliculaires paraissent fixés sur une zone plus dense du pourtour de l'interruption circulaire antérieure du complexe interne. Il est à constater de plus que c'est le centre cinétique non structuré localisé à cet endroit qui est responsable de leur synthèse, et celle-ci démarre très précocément. Dans la zone antérieure du germe en différenciation, existe probablement déjà le nombre définitif de microtubules sous-pelliculaires qui évoluent toujours parallèlement à l'extension du complexe interne. Cette association étroite entre le développement des membranes internes et celui des microtubules sous-pelliculaires nous laisse supposer, comme DUBRE-METZ (1975) que les tubules jouent dès le départ un rôle de cytosquelette favorisant une mise en place correcte des membranes du futur sporozoïte, un peu comme les baleines dirigent l'ouverture d'un parapluie.

4°) Le rôle du dictyosome dans la genèse des organites antérieurs (micronèmes-rhoptries)

Les micronèmes et rhoptries sont des inclusions caractéristiques de la plupart des germes infectieux de Sporozoaires (PORCHET-HENNERE et VIVIER (1971) et SCHOLTYSECK et MEHLHORN (1970)). Il existe une distinction ultrastructurale nette entre les deux types d'organites, bien que certains auteurs les aient parfois confondus (VIVIER et PETITPREZ, 1972) et que d'autres suggèrent une relation fonctionnelle entre eux (SCHOLTYSECK et MEHLHORN, 1970). Chez Eimeria stiedae, HELLER (1972) pense qu'ils ont une origine commune, résultant de l'allongement d'une formation unique. Ce n'est pas le cas chez Diplauxis où l'on peut observer avec suffisamment de précision leur origine et leur évolution. Bien que tous deux d'origine golgienne, ces organites se forment de façon très différente. D'une part le dictyosome émet latéralement

à ses saccules de petites vésicules au contenu peu dense, qui s'opacifie progressivement pour former des inclusions sphériques décrites auparavant. Ces inclusions migrent vers l'apex du sporozoïte en cours de maturation, se soudent entre elles pour former des éléments ovoïdes qui se pédiculisent. Le goulot qui se différencie vient, dans le sporozoïte achevé, se terminer sur la portion de membrane cytoplasmique antérieure libre. Ces inclusions constituent sans conteste les micronèmes et DUBREMETZ (1975) suppose un processus de formation identique chez Eimeria necatrix.

Quant à la rhoptrie, qui est unique chez Diplaxia, alors qu'il en existe plusieurs chez la plupart des autres Sporozoaires (PORCHET-HENNERE et VIVIER (1971) et SCHOLTYSECK et MEHLHORN (1970)), elle se différencie plus tardivement, comme chez Eimeria necatrix. On observe cependant relativement tôt au cours de la sporogénèse la formation d'une vacuole au contenu peu dense à partir de la face externe du dictyosome. Cette vacuole tout en s'agrandissant s'ovalise, puis se pédiculise pour venir s'aboucher sur la membrane cytoplasmique en même temps que les micronèmes (voir mécanisme d'infestation). D'autres auteurs supposent une origine golgienne des rhoptries (VIVIER et coll., 1972, 1973, 1974) et DUBREMETZ (1975) mais sans en apporter la démonstration. Par contre, leur évolution finale, et en particulier la variation d'homogénéité et de densité de leur contenu est bien décrite.

Le rôle des micronèmes et rhoptries n'a jusqu'alors été que supposé, et aucune théorie valable ne s'est imposée.

5°) Les réserves

Un dernier point de la discussion concerne les réserves polysaccharidiques. L'amylopectine (RYLEY et coll. (1969) et SCHREVEL (1971)) est présente chez tous les germes infectieux de Sporozoaires sauf les Hémosporidies et les Piroplasmies (PORCHET-HENNERE et VIVIER (1971)) et constitue une part importante de leur volume, en particulier dans le sporoblaste qui est la forme de résistance et de dissémination. Lors de la sporogénèse, il est net que ces inclusions ne sont pas incorporées dans les sporozoïtes. Cependant, ceux-ci contiennent une quantité assez conséquente d'amylopectine nouvellement formée. Jusqu'alors, le lieu de synthèse n'est pas bien défini (SCHREVEL, 1971) mais comme VIVIER et coll. (1972) chez Hepatozoon, nous avons observé une association étroite entre les grains d'amylopectine et le réticulum endoplasmique à la fois dans le trophozoïte (PRENSIER, 1971), le zygote et le sporozoïte.

Nous n'avons par contre jamais noté l'association avec des mitochondries comme le montrent PORCHET-HENNERE et RICHARD (1971) chez Aggregata eberthi

CHAPITRE V

LE MECANISME DE L'INFESTATION

I - L'EXCYSTATION

Le mécanisme d'infestation a été étudié sur de jeunes larves de Perinereis obtenues par fécondations artificielles en laboratoire. Les spores de Diplauxis sont recueillies sur des Néreis épitoques, et lavées abondamment. Pour suivre la cinétique d'infestation, il fallait initialement savoir au terme de quelle période les sporozoïtes infestant étaient susceptibles d'être libérés des sporocystes. Il a donc été nécessaire d'étudier l'excystation *in vitro*.

a) Excystation in vitro

Un certain nombre d'intestins complets sont récupérés sur de jeunes néreis d'un an, et broyés au mortier. Le liquide exudant, mélangé à un faible volume d'eau de mer est recueilli dans un tube capillaire et centrifugé à 2 500 t/mm pendant 10 mn. Le surnageant est repris, déposé sur une lame, et on y ajoute quelques sporokystes parfaitement mûrs. La préparation est montée entre lame et lamelle lutée à la vaseline de façon à éviter le dessèchement. L'enveloppe des sporokystes est ensuite craquée par pression sur la lamelle couvre-objet, et les spores sont libérées dans le liquide intestinal. L'observation continue au microscope interférentiel montre qu'au bout de 6 H environ, des mouvements commencent à se produire à l'intérieur des spores. A partir de ce moment, des sporozoïtes mobiles sortent des spores, par le goutot antérieur (Fig. 1). Le processus d'excystation nécessite donc *in vitro* environ 6 heures d'action du liquide intestinal.

A partir de ces données, il était possible de passer à la phase d'infestation expérimentale avec un maximum de chances de réussite. La technique utilisée est décrite au chapitre MATERIEL et METHODES.

b) Excystation in vivo

En fixant des larves de Perinereis environ 6 à 8 H après ingestion de spores de leur parasite coelomique, il a été possible de suivre l'excystation in vivo, en ultrastructure.

Les spores ingérées par les larves se trouvent dans la partie antérieure de l'intestin primitif, qui est parfois fortement dilaté tant la quantité de spores avalées est importante (Fig. q, r).

L'étude au microscope électronique de coupes ultrafines de larves incluses à ce stade montre que leur lumière intestinale contient de nombreux sporocystes, généralement très mal fixés. Cependant, parmi ceux-ci, un certain nombre qui sont sur le point de libérer leurs sporozoïtes, ou en cours d'excystation sont correctement conservés et donc observables. Il est utile de rappeler la structure du goulot antérieur de la spore. Celui-ci présente une zone en forme de dôme, à striation régulière d'une période d'environ 10 nm orientée dans le sens du plus grand axe du sporocyste (Fig. 140). Les deux couches principales de la paroi, assimilées à une endospore et une exospore sont nettement séparées à la partie supérieure du dôme (Fig. 139). Elles délimitent un espace assez large apparemment vide. Les sporozoïtes sont encore étroitement accolés les uns aux autres (Fig. 135, 136).

Le stade ultérieur de l'excystation consiste en une désorganisation de la structure périodique du dôme. On se rend compte alors que le goulot est formé par un agencement régulier de filaments (Fig. 139) qui à fort grossissement en coupe transversale apparaissent sous l'aspect de tubules à paroi lâche d'un diamètre d'environ 10 nm. L'espace libre antérieur entre l'endospore et l'exospore présente également quelques éléments fibrillo-tubulaires, qui annoncent l'ouverture proche du goulot. Celle-ci s'effectue par soulèvement d'une calotte de l'exospore qui se dégage latéralement comme un clapet (Fig. 143). L'endospore craque à son tour et les filaments constituant le dôme se dispersent en partie vers l'extérieur, mais gardent un agencement relativement régulier sur le pourtour du goulot. Il y a formation d'une zone d'étranglement par laquelle vont sortir les sporozoïtes. Ceux-ci sont alors nettement séparés les uns des autres et sortent successivement par le goulot (Fig. 145). Ils sont parfaitement mobiles, de structure identique à celle des germes intrasporocytaires. L'alignement régulier des ribosomes sous la pellicule, entre les microtubules sous pelliculaires est particulièrement net (Fig. 145).

Quand les huit sporozoïtes sont sortis, il ne subsiste plus que la paroi de la spore et le reliquat cytoplasmique constitué essentiellement par les globules lipidiques et les grains d'amylopectine non incorporés par les germes infectieux (Fig. 144). Ce reliquat semble nettement moins important que celui du jeune sporocyste (Fig. 129) ce qui suppose une utilisation des réserves du sporoblaste par les sporozoïtes en cours de maturation, réserves utilisées pour leur propre métabolisme.

II - LA CINÉTIQUE D'INFESTATION

Nous allons tout d'abord étudier la cinétique de pénétration des sporozoïtes dans l'épithélium intestinal, qui a été suivie en fixant des larves à des temps de 6 H, 19 H, 24 H, 48 H et 96 H après ingestion de spores. Les transformations morphologiques subies par les sporozoïtes seront vues ultérieurement.

a) Temps 6 H

De nombreux sporozoïtes sont libres dans la lumière intestinale (Fig. c et 146) et déjà on peut observer des germes en cours de pénétration dans l'épithélium intestinal. Ceci nous laisse supposer que les sporozoïtes passent très peu de temps dans la lumière intestinale et pénètrent immédiatement dans l'épithélium.

b) Temps 19 H - 24 H

Une vue d'ensemble montre les sporozoïtes en cours de migration vers la basale de l'épithélium intestinal (Fig. 147). En fonction du moment où ils ont été libérés, ils se trouvent plus ou moins avancés dans leur progression. Un certain nombre d'entre eux ont déjà pratiquement atteint le pôle basal des cellules épithéliales, alors que d'autres se trouvent seulement à mi parcours.

c) Temps 48 - 96 H

A partir de 48 H après infestation, tous les sporozoïtes ont atteint le pôle basal des cellules intestinales (Fig. 154) et se trouvent très

près de la membrane basale constituée par une lame dense continue. Il est frappant à ce stade d'infestation de constater que les germes sont presque toujours associés deux par deux et qu'ils ne sont pas intracellulaires (Fig. 155, 159). La cellule épithéliale présente du côté coelomique une membrane cytoplasmique à nombreux replis, et les jeunes parasites sont logés dans le creux de ces invaginations.

Les étapes ultérieures de l'évolution des parasites n'ont pas été suivies en microscopie électronique pour des raisons à la fois techniques et de matériel, mais ont été observées par contre en microscopie optique. Environ 6 jours après infestation, on retrouve dans la circulation sanguine des jeunes larves (vaisseau sanguin dorsal) de très petites syzygies qui vont rapidement gagner le coelome (Fig. q). Le passage dans la circulation s'effectue vraisemblablement par l'intermédiaire du sinus sanguin péri-intestinal comme tendent à le montrer les travaux de PORCHET-HENNERE et FISHER (1973) sur une espèce très voisine : Diplauxis schreveli, qui subit la majeure partie de sa croissance dans ce sinus.

Seule la mise en syzygie n'a pu être observée directement, mais la disposition en couple au pôle basal des cellules et le rapprochement très étroit de deux individus pourraient bien être le signe d'un accouplement prochain et donc extrêmement précoce si l'on considère que le cycle naturel complet du parasite s'étale sur trois ans.

III - LES MODIFICATIONS ULTRASTRUCTURALES DES GERMES INFECTIEUX AU COURS DU PASSAGE TRANSEPIHELIAL

Celles-ci sont rapides et fonction au départ de la position des sporozoïtes dans l'épithélium intestinal de la larve. Elles intéressent à la fois la forme du parasite, sa paroi limitante, et ses organites cytoplasmiques.

Dès la pénétration dans l'épithélium, les sporozoïtes se raccourcissent notablement, deviennent nettement ovalaires (Fig. 147). La zone antérieure est dirigée généralement vers le coelome de la larve et apparaît toujours bien différenciée. Les membranes limitantes ne sont pas modifiées. En ce qui concerne les organites cytoplasmiques, leur polarité, évidente dans les sporozoïtes, s'estompe. La cellule se différencie à plusieurs niveaux. Les microtubules sous-pelliculaires perdent leur agencement régulier, surtout à la partie postérieure (Fig. 148) par suite du raccourcissement du

parasite. Les ribosomes se dispersent dans le cytoplasme et chose très caractéristique, le réticulum endoplasmique granulaire se reconstitue. Celui-ci est souvent en relation avec l'enveloppe nucléaire (Fig. 148) et englobe les réserves d'amylopectine très abondantes.

Les organites antérieurs qui caractérisent le sporozoïte (micronèmes et rhoptries) subissent eux-aussi une nette évolution. La rhoptrie, dès que le sporozoïte a pénétré dans l'épithélium intestinal apparaît complètement vidée de son contenu et plus ou moins vacuolisée (Fig. 148-150). Les micronèmes quant à eux sont encore à ce stade relativement abondants et identiques d'aspect à ceux du sporozoïte (Fig. 148-153). Les germes en cours de migration apparaissent souvent situés dans les espaces intercellulaires (Fig. 152), qui doivent être la voie qu'ils utilisent pour leur cheminement. Si parfois ils semblent avoir une localisation intracellulaire (Fig. 149), la réaction au lanthane tend à prouver qu'ils gardent une communication avec le milieu extracellulaire. Cette réaction, pratiquée sur des larves 24 H après ingestion de spores, révèle sur le pourtour des parasites un précipité d'hydroxyde de lanthane qui a pour propriété de s'insinuer dans les espaces intercellulaires (Fig. 163, 164, 165). Ceci est encore plus net, comme nous l'avons signalé précédemment pour des stades d'infestation plus avancés (Fig. 159).

A une phase plus tardive de la pénétration, les germes sont franchement ovalaires, et ont même tendance à s'écraser dans le sens antéro-postérieur (Fig. 151).

La membrane externe n'est pas modifiée, mais par contre, le complexe interne apparaît plus ou moins discontinu (Fig. 158). Des invaginations de celui-ci sont souvent visibles, constituant des structures qui rappellent les micropores, mais qui en fait n'en sont pas (Fig. 158). Il n'est pas exclu que ces invaginations soient en relation avec le réticulum endoplasmique et donc pourraient participer à son édification dans le parasite en évolution. L'enrichissement en réticulum est très net (Fig. 156).

La relation entre le réticulum granulaire et l'enveloppe nucléaire (Fig. 156-159), la participation de celle-ci dans l'élaboration du dictyosome (Fig. 155, 157, 159) ainsi que la présence d'abondants et larges pores nucléaires (Fig. 155, 156) sont les signes d'une activité métabolique très importante.

La rhoptrie, dont le goulot vient s'aboucher sur la membrane plasmique à l'apex du germe (Fig. 162) est complètement vidée, et se retrouve sous

la forme d'un amas de membranes vésiculées avec quelques petites vacuoles au contenu dense plus ou moins hétérogène (Fig. 160, 162).

La quantité de micronèmes, semble diminuer par rapport à ce qu'elle est dans le sporozoïte intrasporocystaire, mais ceci s'effectue plus tardivement à partir de 48 à 96 H d'infestation.

Les réserves d'amylopectine paraissent également diminuer, mais l'on peut par contre noter l'apparition des globules lipidiques (Fig. 151, 159, 162).

IV - DISCUSSION

Si l'ultrastructure des trophozoïtes a été abondamment étudiée chez les Grégarines (voir VIVIER et coll., 1970), celle des germes infectieux (schizozoïtes et surtout sporozoïtes), ainsi que le mécanisme de leur élaboration sont de loin moins bien connus. Dans les trois grands groupes établis par GRASSE (1953), seules quelques espèces ont été étudiées : chez les Archigrégarines, Selenidium hollandei (SCHREVEL, 1968) ; chez les Eugrégarines, Porospora soyeri (DESSPORTES et THEODORIDES, 1965), Stylocephalus africanus (DESSPORTES, 1967), Lankesteria culicis (SHEFFIELD, GARNHAM et SHIROISHI, 1971), Diplauxis hatti (PRENSIER, 1970), Diplauxis schreveli (PORCHET-FIENNERE et FISHER, 1973) et chez les Néogrégarines Gigaductus anchi (ORMIERES, 1971) et Mattesia oryzaephili (ORMIERES, LOUIS et KUHL, 1972). Ces résultats sont souvent très partiels, et notre travail ainsi que celui de TRONCHIN et SCHREVEL (1977) sont les seuls à décrire les modifications ultrastructurales subies par le sporozoïte ou schizozoïte au moment de l'infestation. Les travaux sur ce sujet ne sont pas très nombreux non plus chez les autres Sporozoaires et intéressent surtout la phase de pénétration. Les éléments essentiels concernent les Eimeria (ROBERTS, SPEER et HAMMOND (1971), SCHOLTYSECK et CHOBOTAR (1975), IENSEN et HAMMOND (1975)), les Plasmodium (LAEDA, AIKAWA et SPRINZ (1969), AIKAWA, MILLER, JOHNSON et RABBEGE (1978)), les Babesia (RUDZINSKA, TRAGER, LEWENGRUB et GUBERT (1976)) et les Toxoplasma (AIKAWA, KOMATA, ASAI, MIDORIKAWA (1977), TAKEUCHI (1977)) mais ne présentent pas de façon précise les modifications ultrastructurales des germes infectieux au tout début du développement. On peut considérer que le seul travail concernant ce problème est celui de ROBERTS, HAMMOND et SPEER (1970) chez Eimeria callospermophili, mais encore apporte-t-il peu de renseignements concernant les organites antérieurs et met surtout en évidence une augmentation de l'activité synthétique du

sporozoïte intracellulaire par augmentation du réticulum endoplasmique granulaire et gonflement du noyau. La formation de polysomes est également signalée par LADDA (1969) sur des Plasmodium nouvellement intraérythrocytaires. Ceci est comparable chez Diplauxis où la réapparition du réticulum endoplasmique granulaire est nette et rapide (avant 24 H).

Les renseignements relatifs au devenir des microtubules sous-pelliculaires sont à notre connaissance inexistant, mais leur désorganisation doit être rapide et s'accompagne d'une ovalisation des sporozoïtes.

Chez Diplauxis, le parasite est toujours entièrement limité par la membrane plasmique de la cellule intestinale et probablement il utilise la voie intercellulaire pour sa migration vers le coelome de son hôte. Ceci peut se comprendre par le fait que le sporozoïte de Diplauxis ne fait que traverser l'épithélium intestinal pour gagner rapidement sa position définitive, le coelome. A la différence des phases de schizogonie des autres Sporozoaires, il ne subit pas de développement intracellulaire mais seulement une différenciation. A signaler que chez Eimeria magna (JENSEN et HAMMOND, 1975, JENSEN et EDGAR (1976) et chez Babesia microti (RUDZINSKA et coll. (1976) le sporozoïte infestant n'apparaît pas toujours englobé dans une vacuole hôte, qui se désorganise rapidement après pénétration. Ceci ne semble pas être le cas des Plasmodium (LADDA et coll., 1969, BANNISTER et coll., 1975, AIKAWA et coll., 1978) où le germe infectieux apparaît toujours enfermé dans une vacuole dérivant du plasmalemma de l'hématie.

En ce qui concerne le rôle des organites antérieurs (micronèmes - rhoptrie) dans la pénétration, nous ne pouvons actuellement qu'avancer des suppositions. Ce qui semble acquis, c'est que la rhoptrie se vide très rapidement de son contenu, d'une part, et d'autre part que la quantité de micronèmes diminue pendant le début de l'infestation.

Pour les rhoptries, leur rôle doit être prédominant pendant la phase de pénétration et leur action débiter dès l'accolement entre la partie antérieure du sporozoïte et la cellule cible. Les travaux de JENSEN et EDGAR (1976) semblent confirmer ceci et les auteurs supposent une activité sécrétoire des rhoptries entraînant des modifications membranaires de la cellule hôte, bien que celle-ci reste apparemment intacte. Il y a cependant formation de vésicule dans la cellule hôte en face de l'apex du sporozoïte et celui-ci est recouvert extérieurement par du matériel qui pourrait provenir des rhoptries. Chez Eimeria magna

comme chez Diplauxis, les rhoptries paraissent vidées de leur contenu vers la fin de la pénétration et elles pourraient donc bien avoir une fonction sécrétoire et servir essentiellement à la pénétration comme cela a été souvent supposé (voir SCHOLTYSECK et MEHLHORN, 1970). Certains auteurs pensent que ces sécrétions sont de nature protéolytique (SCHOLTYSECK et MEHLHORN, 1970, NORRBY et coll., 1968, LYCKE et coll., 1965) mais cette solution n'est pas la seule plausible car la substance sécrétée peut agir tout simplement en changeant les caractéristiques membranaires de la surface cellulaire ainsi que le suggèrent LADDA et coll., 1969. Plus récemment, BANNISTER et coll., 1975, en étudiant la pénétration de Plasmodium knowlesi dans les hématies de singe émettent l'hypothèse que les substances sécrétées par les rhoptries ou les micronèmes peuvent être incorporées à la membrane de la cellule hôte et, en désorganisant les couches phospholipidiques, favoriseraient une invagination de la membrane. Un tel effet correspondrait au modèle de SHEETZ et SINGER (1974) qui montrent qu'une substance "hétéropolaire" comme les anesthésiques produit des invaginations de la membrane plasmique des globules rouges par suite de l'expansion plus rapide de son feuillet interne, mais cette théorie est actuellement controversée.

Il est possible également que les rhoptries contiennent des substances similaires au polypeptide riche en histidine qui paraît associé aux rhoptries chez Plasmodium lophurae (KILETIAN, 1976). De tels polymères d'acides basiques peuvent entraîner de nombreuses modifications dans les membranes cellulaires (perte de la rigidité structurale, baisse de la perméabilité, désorganisation membranaire (MAMMELAK et coll., 1969, QUINTON et PHILPOTT, 1973).

En ce qui concerne les réserves polysaccharidiques, elles sont toujours abondantes dans le sporozoïte en cours de passage, contrairement à ce qu'observent TRONCHIN et SCHREVEL chez Gregarina blaberae. Dans ce cas, les réserves d'amylopectine n'apparaissent que 4 à 5 jours après infestation. Il faut préciser qu'ici le sporozoïte n'a pas à traverser l'épithélium intestinal où il se fixe directement par sa partie antérieure. On peut donc supposer que la dépense énergétique est beaucoup moins importante et ne nécessite pas l'utilisation d'une grande quantité de réserves polysaccharidiques qui n'apparaîtront donc qu'au cours de la phase de croissance végétative

CHAPITRE VI : ACTION DE L'HORMONE CEREBRALE DE PERINEREIS
SUR LA CROISSANCE DE DIPLAUXIS

I INTRODUCTION.

La démonstration de l'existence d'hormone chez les Nereidae repose essentiellement sur des données expérimentales et dans les conditions actuelles, aucun organe endocrine propre n'est connu chez les Annélides Polychètes, l'hormone étant semble-t-il une neurosécrétion (DHAINAUT-COURTOIS. 1966 à 1970, GOLDING 1967). Bien que la fraction active du principe hormonal soit isolée (CARDON 1970) sa structure précise n'est pas encore connue.

En ce qui concerne le rôle de cette substance hormonale c'est actuellement essentiellement celui sur la maturation génitale qui est étudié. Ces recherches sont grandement facilitées par l'utilisation des cultures organotypiques mises au point par DURCHON, et Nereis diversicolor paraît être à ce point de vue un matériel de choix. Avec Perinereis cultrifera, l'impossibilité d'obtenir des cultures de ce type réduit de beaucoup le champ des expérimentations. Cependant, c'est chez cette espèce que l'on trouve la plus nette influence de l'hormone sur les cellules effectrices.

Le problème qui nous intéresse est relatif au mécanisme du blocage de la croissance du parasite coelomique de P. cultrifera par l'hormone. Vers les années 1960, l'essentiel de l'étude expérimentale a été réalisé par DURCHON et VIVIER (1961)1964), et l'effet d'inhibition du développement de Diplauxis par une substance d'origine cérébrale parfaitement démontré.

A partir de ce support expérimental, des recherches ont été entreprises en vue de préciser ce mécanisme de blocage et nous avons été amené à utiliser différentes méthodes qui, soulignons le, ne nous ont pas donné des résultats entièrement satisfaisants.

Dans un premier temps, il paraissait intéressant de pouvoir expérimenter sur des parasites maintenus en survie en milieu artificiel, de façon à se placer dans des conditions bien définies et reproductibles. Ceci avait pour but de faciliter une étude autoradiographique, en haute résolution et par comptage à scintillation liquide. Les quelques résultats obtenus étant inexploitable, nous avons repris l'expérimentation in vivo, en considérant essentiellement les modifications cytologiques de différents stades de la croissance végétative de Diplauxis, ceux-ci ayant subi un blocage de leur développement plus ou moins prolongé par l'hormone cérébrale de l'hôte.

Dans ce chapitre seront présentés les éléments positifs acquis à la suite des expérimentations in vitro et in vivo.

II Essais de maintien en survie des trophozoïtes de Diplauxis en milieu artificiel.

La mise en culture cellulaire avait donc pour but essentiel de pouvoir se placer dans des conditions expérimentales définies, et il fallait dans un premier temps obtenir une survie suffisamment longue des parasites, ainsi qu'une bonne conservation de leurs structures cellulaires.

Après plusieurs tentatives infructueuses dans des milieux dérivés de ceux utilisés pour les cultures cellulaires de mammifères, nous avons testé un certain nombre de milieux employés par COUSSERANS (1975) pour la culture de cellules de mollusques marins. Parmi ceux-ci, seul le milieu X permettait au départ une survie suffisamment longue des trophozoïtes pour être retenu. La composition de ce milieu est la suivante :

Solution organique de TC 199 x 5	40 ml
Antibiotiques	
Sérum de veau foetal	10 ml
Sérum de poulet	5 ml
Eau de mer ultrafiltrée	100 ml
Hydrolysate de lactalbumine 500 mg	
Glucose	100 mg

Pour la mise en culture, les trophozoïtes de Diplauxis en même temps que des cellules coelomiques de l'hôte sont prélevés stérilement de la façon suivante : Les Perinereis subissent plusieurs lavages à l'eau de mer stérile puis sont exposées pendant deux heures aux Ultra-violet en salle stérile. Elles sont ensuite séchées à l'aide de papier filtre stérile sous la hotte à flux laminaire, puis ponctionnées avec une micropipette, en prenant soin de ne pas léser le tube digestif. La ponction est introduite dans des boîtes Falcon contenant le milieu de culture. Le pH du milieu est ajusté soit au tampon Hepes, soit tout simplement en insufflant un peu de gaz carbonique dans la boîte. Le pH est alors voisin de 7,2 - 7,3, et donne les meilleurs résultats.

Lors des premières tentatives avec le milieu X de COUSSERANS non modifié, si les cellules sanguines et coelomiques de Perinereis s'étalent parfaitement, les trophozoïtes de Diplauxis présentent après 24h. des anomalies de leur paroi.

De façon à améliorer les résultats, plusieurs modifications du milieu de base ont été faites, et la meilleure survie a été obtenue avec le milieu suivant :

TC 199 eau de mer	20 ml
Sérum de veau foetal	5 ml
Eau de mer	50 ml
Glucose	100 mg
Hydrolysate de lactalbumine	250 mg
Na H CO ₃	35 mg
KCl	50 mg

La pression osmotique est alors plus basse que celle de l'eau de mer, se situant aux environs de 900 milliosmoles. Si l'on considère les cellules de l'hôte, leur étalement s'effectue rapidement (Figs 167-168) et leur survie atteint dans certains cas plus d'un mois (Fig 172). En ce qui concerne les trophozoïtes, la durée de survie est fonction essentiellement de leur stade de développement. Les jeunes syzygies (environ 30 μm de longueur) sont animées de mouvements pendulaires pendant près d'une semaine (Figs 169-170). Par contre, les trophozoïtes plus âgés (200 μm de longueur) ne survivent correctement que pendant 48h. (Fig 171). En remarque, signalons que les couples à mouvements péristaltiques (plus de 250 μm) résistent très mal à la mise en culture.

Néanmoins, il nous semblait possible de réaliser des expérimentations simples sur les jeunes individus végétatifs. Là se présentait une difficulté majeure, relative au grand volume des boîtes Falcon en rapport avec le nombre et la taille des parasites qui y sont introduits. Nous avons alors testé le même milieu en petites salières recouvertes d'une lamelle lutée à la vaseline. Les conditions de pH sont dans ce cas moins contrôlables et la survie moins bonne. Toutefois, des incorporations d'Uridine et de Leucine tritiées ont été réalisées sur deux séries de trophozoïtes placés dans des conditions hormonales différentes.

Un premier lot de parasite, ponctionné sur une Nereis décérébrée depuis 7 jours est placé dans le milieu de culture contenant les éléments radioactifs (Uridine ou Leucine) à raison de 25 $\mu\text{Ci/ml}$. Un deuxième lot de trophozoïtes provient du même hôte, mais est placé dans le milieu contenant également deux cerveaux de jeunes Nereis d'un an.

L'incorporation des précurseurs radioactifs est pratiquée 24h. après la mise en culture, dans les mêmes conditions que le 1er lot, toujours en présence de cerveaux.

Les expériences ont été renouvelées, et dans les deux séries, nous n'avons obtenu aucun marquage significatif après deux mois et demi d'exposition. Il semble d'après les résultats obtenus que les trophozoïtes, malgré leur aspect apparemment normal subissent à la mise en culture des modifications essentiellement au niveau de leur complexe membranaire, et qui empêchent l'incorporation correcte des substances radioactives.

A la suite de celà, nous avons abandonné les expérimentations in vitro.

III Expérimentation in vivo

1) Expériences de greffes de cerveaux sur animaux décérébrés

DURCHON et VIVIER (1964) ont parfaitement démontré que la croissance des parasites coelomiques de Perinereis est bloquée lorsque à des animaux décérébrés depuis quelque temps on injecte dans leur cavité coelomique des cerveaux actifs d'autres vers. Ces greffes de cerveaux sont apparemment réalisées sur des Nereis qui présentent des trophozoïtes coelomiques d'une longueur d'environ 150 μm .

La phase de croissance des syzygies de Diplauxis se caractérise par deux étapes essentielles : trophozoïtes à mouvements pendulaires (de 20 μm de longueur à environ 250 μm), trophozoïtes à mouvements péristaltiques (de 250 μm à 600 μm). Il paraissait intéressant de compléter les travaux antérieurs en étudiant l'effet de réimplantations de cerveaux actifs sur des Nereis présentant des parasites aux différents stades de croissance.

Pour ce faire, deux cerveaux de jeunes Nereis de un an sont réimplantés à trois lots de six animaux qui ont subit la décérébration depuis 7 jours (lot1) 20 jours (lot 2) 28 jours (lot 3). Tous les animaux sont maintenus à 16°C.

Au moment de la greffe, les stades de développement sont les suivants :

- Lot 1 : Les vers présentent dans leur coelome des syzygies d'une longueur d'environ 100 μm , qui sont animées de mouvements pendulaires rapides.

- Lot 2 : Les trophozoïtes ont atteint une taille de 200 à 250 μ m et la plupart d'entre eux sont doués de mouvements à la limite pendulaire-péristaltique.

- Lot 3 : Pour ce lot, les individus végétatifs sont de grande taille (400 à 500 μ m) et présentent des mouvements péristaltiques caractéristiques de la fin de croissance végétative.

La croissance des parasites en absence d'hormone est rapide. Après réimplantation coelomique de cerveaux, des contrôles ont été effectués à 3, 7 et 12 jours.

- a) Contrôle après 3 jours

Il n'y a pas de différences notables entre les parasites observés à ce moment et ceux vus au contrôle de début d'expérimentation, ceci pour les trois lots.

- b) Contrôle après 7 jours

Des différences importantes sont à noter avec les observations réalisées avant la greffe de cerveaux suivant le lot considéré.

- Lot 1 : Les parasites paraissent identiques en nombre et en taille à ce qui a été noté lors de la 1ère vérification.

- Lot 2 : Dans ce lot, les syzygies, si leur nombre ne paraît pas avoir varié, leur aspect est différent de trophozoïtes témoins de même stade. Les couples, bien que de longueur identique sont plus trapus, et présentent des microvillosités épicytaires beaucoup moins abondantes. De plus le cytoplasme apparaît plus granuleux.

- Lot 3 : Dans ce cas, les trophozoïtes à mouvements péristaltiques ne sont plus retrouvés dans les ponctions. Il ne subsiste que quelques rares syzygies à mouvements pendulaires qui avaient dès le début d'expérimentation un retard de croissance.

- c) Contrôle après 12 jours

- Lot 1. Observations analogues aux précédentes. Trois animaux de ce lot ont été conservés pendant 1 mois 1/2 sans que les parasites ne subissent d'évolution. On peut considérer que le blocage de croissance de ces stades par l'hormone cérébrale de l'hôte est très net.

Lot 2. Pour ces Nereis, qui présentaient en début d'expérience d'assez nombreux trophozoïtes à mouvements pendulaires-péristaltiques, les ponctions coelomiques ne montrent que quelques couples à mouvements pendulaires, en retard de croissance. L'effet de réimplantation de cerveaux est identique à celui noté dans le lot 3 à 7 jours, c'est à dire que les perturbations sont telles qu'elles entraînent la mort des parasites

Lot 3. Identique à l'observation à 7 jours.

Les conclusions tirées de cette première série expérimentale nous ont donné l'idée d'étudier à la fois les modifications ultrastructurales provoquées par le blocage hormonal, et les perturbations de certains métabolisme ceci par autoradiographie à haute résolution.

Les deux études ont été menées en parallèle, et si nous avons pu obtenir quelques résultats pour le premier point, l'étude autoradiographique s'est heurtée à plusieurs difficultés majeures. Tout d'abord parmi les animaux expérimentés, les parasitémies sont très variables, mais en général très peu importantes.

Ensuite, il faut effectuer une recherche fastidieuse des trophozoïtes en coupe semi-fine, avec un succès très faible. De plus d'étude de l'incorporation d'Uridine radioactive nécessite l'observation de coupes passant par le noyau et le nucléole.

Ceci fait que sur toute la série expérimentale, seules quelques syzygies ont pu être observées, et l'étude autoradiographique a du être abandonnée.

Ne seront donc présentés ici que les quelques résultats concernant les modifications cytologiques des parasites. Ces éléments, bien que partiels sont assez significatifs pour nous laisser entrevoir quelques aspects de l'influence hormonale.

2) Modifications ultrastructurales subies par les trophozoïtes après action de l'hormone cérébrale de Perinereis.

Parmi celles-ci, il sera considéré trois aspects qui concernent : le complexe membranaire périphérique, les inclusions cytoplasmiques, le noyau. Avant d'aborder ceci, il faut rappeler la structure normale des trophozoïtes.

a) Ultrastructure des trophozoïtes en croissance normale

Les individus témoins présentent un complexe membranaire périphérique nettement différencié, constitué d'une membrane externe doublée intérieurement par un ensemble de saccules aplatis jointifs et que l'on sait dérivés du réticulum endoplasmique. La paroi émet de nombreux diverticules du type microvillosités (Figs 173-174).

Les inclusions cytoplasmiques sont nombreuses et de différentes natures : globules lipidiques plus ou moins abondants selon la phase de croissance, granules d'amylopectine qui acquièrent leur aspect classique sur les trophozoïtes en fin de mouvements pendulaires (Fig 177), petites inclusions denses limitées par une membrane et peu abondantes. Pour ces dernières, il faut noter que sur des individus en croissance normale, elles sont souvent observées en contact avec le complexe membranaire interne et viennent sembler t-il crever en surface. Il est possible que ce type d'inclusion participe à la croissance membranaire, et peut-être à la constitution d'une couche externe à rôle protecteur rappelant le cell-coat (Fig 174).

Le noyau bien arrondi à la coupe a un nucléoplasme de structure granulaire et homogène. Un volumineux nucléole est visible sur le Fig 173 et résulte d'une concentration plus importante du matériel granulaire du nucléoplasme.

Considérant ces différents éléments, nous allons présenter les modifications que nous avons observées après réimplantation de cerveaux sur les seuls parasites trouvés en coupe.

b) Jeunes Trophozoïtes à mouvements pendulaires (100 μ m) après trois jours de blocage.

Le complexe membranaire périphérique est perturbé. Si la membrane externe apparaît normale, le complexe interne est quelque peu désorganisé (Figs 175-176). Les microvillosités sont plus rares (Fig 175) que pour le témoin (Fig 173).

Il n'y a pas de différences nettes pour les inclusions cytoplasmiques. Peut-être la quantité d'inclusions denses est-elle plus grande (Figs. 175-176) et de plus, celles-ci n'ont jamais été vues en contact avec la paroi (Fig 176).

Les réserves polysaccharidiques, qui se différencient assez mal sur coupes contrastées normalement apparaissent nettement sur coupes traitées selon la technique de THIERY (Fig 182), mais ne semblent pas avoir été modifiées.

L'enveloppe nucléaire est quant à elle, beaucoup plus sinueuse que sur le témoin et le nucléoplasme très hétérogène (Fig 175). Le nucléole semble réduit à quelques amas annulaires très denses.

c) Trophozoïtes à mouvements pendulaires-péristaltiques (lot 2) après trois jours et douze jours de blocage.

α) Après 3 jours de blocage :

La modification essentielle concerne, comme pour les jeunes trophozoïtes, le complexe membranaire périphérique : désorganisation des membranes internes et modification de la structure des microvillosités (Fig 177). L'amylopectine est regroupée en amas et les inclusions denses assez nombreuses. Les mitochondries ont un aspect normal. (Fig 177).

β) Après 12 jours de blocage :

Nous avons signalé précédemment que la plupart des syzygies de ce stade avaient disparu du coelome des vers expérimentés après 12 jours d'influence hormonale. L'explication de ce phénomène est parfaitement illustré par la Fig. 178 qui présente le seul trophozoïte trouvé dans les inclusions.

Le complexe membranaire externe est totalement modifié et ne ressemble en rien à une paroi normale. Il n'est d'ailleurs plus possible de distinguer la membrane externe et le complexe interne. Dans le cytoplasme, de nombreuses inclusions denses sont regroupées par amas et on les différencie mal des quelques grains d'amylopectine eux aussi très modifiés. Les globules lipidiques sont peu denses et paraissent avoir subi une sorte de digestion. Les mitochondries sont sphériques et gonflées, avec très peu de tubules. Le noyau, dont la limite est compacte montre un contenu granulaire très hétérogène et les nucléoles ont semble t-il disparus.

d) Trophozoïtes à mouvements péristaltiques (Lot 3) après douze jours de blocage.

Dans les trophozoïtes témoins de ce stade, les granules d'amylopectine sont abondants.

Après 12 jours d'action hormonale, le seul individu que nous avons trouvé présente une paroi très modifiée comme sur le stade précédent (β du c).

Les inclusions denses sont particulièrement abondantes et regroupées en zones compactes (Fig 179).

Les globules lipidiques sont complètement dégradés et souvent réduits à des enroulements membranaires de type myélinique (Fig 179).

De façon à bien différencier les inclusions denses et l'amylopectine, nous avons traité les coupes par la technique de THIERY (1967). Cette réaction met en évidence que les inclusions denses ne réagissent pas, mais par contre on remarque de fins granules positifs dans le fond cytoplasmique (Fig 180-181). Les éléments THIERY positifs pourraient à notre avis être le signe d'une dégradation des grains d'amylopectine.

IV DISCUSSION :

Le premier élément à considérer concerne l'évolution naturelle de Diplauxis. En se basant sur les données de PORCHET (1974), si l'on compare les stades de développement du parasite et l'activité endocrine de l'hôte, on constate que la croissance des trophozoïtes correspond à une activité hormonale nulle. En effet, pendant deux ans et huit mois de la vie des hôtes (qui est de trois ans), l'accroissement en taille des syzygies coelomiques est extrêmement faible (de 20 μ m à 60-70 μ m de longueur). Après cette période, le niveau d'activité endocrine cérébrale devient pratiquement nul, et la croissance des parasites s'accélère fortement (de 60-70 μ m à 600 - 700 μ m en 2 mois). Ceux-ci entrent alors en gamétogenèse puis en sporogenèse. De ces observations il est possible de conclure que les Grégarines ont un métabolisme extrêmement sensible à l'hormone de l'hôte et donc que leur croissance ne peut se dérouler normalement qu'en l'absence de celle-ci.

Du même coup, l'effet de réimplantations coelomique de cerveaux actifs est très net. Cependant, suivant la phase de croissance végétative considérée les effets seront plus ou moins importants, et il semble qu'il existe un stade de croissance critique au delà duquel l'action de l'hormone devient létale. Cette phase correspond à notre avis au moment où les couples passent des mouvements pendulaires aux mouvements péristaltiques, qui est celle où l'activité métabolique est la plus élevée. Dans le cas^{de} trophozoïtes en début de croissance, l'action hormonale ne provoque pas de perturbations suffisantes pour entraîner la mort des parasites.

A quel niveau se situe l'action hormonale? Il est admis que dans de nombreux cas, la régulation hormonale s'exerce au niveau de la transcription (TATA 1970- TATA et SMITH 1979 WYATT 1972- O'MALLEY et MEANS 1974).

D'après les résultats obtenus par BERTOUT (1976) il semble que le contrôle hormonal de la spermatogenèse chez Nereis diversicolor s'exerce par l'intermédiaire d'une régulation des synthèses d'ARN survenant pendant la phase préméiotique. En ce qui concerne l'action hormonale sur Diplauxis, aucune conclusion valable ne peut-être tirée des résultats fragmentaires obtenus.

Il apparaît cependant que certaines synthèses sont stoppées, alors que l'utilisation des réserves glucidiques et lipidiques se poursuit. En ce qui concerne les inclusions denses, elles s'accumulent dans le cytoplasme, ceci pouvant traduire un arrêt des processus d'exocytose, et indirectement provoquer un blocage du renouvellement membranaire. Ces phénomènes entraînent des perturbations telles sur les trophozoïtes en phase maximum de croissance que ceux-ci éclatent.

Si l'on considère l'action sur les synthèses d'ARN, le seul point qui peut nous éclairer est relatif à la modification ultrastructurale du noyau. La disparition du gros nucléole et l'hétérogénéité du nucléoplasme pourraient être le signe d'un arrêt des synthèses d'ARN, et par voie de conséquence, à plus longue échéance, des synthèses cytoplasmiques.

Le problème du mécanisme d'action de l'hormone cérébrale de Perinereis sur la croissance de son parasite coelomique reste en grande partie posé, mais il semble assez difficile dans les conditions expérimentales actuelles de le préciser davantage sur notre matériel.

CONCLUSIONS GENERALES

Dans l'ensemble du Sous-Embranchement des Sporozoaires, les Coccidies et les Hémosporidies, en raison de leur intérêt vétérinaire et médical, ont fait l'objet de nombreuses études qui ont permis des découvertes intéressantes à de multiples points de vue (cytologie ultrastructurale, mécanisme d'infestation, développement en cultures cellulaires, recherches thérapeutiques). Par contre, les Grégarines, parasites d'invertébrés uniquement, présentent un attrait moindre, le seul intérêt de leur étude étant de caractère exclusivement fondamental. Les travaux réalisés en microscopie optique avaient cependant permis de montrer que ce groupe fortement diversifié pouvait présenter de nombreux points intéressants à approfondir. L'existence d'une phase rapide de croissance végétative, d'une phase sexuée et de la formation d'un germe infectieux sont en effet l'apanage de toutes les espèces de ce groupe.

Parmi ces différentes phases, c'est surtout la croissance végétative qui a fait l'objet de recherches ultrastructurales chez les Grégarines. Les autres stades du cycle vital, en raison des difficultés de préparation du matériel sont bien moins explorés. Notre travail apporte en ce sens de nombreuses informations originales ou complémentaires sur la phase sexuée, la genèse du germe infectieux, et sur le mécanisme de transmission à l'hôte.

L'un des premiers points de notre travail traite de la division nucléaire, jusqu'alors mal connue chez les Grégarines. Les résultats obtenus apportent plusieurs éléments originaux et nous permettent de replacer cette mitose dans le contexte général.

La caryocinèse chez Diplauxis est polarisée par des centres cinétiques constitués de "matrices nématopoiétiques" (FAURE-FREMIET, 1970) non structurées en centriole et qui engendrent les microtubules du fuseau. Ces centres apparaissent toujours en relation avec des saccules du réticulum endoplasmique, quelle que soit la division considérée. Cette particularité ne serait pas à notre avis propre à la seule espèce Diplauxis chez les Grégarines et pose le problème du rôle de cette association dans la division. Le centre cinétique en tant que tel correspond probablement à une zone d'accumulation des molécules précurseurs des microtubules et joue un rôle de nucléation analogue à celui du centriole quand il est présent. Chez les Sporozoaires, dont l'une des particularités essentielle est la pellicule trimembranaire, l'association centre cinétique - membranes du réticulum se fait plus ou moins

précocément (elle semble plus tardive chez les Coccidies) et chez Diplauxis pourrait entre autre favoriser la séparation des centres cinétiques en début de division, rappelant ce que l'on peut observer chez certaines espèces où le centre cinétique est fixé directement sur l'enveloppe nucléaire (groupe II de KUBAI, 1975 et voir FEBVRE, 1977).

Pour la suite de la mitose, il y a formation de deux hémifuseaux obliques qui, après avoir provoqué la rupture de l'enveloppe nucléaire vont s'intégrer l'un à l'autre pour former un fuseau continu unique ^{permettre la} et mise en plaque métaphasique des chromosomes comme dans l'orthomitose, d'où le nom de cryptorthomitose donné par HOLLANDE (1972) à ce type de division.

Au cours de la séparation des chromosomes à l'anaphase, il existe deux stades bien distincts. L'un correspond à un net raccourcissement des microtubules chromosomiaux (Anaphase A de INOUE et RITTER, 1975) l'autre à un allongement des microtubules du fuseau continu (Anaphase B). Ce phénomène est décrit pour la première fois chez un Sporozoaire alors qu'il ne semblait devoir exister que chez les "cellules supérieures".

Les phases de division chez Diplauxis comme chez les Grégarines ne présentant pas de schizogonie précèdent uniquement la formation des gamètes et celle des sporozoïtes. Les considérations générales relatives à la gamétogénèse et à la sporogénèse sont de plusieurs ordres. Dans ces deux phases, l'importance des systèmes membranaires impliqués dans la genèse des gamètes ou des germes infectieux est primordiale et on considère maintenant que c'est un phénomène général à tout le groupe des Sporozoaires. VIVIER et coll. (1970) avaient énoncé l'universalité du système trois membranes et nos travaux viennent la confirmer, non seulement en ce qui concerne la structure finale mais également l'origine. Que ce soit dans la formation des gamètes ou dans celle des sporozoïtes, la membrane externe dérive de la membrane plasmique de la cellule mère, alors que le complexe bimembranaire sous-jacent trouve son origine dans le réticulum endoplasmique. Notre travail a permis de montrer que le système trois membranes est présent très précocément et que, au moins chez Diplauxis, il est indispensable à la fois au bon déroulement de la division et à la genèse des éléments formés à partir de la cellule mère. Il semble même qu'il existe des sites de reconnaissance particuliers sur certaines membranes issues du réticulum endoplasmique et la membrane plasmique du gamonte ou du sporoblaste, entraînant une internalisation de celles-ci pour constituer une pellicule trimembranaire. Ce phénomène est très net au cours de

la gamétogenèse et aboutit à la formation d'un système vacuolaire interne dérivé de la membrane plasmique.

En plus de ces membranes à rôle essentiellement limitant, mention spéciale sera faite des membranes du réticulum endoplasmique granulaire. Le schéma classique de l'évolution de ces membranes et des synthèses qui leur sont liées est parfaitement décrit actuellement (voir BLODEL, 1980) et se retrouve morphologiquement chez Diplauxis. Le réticulum granulaire peut donner par perte de ses ribosomes le complexe bimembranaire lisse dont on vient de parler. Il participe en outre à la genèse de nombreux dictyosomes en particulier en début de gamétogenèse et de sporogenèse (vraisemblablement un dictyosome par gamète et par sporozoïte). Ce même réticulum se trouve en relation avec les grains d'amylopectine et les globules lipidiques, constituant la voie préférentielle de transport des substances provenant de leur dégradation ou servant à leur synthèse suivant les besoins.

Si l'on considère de plus près le rôle des dictyosomes, en dehors de celui qu'ils jouent certainement dans le renouvellement des membranes, ils participent de façon majeure à la synthèse de sécrétions propres aux Sporozoaires. Celles-ci seront différentes selon la phase du cycle et pourront être d'une part les inclusions denses formatrices de paroi (paroi du gamonte ou du sporoblaste), d'autre part les sécrétions qui contribuent à l'élaboration des micronèmes et des rhoptries.

Chez les Grégarines, à la différence des Coccidies, l'anisogamie est peu marquée, mais apparaît cependant nettement dans la plupart des cas. Chez Diplauxis, l'ensemble des gamontes mâles et femelles participe à l'élaboration de gamètes, sans reliquat cytoplasmique. Le nombre et la taille des gamètes mâles et femelles formés sont pratiquement équivalents, d'où une anisogamie faible. Seule la présence ou l'absence de flagelle permet de différencier les éléments sexuels en ultrastructure. Revenons au gamète mâle. Son étude démontre qu'il possède un flagelle parfaitement mobile, malgré une ultrastructure très atypique de son axonème (3 + 0). Ce flagelle qui fait exception avec quelques autres au schéma classique 9 + 2 pose le problème de l'origine de sa motilité. Ceci étant dit, des études ultérieures permettront peut-être d'apporter des informations complémentaires sur la façon dont un axonème aussi simplifié peut engendrer un mouvement hélicoïdal complexe relativement rapide. Ces travaux pourraient être menés en parallèle sur le gamète de Diplauxis et celui de Lecudina tuzetae qui possède un axonème 6 + 0 (SCHREVEL et BESSE, 1976).

La phase de reproduction des Grégarines est caractérisée par la transformation du zygote en un sporoblaste dans lequel vont s'individualiser un certain nombre de germes (huit chez Diplauxis). La spore est la forme de résistance et de dissémination du parasite. Le germe infectieux formé, dénommé zoïte correspond au même schéma chez tous les Sporozoaires et comme le souligne VIVIER (1979) "fait l'unité du groupe, qu'il provienne de la multiplication asexuée ou de la reproduction sexuée". Le zoïte présente les organites cellulaires classiques et est limité par une pellicule trimembranaire. En plus de ces éléments, il possède un certain nombre d'organites apicaux propres à ces formes cellulaires (conoïde - micronèmes - rhoptries). Le conoïde est absent chez Diplauxis. Pour les micronèmes et rhoptries, bien que dérivant tous deux de l'appareil de Golgi, ils sont différents et jouent vraisemblablement des rôles distincts. Le devenir de ces organites au cours de l'infestation de l'hôte montre que la rhoptrie intervient probablement en se vidant de son contenu au moment de la pénétration (JENSEN et EDGAR, 1976). Quant aux micronèmes, ils paraissent agir plus tardivement. Pour le moment, nous ne pouvons dépasser le stade de la supposition, aussi longtemps que le rôle exact de ces éléments ne sera pas démontré. Un pas en avant a été fait dans ce domaine puisque l'on sait actuellement isoler ces organites et leur analyse biochimique est en cours (DUBREMETZ, DISSOUS, 1980). Il sera intéressant également de tenter de suivre leur synthèse au cours du cycle biologique.

L'étude précise du mécanisme d'infestation permet d'éclairer certains problèmes qui s'étaient posés lorsque nous avons abordé l'étude du cycle de Diplauxis. L'un des points concerne l'accouplement précoce des individus végétatifs. Les zoïtes, dès leur sortie de la spore pénètrent dans l'épithélium intestinal et traversent celui-ci pour gagner très rapidement la proximité de la basale. C'est très vraisemblablement à cet endroit qu'ils s'accouplent, et il faut donc supposer que leur membrane externe possède déjà des sites de reconnaissance bien différenciés permettant la mise en syzygie de deux individus sexuellement différents. Nous nous trouvons, avec les Diplauxis (voir PORCHET-HENNERE et FISHER, 1973) en présence d'un cas assez exceptionnel chez les Grégarines car généralement l'expression des sites de reconnaissance entre individus génétiquement mâles et femelles s'effectue beaucoup plus tard, vers la fin de la croissance végétative.

Un deuxième point à considérer est celui du cheminement vraisemblablement extracellulaire des zoïtes au cours du passage transépithélial. Dans le cas de Diplauxis, il est logique de penser cela car ils ne subissent pas de schizogonie. Le parasite n'a donc pas de nécessité de passer par une phase intracellulaire contrairement aux Coccidies. D'ailleurs, pour certaines Grégarines dites à "développement intracellulaire" (voir GRASSE (1953) et ORMIERES (1971)), il serait très intéressant de pratiquer la réaction au lanthane de façon à savoir si elles sont effectivement englobées dans une vacuole hôte indépendante du milieu extracellulaire ou si au contraire elles utilisent la cellule parasitée uniquement en guise de protection contre le milieu externe.

Les sporozoïtes, dès leur accouplement tombent dans le sinus péri-intestinal puis gagnent très rapidement le coelome. Chez Diplauxis schreveli (PORCHET-HENNERE et FISHER, 1973) par contre, les individus végétatifs, après un accouplement précoce subissent leur croissance végétative dans le sinus périintestinal et gagnent le coelome juste avant la gamétogenèse. Pour Diplauxis hatti, les syzygies vont croître très lentement, jusqu'à ce que la concentration hormonale du milieu coelomique devienne favorable à l'achèvement de la phase de croissance et au déroulement de la phase sexuée. Déplorons de nouveau les résultats trop peu concluants obtenus quant à l'influence de l'hormone cérébrale de l'hôte sur la croissance de son parasite coelomique. L'impossibilité d'obtenir des cultures organotypiques de Perinereis limite beaucoup les études envisageables. Cependant, les quelques résultats expérimentaux acquis méritent d'être repris et approfondis.

En conclusion finale, nous pensons par ce travail avoir apporté un certain nombre de données originales sur quelques points du cycle d'une Grégarine, qui montrent l'intérêt que peut présenter leur étude. De plus, si nous apportons des éléments propres au groupe des Sporozoaires, d'autres relèvent d'un aspect plus général de la vie cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

- AFZELIUS (B. A.), 1963. - Cilia and Flagella that do not conform to the 9 + 2 pattern 1) Aberrant members within normal population.
J. Ultr. Res., 9, p. 381-392.
- AIKAWA (M.), 1966. - The fine structure of erythrocytic stages of three avian malarial parasites, Plasmodium fallax, P. lophurae and P. cathemerium.
Ann. J. Trop. Med. Hyg., 15 (4), p. 449-471.
- AIKAWA (M.), 1971. - Plasmodium. The fine structure of Malarial parasites.
Exp. Parasitol., 30, p. 284-320.
- AIKAWA (M.), KOMATA (Y.), ASAI (T.) et MIDORIKAWA (O.), 1977. - Transmission and scanning electron microscopy of host cell entry by Toxoplasma gondii.
Ann. J. Pathol., 87, 2, p. 285-290.
- AIKAWA (M.), MILLER (L. H.), JOHNSON (J.) et RABBEGE (J.), 1978. - Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite.
J. Cell Biol., 77, p. 72-82.
- AIST (J. R.) et WILLIAMS (P. H.), 1972. - Ultrastructure and time course of mitosis in the fungus Fusarium oxysporum.
J. Cell Biol., 55, p. 368-389.
- ALOV (A.) et LYUBSKII (S. L.), 1977. - Functional morphology of the kinetochore
Int. Rev. of Cytology, Suppl 6, p. 59-74. Academic Press New-York.
- BACCETTI (B.), DALLAI (R.) et FRATELLO (B.), 1973. - The spermatozoon of arthropoda XXII : the "12 + 0" "14 + 0" or a flagellate sperm of Protura.
J. Cell Sci., 13, p. 321-336.

- BAJER (A. S.), 1973. - Interaction of microtubules and the mechanism of chromosome movement (zipper hypothesis) 1°) General principle. Cytobios, 8, p. 139-160.
- BAJER (A.) et MOLE-BAJER (J.), 1969. - Formation of spindle fibers, kinetochore orientation and behavior of the nuclear envelope during mitosis in endosperm. Fine structural and in vitro studies. Chromosoma, 27, p. 448-484.
- BANNISTER (L. H.), 1972. - Lanthanum as an intracellular stain. J. Microscopy, 95 (3), p. 413-420.
- BANNISTER (L. H.), BUTCHER (G. A.), DENNIS (E. D.) et MITCHELL (G. H.), 1975. - Structure and invasive behaviour of Plasmodium knowlesi merozoites in vitro. Parasitology, 71, p. 483-491.
- BASKIN (D. G.), 1976. - The fine structure of Polychaete septate junctions. Cell. Tiss. Res., 174, p. 55-67.
- BEGG (D. A.) et ELLIS (G. W.), 1979. - Micromanipulation studies of chromosome movement. I) Chromosome spindle attachment and the mechanical properties of chromosomal spindle fibers. J. Cell Biol., 82, p. 528-541.
- BEGG (D. A.) et ELLIS (G. W.), 1979. - Micromanipulation studies of chromosome movement. II) Birefringent chromosomal fibers and the mechanical attachment of chromosomes to the spindle. J. Cell Biol., 82, p. 542-554.
- BEHNKE (O.), 1974. - Microtubules et microfilaments. Triangle (Journal Sandoz des Sciences Médicales), Vol. XIV, n° 3, p. 219-232.
- BERGEN (L. G.), KURIYAMA (R.) et BORISY (G. G.), 1980. - Polarity of microtubules nucleated by centrosomes and chromosomes of chinese Hamster ovary cells in vitro. J. Cell Biol., 84 (1), p. 151-159.
- BERTOUT (M.), 1976. - Action de l'hormone cérébrale des Néréidiens sur les synthèses d'acides nucléiques au cours de la spermatogenèse. C.R.A.S., T.282, p. 1613-1616.

- BESSE (C.), 1975. - Etude ultrastructurale de la gamétogenèse de la Grégarine Lecudina tuzetae sehr.
Thèse de 3ème cycle (Poitiers).
- BEYER (T. V.), 1978. - The conoid as a marker of the mode of transmission with the apicomplexa.
Fourth International Congress of Parasitology, VARSOVIE, Août 1978.
- BLOBEL (G.), 1980. - Intracellular protein topogenesis.
Proc. Natl. Acad. U. S. A. 77, n° 3, p. 1496-1500.
- BOILLY-MARER (Y.), 1962. - Inhibition des transformations hétéronéréidiennes par le cerveau d'espèces sans épitoquie (Néréidiens).
C. R. Acad. Sci., 254, p. 2830-2832.
- BRASIL (L.), 1905.a - Recherches sur la reproduction des Grégarines Monocystidées.
Arch. Zool. Exp., Série 4, 3, p. 17-38.
- BRASIL (L.), 1905.b - Nouvelles recherches sur la reproduction des Grégarines Monocystidées.
Arch. Zool. Exp., Série 4, 4, p. 69-99.
- BRASIL (L.), 1907. - Recherche sur le cycle évolutif des Selenidiidae, Grégarines parasites d'Annélides Polychètes. I) La schizogonie et la croissance des gamétocytes chez Selenidium caulleryi n. sp.
Arch. f. Protistenk., 8, p. 370-397.
- BRASIL (L.), 1909. - Documents sur quelques Sporozoaires d'Annélides.
Arch. f. Protistenk., 16, p. 107-142.
- BRINKLEY (B. R.) et STUBBLEFIELD (R.), 1966. - The fine structure of the kinetochore of a mammalian cell in vitro.
Chromosoma (Berlin), 19, p. 28-43.
- BRINKLEY (B.R.) et STUBBLEFIELD (E.), 1969. - Ultrastructure and interaction of the kinetochore and centriole in mitosis and méiosis.
In Advances in Cell Biology. Edt. by PRESCOTT (D.M.) GOLDSTEIN (L.) MC CONKEY (E.) Appelton New York 1., p.119-185.
- BYERS (B.), SHRIVER (K.) et GOETSCH (L.), 1978. - The role of spindle pole bodies and modified microtubules ends in the initiation of microtubule assembly in Saccharomyces cerevisiae.
J. Cell Sci., 30, p. 331-352.

CARDON(C.)¹⁹³⁰, - Procédés de fractionnement de ganglions cérébroïdes de Nereis diversicolor O.F.MÜLLER en vue de l'isolement de l'hormone inhibitrice de la sexualisation.

Bull. Soc. Zool., 95, p. 534-549.

CAULLERY (M.) et MESNIL (F.), 1898. - Sur une Grégarine coelomique présentant dans son cycle évolutif une phase de multiplication asporulée.

C. R. Soc. Biol. (Paris), Série X, p. 65-68.

CAULLERY (M.) et MESNIL (F.), 1900^a - Sur les parasites internes des Annélides Polychètes en particulier celles de la Manche.

C. R. Ass. Fr. Avanc. Sciences, Boulogne-sur-Mer, 1899, p. 491-496.

CAULLERY (M.) et MESNIL (F.), 1900^b - Sur un mode particulier de division nucléaire chez les Grégarines.

Arch. Anat. Microsc., 3, p. 146-167.

CAULLERY (M.) et MESNIL (F.), 1901. - Le parasitisme et la reproduction asexuée des Grégarines.

C. R. Soc. Biol., 52, p. 84-87.

CHATTON (E.), 1910. - Le kyste de Gilruth dans la muqueuse stomacale des ovidés Arch. Zool. Exp. et Gén. 5ième, n° 5, p. 114-124.

CHOBOTAR (B.), SENAUD (J.), ERNST (J. V.), SCHOLTYSECK (E.), 1975. - The ultrastructure of macrogamètes of Eimeria ferrisi Levine and Ivens 1965 in Mus musculus.

Z. Parasitenk., 48, p. 111-124.

CHOQUET (M.), 1962. - Effet inhibiteur de l'hormone cérébrale sur l'évolution des cellules sexuelles chez Nereis pelagica.

C. R. Soc. Biol., 156, p. 1112-1114.

CLAPAREDE (E.), 1861. - Etudes anatomiques sur les Annélides, Turbellariés, Opalines et Grégarines observées dans les Hébrides.

Mém. Soc. Phys. et Hist. Nat. Genève, 16.

COLLEY (F. C.), 1968. - Fine structure of schizont and merozoïtes of Eimeria nieschulzi.

J. Protozool., 15, p. 374-382.

CORBEL (J. C.), 1964. - Infestations expérimentales de Locusta migratoria L. (insecte orthoptère) par Grégarina garnhami CANNING (Sporozoaire grégarinomorphe). Relation entre le cycle de l'hôte et celui du parasite.

C. R. A. S., 259, p. 207-210.

COSS (R. A.) et PICKETT-HEAPS (J. D.), 1973. - Gametogenesis in the green alga Oedogonium cardiacum. I) The cell division leading to formation of spermatids and oogonia.

Protoplasma, 78, p. 21.

COSTELLO (D. P.), 1973. - A new theory on the mechanism of ciliary and flagellar motility. II - Theoretical considerations.

Biol. Bull. (Woods Hole), 145, p. 292-309.

COSTELLO (D. P.), HENLEY (C.) et AULT (C. R.), 1969. - Microtubules in spermatozoa of Childia (Turbellaria, Acoela) revealed by negative staining.

Science (Wash. D C), 163, p. 678-679.

COUSSERANS (F.), 1975. - Recherches sur la culture de cellules de mollusques marins et sur l'emploi de ces systèmes cellulaires en pathologie marine.

Thèse de 3ième cycle, Montpellier.

CUNNINGHAM (J. T.), 1907. - On the kalpidorhynchus arenicolae, a new gregarine parasitic in Arenicola ecaudata.

Arch. Protistenk. 10, p. 129-215.

DESPORTES (I.), 1966. - L'ultrastructure du gamète mâle de l'Eugragérine Stylocephalus longicollis.

C. R. Acad. Sci. (PARIS), 263, p. 517-520.

DESPORTES (I.), 1967. - Ultrastructure et évolution du sporozoïte de Stylocephalus africanus Théodorides Desportes et Jolivet, Eugrégarine, Stylocephalidae

C. R. Acad. Sci., 265, p. 423-426.

DESPORTES (I.), 1970. - Ultrastructure des Grégarines du genre Stylocephalus ; la phase enkystée.

Ann. Sc. Nat. Zool. Paris 12ième série, XII, p. 73-170.

DESPORTES (I.) et THEODORIDES (J.), 1965. - L'ultrastructure de la gymnospore des Porospora (Eugrégarina, Porosporidae).

C. R. Acad. Sci., 260, p. 1761-1762.

DHAINAUT (A.) et PORCHET (M.), 1967. - Evolution ovocytaire en l'absence d'hormone cérébrale chez P. cultrifera.

C. R. Acad. Sci., 264 (24), p. 2807-2810.

DHAINAUT-COURTOIS (N.), 1966.-Le complexe cérébro-vasculaire de N. pelagica(A.P.)
Données histologiques et ultrastructurales.

C.R.A.S. , 262, n°19 , p. 2048-2051.

DHAINAUT-COURTOIS (N.), 1966. Etude histologique des cellules nerveuses du
cerveau de Nereis pelagica L. (A.P.)

C.R.A.S. , 263 , n° 21 , p. 1596-1599.

DHAINAUT-COURTOIS (N.) , 1967. -Etude ultrastructurale des cellules nerveuses
du cerveau de Nereis pelagica L.

C.R.A.S. , 264 , p.2566-2569.

DHAINAUT-COURTOIS (N.) , 1968. -Etude histologique et ultrastructurale des
cellules nerveuses du ganglion cérébral de Nereis pelagica L. .Comparaison
entre les types cellulaires I. IV. et ceux décrits antérieurement chez les
Nereidae .

Gen. Comp. Endocrinol. , 11 , p. 414-443 .

DHAINAUT-COURTOIS (N.) , 1970. -Contribution à l'étude morphologique des
processus sécrétoires dans le système nerveux central et au niveau de la
glande infracérébrale des Nereidae.

Thèse Doct. Etat Sci. Nat. , LILLE.

DIETZ (R.), 1969. - Bau und Funktion des Spindleapparats.

Naturwissenschaften, 56, p. 237-248.

DIETZ (R.), 1972. - Die Assembly hypothese der chromosomenbewegung und die
Veraudesungen der Spindellange während der Anaphase I in Spermatozyten von
Pales ferruginea (Tipulidae, Diptera).

Chromosoma, 38, p. 11-76.

DOENS-JUTEAU (O.) et SENAUD (J.), 1974. - Etude ultrastructurale de la paroi du macrogamète et de l'oocyste chez Eimeria tenella (Railliet et Lucet, 1891) Coccidie Eimeriidae parasite de l'intestin des poulets. Protistologica, X, p. 261-270.

Mc DONALD (K. L.), EDWARDS (M. K.) et Mc INTOSH (J. R.), 1979. - Cross sectional structure of the central mitotic spindle of Diatoma vulgare. Evidence for specific interactions between antiparallel microtubules. J. Cell Biol., 83, p. 443-461.

DUBREMETZ (J. F.), 1971. - L'ultrastructure du centriole et du centrosôme chez la Coccidie Eimeria necatrix ; étude au cours de la schizogonie. J. Microsc., 12, p. 453-458.

DUBREMETZ (J. F.), 1973. - Etude ultrastructurale de la mitose schizogonique chez la Coccidie Eimeria necatrix (JOHNSON, 1930). J. Ultr. Res., 42, p. 354-376.

DUBREMETZ (J. F.), 1975. - La genèse des mérozoïtes chez la Coccidie Eimeria necatrix. Etude ultrastructurale. J. Protozool., 22 (1), p. 71-84.

DUBREMETZ (J.F.) et DISSOUS (C.) , 1980 . - Characteristic proteins of micronèmes and dense granules from Sarcocystis tenella zoïtes. (Protozoa Coccidia) Molec. and Bioch. Parasit. , 1 , p. 279-289 .

DUBREMETZ (J. F.) et ELSNER (Y. Y.), 1979. - Ultrastructural study of schizogony of Eimeria bovis in Cell Cultures. J. Protozool., 26 (3), p.367-376.

DUBREMETZ (J. F.), PORCHET (E.), TORPIER (G.) et PRENSIER (G.), 1978. - Freeze fracture of coccidian zoïtes : Structure of the pellicular complex. Fourth Int. Congress of Parasitology VARSOVIE, Août 1978.

- DUBREMETZ (J. F.) et TORPIER (G.), 1978. - Freeze fracture study on the pellicle of an Eimerian sporozoite (Protozoa - Coccidia).
J. Ultr. Res., 62, p. 94-109.
- DUBREMETZ (J. F.), TORPIER (G.), MAUROIS (P.), PRENSIER (G.) et SINDEN (R.), 1979. - Structure de la pellicule du sporozoite de Plasmodium yoelii : étude par cryofracture.
C. R. Acad. Sci., t. 288, p. 623-626.
- DUBREMETZ (J. F.) et YVORE (P.), 1971. - Elaboration de la coque oocystique chez la Coccidie Eimeria necatrix Johnston 1930 (Sporozoaires Coccidiomorphes) Etude au microscope électronique.
C. R. Soc. Biol. (Paris), 165, p. 862-866.
- DURCHON (M.), 1948. - Epitoquie expérimentale chez deux Polychètes : P. cultrifera et N. irrorata.
C. R. Acad. Sci., 227, p. 157-158.
- DURCHON (M.), 1949. - Inhibition de l'épitoquie par le prostomium chez les Nérédiens (A. P.).
C. R. Acad. Sci., 229, p. 81-82.
- DURCHON (M.), 1951. - Les modalités de l'essaimage de P. cultrifera G. (A. P.) à Luc-Sur-Mer (Calvados).
Arch. Zool. Exp. Gen., 88, n° 1, p. 1 à 6.
- 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, p. 119-206.
- DURCHON (M.), 1956. - Rôle du cerveau dans la maturation génitale et le déclenchement de l'épitoquie chez les Nérédiens.
Ann. Sc. Nat. Zool. et Biol. Anim., 18, p. 269-273.
- DURCHON (M.) et VIVIER (E.), 1961. - Déterminisme de la gamogonie chez une Grégarine parasite de P. cultrifera G. (Annélide Polychète).
C. R. Acad. Sci., 253, p. 318-320.

DURCHON (M.) et VIVIER (E.), 1964. - Influence des sécrétions encrines sur le cycle des Grégarines chez les Néréidiens.

Ann. Endoc. Paris, 25, n° 5, p. 43-48.

FAURE-FREMIET (E.), 1970. - Microtubules et mécanismes morphogénétiques.

Ann. Biol., 9 (12), p. 1-61.

FEBVRE (J.), 1977. - La division nucléaire chez les Acanthaires. I) Etude ultrastructurale de la Mitose. Comparaison avec la caryocinèse d'autres organismes.

J. Ultr. Res., 60 (3), p. 279-295.

FERGUSON (D. J. P.), BIRCH ANDERSEN (A.), HUTCHINSON (W. M.) et SIIM (J. C.), 1976. - Ultrastructural studies on the endogenous development of Eimeria brunetti.

Acta Pathol. Microbiol. Scand., **B84**, p. 401-413.

FERGUSON (D. J. P.), BIRCH-ANDERSEN (A.), HUTCHINSON (W. M.) et SIIM (J. C.), 1978. - Light and electron microscopy on the sporulation of the oocysts of Eimeria brunetti. II - Development of the sporocyst and formation of the sporozoïte.

Acta Path. Microbiol. Scand., Sect. B, 86, p. 13-24.

FERGUSON (D. J. P.), BIRCH-ANDERSEN (A.), SIIM (J. C.) et HUTCHINSON (W. M.), 1979. - Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of Toxoplasma gondii. III - Formation of the sporozoïtes within the sporocysts.

Acta Path. Microbiol. Scand., Sect. B, 87, p. 253-260.

FERGUSON (D. J. P.), BIRCH-ANDERSEN (A.), SIIM (J. C.), et HUTCHINSON (W. M.), 1979. - An ultrastructural study on the excystation of the sporozoïtes of Toxoplasma gondii.

Acta Path. Microbiol. Scand., Sect. B, 87, p. 277-283.

FUGE (H.), 1974. - Ultrastructure and function of the spindle apparatus microtubules and chromosomes during nuclear division.

Protoplasma, 82, p. 289-320.

FUGE (H.), 1977. - Ultrastructure of the mitotic spindle.

Int. Rev. of Cytol., suppl 6, p. 1-58 - Academic Press New-York.

FULTON (C.), 1971. - Centrioles. In Origin and Continuity of Cell organelles. in REINERT (J.) et URSPRING (H.) Eds. p. 170, Springer-Verlag Berlin Heidelberg and New-York.

FUSELER (J. W.), 1975. - Temperature dependance of anaphase chromosome velocity and microtubule depolymerization.

J. Cell Biol., 67, p. 789-800.

GIARD (A.), 1884. - Note sur un nouveau groupe de Protozoaires parasites d'Annélides Polychètes et sur quelques points de l'histoire des Grégarines (Selenidium pendula).

C. R. Ass. fr. Avanc. Sci., Congrès de Blois, p. 192.

GIBBONS (B. H.) et GIBBONS (I. R.), 1973. - The effect of partial extraction of dynein arms on the movement of reactivated sea - urchin sperm .

J. Cell Sci., 13, p. 337-358.

GIBBONS (B. H.) et GIBBONS (I. R.), 1974. - Properties of flagellar "rigor waves" formed by abrupt removal of adenosine triphosphate from actively swimming sea urchin sperm.

J. Cell Biol., 63, p. 970-985.

Mc GILL (M.) et BRINKLEY (B. R.), 1975. - Human chromosomes and centrioles as nucleating sites for the in vitro assembly of microtubules from bovine brain tubulin.

J. Cell Biol., 67, p. 189-199.

GOLDING (D.W.) , 1970 . - The infracerebral gland in Nephtys . A possible neuroendocrine complex.

Gen. Comp. Endocrino. , 14 , p. 114-126 .

GOULD (R. R.) et BORISY (G. G.), 1977. - The pericentriolar material in chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation.

J. Cell Biol., 73, p. 601-615.

GOULD (R. R.) et BORISY (G. G.), 1978. - Quantitative initiation of microtubule assembly by chromosomes from chinese Hamster ovary cells.

Exp. Cell Res., 113, p. 369-374.

GRASSE (P. P.), 1953. - Traité de Zoologie. T. I, fasc. II, MASSON et Cie Editeurs, PARIS

HAMMOND (D. M.), SCHOLTYSECK (E.) et CHOBOTAR (B.), 1969. - Fine structural study of the microgametogenesis of Eimeria auburnensis.
Z. Parasitenk., 33, p. 65-84.

HARRIS (P.), 1965. - Some observations concerning metakinesis in sea urchin eggs.
J. Cell Biol., 25, p. 73-77.

De HARVEN (E.), 1968. - Dan's DALTON (A. J.) et F. HAGENAU Editors. The nucleus p. 197, Academic Press New-York.

HATT (P.), 1955. - Stades de Sporozoaires chez Perinereis cultrifera Grube.
Natur. Monst. Série Zool., fasc. 1, p. 28-32.

HEATH (I. B.), 1980. - Behavior of kinetochores during mitosis in the fungus Saprolegnia ferax.
J. Cell Biol. 84, p. 531-546.

HELLER (G.), 1969. - Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Aggrega eberthi aus dem Spiraldarm von Sepia officinalis. I^o) Die Feinstrukturen der Merogonoziten, der Makrogameten und der Sporen.
Z. Parasitenk. 33, p. 44-64.

HELLER (G.), 1972. - Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Bildung and Struktur von Conoid, Rhoptrien und Mikronemen bei Eimeria stiedae (Sporozoa Coccidia).
Protistologica 8, p. 43-51.

HENTSCHEL (C. C.), 1926. - On the correlation of the life history of the acephalina Gregarine Gonospora, with the sexual cycle of the host.
Parasitology 18, p. 137, 143.

HENTSCHEL (C. C.), 1930. - On the correlation of the Acephalina Gregarine Gonospora with the sexual cycle of his host. II - Gonospora arenicolae. Parasitology 22, p. 505-509.

HEPLER (P. K.), HUFF (C. G.) et SPRINZ (H.), 1966. - The fine structure of the exoerythrocytic stages of Plasmodium fallax. J. Cell Biol. 30, p. 333-358.

HOLLANDE (A.), 1972. - Le déroulement de la cryptomitose et les modalités de la ségrégation des chromatides dans quelques groupes de Protozoaires. Ann. Biol., XI, 9-10, p. 428-466.

HOLLANDE (A.) et VALENTIN (J.), 1967. - Morphologie et infrastructure du genre Barbulanympa, Hypermastigine symbiotique de Cryptocercus punctulatus Scudder. Protistologica, III, p. 257-267.

HOLWILL (M. E.), 1966. - Physical aspects of flagellar movement. Physiol. Rev. 46, p. 696-785.

INOUE (S.), 1976. - Chromosome movement by reversible assembly of microtubules

In Cell Motility. Book C. R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum Eds. Cold Spring Harbor Laboratory.

Cold Spring Harbor New-York, p. 1317-1328.

INOUE (S.) et RITTER (H. Jr.), 1975. - Dynamics of mitotic spindle organization and function.

In Molecules and Cell movement, S. Inoué and R. E. Stephens Eds, Raven Press New-York, p. 3-30.

Mc INTOSH (J. R.), CANDE (Z.), SNYDER (J.) et VANDERSLICE (K.), 1975. - Studies on the mechanism of mitosis.

Ann. New-York Acad. Sci., 253, p. 407-427.

Mc INTOSH (J. R.), HEPLER (P. K.) et VANWIE (D. G.), 1969. - Model for mitosis. Nature (London), 224, p. 659-663.

JENSEN (J. B.) et EDGAR (S. A.), 1976. - Possible secretory function of the rhoptries of Eimeria magna during penetration of cultured cells.

J. Parasitol., 62, n° 6, p. 988-992.

JENSEN (J. B.) et HAMMOND (D. M.), 1975. - Ultrastructure of the invasion of Eimeria magna sporozoites into cultured cells.

J. Protozool., 22, p. 411-415.

JOHNSON (U. G.) et PORTER (K. R.), 1968. - Fine structure of Cell division in Chlamydomonas reinhardi. Basal bodies and microtubules.

J. Cell Biol., p. 38-403.

KARNOVSKY (M. J.), 1965. - A formaldehyde-glutaraldehyde of high osmolarity for use in electron microscopy.

J. Cell Biol., p. 27-137 A.

KEPKA (O.) et SCHOLTYSECK (E.), 1970. - Weitere untersuchungen der Feinstruktur von Frankelia spec. (=M - organisms).

Protistologica, 6, p. 249-266.

KILEJIAN (A.), 1976. - Does a histidine rich protein from Plasmodium lophurae have a function in merozoite penetration.

J. Protozool., 23 (2), p. 272-276.

- KOLLIKER (A.), 1849. - Beiträge zur Kenntnis niederer Thiere, Ueber die Gattung Gregarina L. Dufour.
Z. Wiss Zool., 1, p. 1-37.
- KRISHAN (A.) et BUCK (R. C.), 1965. - Structure of the mitotic spindle in L Strain fibroblasts.
J. Cell Biol., 24, p. 433-444.
- KUBAI (D. F.), 1975. - The evolution of the mitotic spindle.
Int. Rev. of Cytol., vol. 43, p. 167-227. Academic Press New-York.
- Mc KULLY (E. K.) et ROBINOW (C. F.), 1971. - Mitosis in the fission yeast. Schizosaccharomyces pombe : A comparative study with light and electron microscopes.
J. Cell Science, 9, p. 475-507.
- LADDA (R. L.), 1969. - New insights into the fine structure of rodent malarial parasites.
Mil. Med., 134, p. 825-865.
- LADDA (R. L.), AIKAWA (M.) et SPRINZ (H.), 1969. - Penetration of erythrocytes by merozoites of mammalian and avian malarial parasites.
J. Parasitol., 55, p. 633-644.
- LANKESTER (R. E.), 1863. - On our present knowledge of the Gregarinidae with descriptions of three new species belonging to that class.
Quant. J. Microsc. Sci., 3, N. S., p. 83-96.
- Mc LAREN (D. J.), 1969. - Observations on the fine structural changes associated with schizogony and gametogony in Eimeria tenella.
Parasitology, 59, p. 563-574.
- LUYKX (P.), 1970. - Cellular mechanisms of chromosome distribution.
Int. Rev. Cyt. Suppl. 2, p. 1, Academic Press New-York.
- LYCKE (E.), LUND (E.) et STRANNEGARD (O.), 1965. - Enhancement by lysozyme and hyaluronidase of the penetration by Toxoplasma gondii into cultured host cells.
Brit. J. Exp. Path., 46, p. 189-199.

MAZIA (D.), 1961. - Mitosis and physiology of Cell division. In the Cell Meiosis and mitosis.

Edited by BRACHET (J.) et MIRSKY (A. E.) Eds. The Cell, vol. 3, p. 77-412. Academic Press New-York.

MEHLHORN (H.), SENAUD (J.) et SCHOLTYSECK (E.), 1973. - La schizogonie chez Eimeria falciformis (Eimer 1870), Coccidie, Eimeriidae parasite de l'épithélium intestinal de la souris (Mus musculus). Etude au microscope électronique des mérozoïtes et de leur développement au cours d'infestations expérimentales. Protistologica, T. IX, 2, p. 269-291..

MILLER (L.H.) AIKAWA (M.) JOHNSON (J.G.) SHIROISHI (T.) , 1979. - Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes . Attachment and junction formation .

The Journal of Exp. Med. , 149 , p. 172-184 .

MOLON-NOBLOT (S.), 1976. - Ultrastructure du centriole chez la Grégarine Grebniackiella gracilis (Sporozoaire).

Protistologica, XII, Fasc. 3, p. 431-434.

MOLON-NOBLOT (S.), 1977. - Les gamètes de la Grégarine Grebniackiella (Nina) gracilis (Grebniacki) (Sporozoaire) parasite de la Scolopendre Scolopendra cingulata L. ; premières données ultrastructurales.

C. R. A. S., Paris, Série D, 284 (13), p. 1179-1182.

MURRAY (R. G.), MURRAY (A. S.) et PIZZO (A.), 1965. - The fine structure of mitosis in rat thymic lymphocytes.

J. Cell Biol., 26, p. 601-619.

NAKAMURA (S.) et KAMIYA (R.), 1978. - Bending motion in split flagella of Chlamydomonas.

Cell Structure and Function, 3, p. 141-144.

NICKLAS (R. B.), 1971. - Mitosis.

In advances in Cell Biology.

D. M. Prescott, L. Goldstein and E. H. Mc Conkey Eds, Appleton Century Crafts New-York, 2, p. 225-297.

- NICKLAS (R. B.), 1975. - Chromosome movement : current models and experiments on living cells.
In Molecules and Cell movements. S. INOUE and R. E. STEPHENS Eds., RAVEN Press New-York, p. 97-108.
- NORRBY (R.), LINDHOLM (L.) et LYCKE (E.), 1968. - Lysosomes of Toxoplasma gondii and their possible relationship to the host cell penetration of Toxoplasma parasites.
J. Bacteriol., 96, p. 916-919.
- NOWLIN (N.), 1922. - Correlation of the life cycle of a parasite with the metamorphosis of its host.
J. Parasit. 8, p. 153-160.
- OAKLEY (B. R.) et HEATH (I. B.), 1978. - The arrangement of microtubules in serially sectioned spindles of the alga Cryptomonas.
J. Cell Sci., 31, p. 53-70.
- O'MALLEY (B.W.) MEANS (A.R.) , 1974 . - Female steroid Hormones and target cell nuclei .
Science . , 183 , p. 610-619 .
- ORMIERES (R.), 1971. - Une grégarine paradoxale Gigaductus anchi. Tuz. Orm. 1966 : Ultrastructure de la schizogonie et position systématique des Gigaductidae Filipponi 1948.
Protistologica, 7, p. 261-271.
- ORMIERES (R.), LOUIS (C.) et KUHL (G.), 1972. - La schizogonie de première génération chez Mattesia oryzaephili Ormières, Louis et Kuhl (Sporozoa, Neogregarina). Etude ultrastructurale.
Protistologica, 8, p.287-294.
- OSTERGREN (G.), 1949. - Luzula and the mechanism of chromosome movements.
Hereditas, 35, p. 445-468.
- PALADE (G.), 1975. - Intracellular aspects of the process of protein synthesis.
Science, 189, p. 347-358.

PEPPER (D. A.) et BRINKLEY (B. R.), 1979. - Microtubule initiation at kinetochores and centrosomes in lysed mitotic cells. Inhibition of site specific nucleation by tubulin antibodies.

J. Cell Biol., V. 82, p. 585-591.

PHILIPPS (D. M.), 1969. - Exceptions to the prevailing pattern of tubules (9 + 9 + 2) in the sperm flagella of certain insects species.

J. Cell Biol., 40, p. 28-43.

PICKETT-HEAPS (J. D.), 1969. - The evolution of the mitotic apparatus : an attempt at comparative ultrastructural cytology in dividing plant cells.

Cytobios, 1, p. 257-280.

PICKETT-HEAPS (J. D.), 1971. - The autonomy of the centriole : fact or fallacy.

Cytobios, 3, p. 205-214.

PORCHET (M.) . 1974. - Activité endocrine cérébrale chez les Nereidae .

Données quantitatives , influence sur la teneur en glucides des ovocytes et du liquide coelomique , mécanisme régulateur de la sécrétion hormonale.

Thèse Doct. Etat Sci. Nat. LILLE .

PORCHET-HENNERE (E.), 1967. - Corrélations entre le cycle de développement de la Coccidie Myriosporides amphiglenae et celui de son hôte Amphiglana mediterranea (Annélide Polychète). Mode de contamination.

Protistologica 3, p. 451-455.

PORCHET-HENNERE (E.), 1968. - Evolution de la paroi du sporoblaste de la Coccidie Coelotropha durchoni étudiée en microscopie électronique.

C. R. Acad. Sci., t. 267, p. 1856-1857.

PORCHET-HENNERE (E.), 1969. - Corrélations entre le cycle biologique d'une Coccidie : Coelotropha durchoni VIVIER et celui de son hôte : Nereis diversicolor O. F. MÜLLER (Annélide Polychète). Etude expérimentale.

Z. Parasitenk. 31, p. 299-314.

- PORCHET-HENNERE (E.), 1971. - La fécondation et la sporogénèse chez la Coccidie Coelotropha durchoni. Etude en microscopie photonique et électronique. Z. Parasitenk. 37, p. 94-125.
- PORCHET-HENNERE (E.), 1972. - Considérations générales sur les processus de schizogonie chez les Sporozoaires à la lumière des données de la microscopie électronique. Ann. Biol., 11, p. 413-426.
- PORCHET-HENNERE (E.), 1977. - Etude ultrastructurale de la schizogonie chez la Coccidie Globidium gilruthi. Protistologica, T. XIII, fasc. 1, p. 31-52.
- PORCHET-HENNERE (E.) et FISCHER (A.), 1973. - Diplauxis schreveli, n. sp. Grégarine parasite du coelome de l'Annélide Polychète Platynereis dumerilii : cycle et étude ultrastructurale préliminaire. Protistologica, 1, IX (4), p. 437-454.
- PORCHET-HENNERE (E.) et RICHARD (A.), 1969. - Structure fine du sporoblaste immature uninucléé d'Aggregata eberthi Labbé (Sporozoaire Coccidiomorphe). C. R. Acad. Sci., 269, Série D, p. 1681-1683.
- PORCHET-HENNERE (E.) et RICHARD (A.), 1971. - La schizogonie chez Aggregata eberthi. Etude en microscopie électronique. Protistologica, VII, 2, p. 227-259.
- PORCHET-HENNERE (E.) et TORPIER (G.), 1977. - Etude du germe infectieux de Sarcocystis tenella et Toxoplasma gondii par la technique de cryodécapage. Z. Parasitenk., 54, p. 101-124.
- PORCHET-HENNERE (E.) et VIVIER (E.), 1971. - Ultrastructure comparée des germes infectieux (sporozoïtes - mérozoïtes, schizozoïtes, endozoïtes, etc...) chez les Sporozoaires. Ann. Biol., X, fasc. 1-2, p. 77-113.

PRENSIER (G.), 1970. - Premières observations ultrastructurales sur la formation des sporozoïtes à partir du sporoblaste chez Diplauxis hatti.

C. R. Acad. Sci., 270, p. 100-103.

PRENSIER (G.), 1970. - Structure de la paroi du sporoblaste et origine du complexe membranaire interne du sporozoïte de Diplauxis hatti (Grégarine Monocystidée), démontrée par la microscopie électronique.

C. R. Acad. Sci., 271, p. 2329-2331.

PRENSIER (G.), 1971. - Contribution à l'étude ultrastructurale des différents stades du cycle de Diplauxis hatti (Grégarine Monocystidée, parasite de Perinereis cultrifera Grube).

Thèse 3ième Cycle (Lille).

PRENSIER (G.), 1971. - Formation du sporozoïte dans le sporoblaste de Diplauxis hatti (Grégarine Monocystidée).

J. Protozool., 18 supplt., p. 50-51.

PRENSIER (G.), 1972. - Apparition d'un fuseau de division lié aux membranes ergastoplasmiques lors de la mitose chez Diplauxis hatti.

J. Microsc. Biol. Cell, 14, p. 82 a-83 a.

PRENSIER (G.), 1972. - Aspect ultrastructural des gamontes et mécanisme d'individualisation des gamètes chez Diplauxis hatti.

J. Protozool., 19 supplt., p. 71-72.

PRENSIER (G.), 1973. - Etude de la mitose chez la Grégarine Diplauxis hatti. Progress in Protozoology, p. 327, 4th International Congress of Protozoology, Clermont-Ferrand.

PRENSIER (G.), 1973. - Formation d'un flagelle atypique, sans structure centriolaire basale au cours de la gamétogenèse chez Diplauxis hatti.

J. de Microscopie, Paris, 17, 88 a.

PRENSIER (G.), 1975. - Etude de la mitose sporogonique par la technique des coupes sériées chez Diplauxis hatti (Grégarine Monocystidée).

J. de Microscopie, Paris, 23, 68 a.

PRENSIER (G.) et FERREIRA (E.), 1978. - Mécanisme d'infestation des larves de Perinereis cultrifera par les sporozoïtes de la Grégarine Diplauxis hatti. J. Protozool.

PRENSIER (G.), VIVIER (E.), GOLDSTEIN (S.) et SCHREVEL (J.), 1980. - Motile flagellum with a 3 + 0 ultrastructure. Science, vol. 207, n° 4438, p. 14 93..~~1494~~

RANDALL (J.), WARR (J. R.), HOPKINS (J. M.) et Mc WITTIE (A.), 1964. - A single gene mutation of Chlamydomonas reinhardii affecting motility : a genetic and electron microscope study. Nature (London), 203, p. 912-914.

REGER (J. F.), 1967. - The fine structure of the Gregarine Pyxinoïdes balani, parasitic in the barnacle Balanus tintinnabulum. J. Protozool., 14, p. 488-496.

REGER (J. F.) et FLORENDO (N. T.), 1970. - Observations on microgamonts and microgametes of the Coccidian, Eimeria sp. parasitic in the ostracod Cypridopsis sp. Submicrosc. Cytol., 2, p. 69-78.

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, p. 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, p. 208.

ROBERTS (W. L.), HAMMOND (D. M.), ANDERSON (L.) et SPEER (L. A.), 1970. - Ultrastructural study of schizogony in Eimeria callospermophili. J. Protozool., 17, p. 584-592.

ROBERTS (W. L.), HAMMOND (D. M.) et SPEER (C. A.), 1970. - Ultrastructural study of the intra and extracellular sporozoïtes of Eimeria callospermophili. J. Parasitol., 56, N° 5, p. 907-917.

ROBERTS (W. L.), SPEER (C. A.) et HAMMOND (D. M.), 1971. - Penetration of Eimeria larimerensis sporozoites into cultured cells as observed with the light and electron microscopes.

J. Parasitol., 57, p. 615-625.

ROOS (U. P.), 1973. - Light and electron microscopy of rat Kangaroo Cells in mitosis. II - Kinetochore structure and function.

Chromosoma (Berlin), 41, p. 195-220.

ROTH (L. E.) et DANIELS (E. W.), 1962. - Electron microscopic studies of mitosis in amebae.

J. Cell Biol., 12, p. 57-78.

RUDZINSKA (M. A.), TRAGER (W.), LEWENGRUB (S. J.) et GUBERT (E.), 1976. - An electron microscopic study of Babesia microti invading erythrocytes.

Cell Tissue Res., 169, p. 323-324.

RYLEY (J. F.), BENTLEY (M.), MANNERS (D. J.) et STARK (J. R.), 1969. - Amylopectin, the storage polysaccharide of the Coccidia Eimeria brunetti and E. tenella.

J. Parasitol., 55, p. 839-845.

SAINT JOSEPH (Baron de), 1895. - Les Annélides Polychètes des côtes de Dinard. Ann. Sci. Nat., Zool., 7ème série, 20, p. 185-275.

SAKAI (A.) et SHIGENAGA (M.), 1972. - Electron microscopy of dividing cells IV - Behaviour of spindle microtubules during nuclear division in the plasmodium of myxomycete Physarum polycephalum.

Chromosoma, 37, p. 101-116.

SALMON (E. D.), 1975. - Spindle microtubules : thermodynamics of in vivo assembly and role in chromosome movement.

Ann. New-York Acad. Sci., 253, p. 383-406.

SATIR (P.), 1968. - Studies on cilia. III - Further studies of the cilium tip and a "sliding filament" model of ciliary motility.

J. Cell Biol., 39, p. 77-94.

SCHMIDT (K.), JOHNSTON (M. R. L.) et STEHBENS (W. E.), 1967. - Fine structure of the schizont and mérozoïte of Isospora sp. (Sporozoa : Eimeriidae) parasitic in Gehyra variegata (Dumeril and Bibron, 1836) (Reptilia : Gekkonidae). J. Protozool., 14, p. 602-608.

SCHNEIDER (A.), 1875. - Contribution à l'histoire des Grégarines des Invertébrés de Paris et de Roscoff. Arch. Zool. Exp. Gen., 4, p. 493-604.

SCHOLTYSECK (E.) et CHOBOTAR (B.), 1975. - Electron microscope observations concerning the penetration of a host cell by Eimeria ferrisi in vivo. Z. Parasitenk., 49, p. 91-94.

SCHOLTYSECK (E.) et MEHLHORN (H.), 1970. - Ultrastructural study of characteristic organelles (paired organelles, micronemes, micropores) of Sporozoa and related organisms. Z. Parasitenk., 34, p. 97-127.

SCHOLTYSECK (E.), MEHLHORN (H.) et FRIEDHOFF (K.), 1970. - The fine structure of the conoid of Sporozoa and related organisms. Z. Parasitenk., 34, p. 68-94.

SCHREVEL (J.), 1968. - L'ultrastructure de la région antérieure de la Grégarine Selenidium et son intérêt pour l'étude de la nutrition chez les Sporozoaires. J. Microscopie, Paris, 7, p. 391-410.

SCHREVEL (J.), 1971. - Les polysaccharides de réserve chez les Sporozoaires. Ann. Biol., 10, p. 31-52.

SCHREVEL (J.) et BESSE (C.), 1975. - Un type flagellaire fonctionnel de base 6 + 0. J. Cell Biol., 66, p. 492-507.

SELIVERSTOVA (V. G.), 1970. - Some data on the oocyst sheat formation in Eimeria tenella (Sporozoa - Eimeriidae) (En Russe). Tsitologiya, 12, p. 238-242.

SENAUD (J.), 1967. - Contribution à l'étude des Sarcosporidies et des Toxoplasmes.

Protistologica, 3, p. 167-232.

SENAUD (J.) et ČERNÁ (Z.), 1969. - Etude ultrastructurale des mérozoïtes et de la schizogonie des Coccidies (Eimeriina) : Eimeria magna (Pérard 1925) de l'intestin des lapins et E. tenella (Railliet et Lucet 1891) des coecums des poulets.

J. Protozool., 16, p. 155-165.

SHEETZ (M. P.) et SINGER (J. J.), 1974. - Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions.

Proc. Nat. Acad. Sc. U. S. A., 71, p. 4457-4461.

SHEFFIELD (H.), 1966. - Electron microscope study of the proliferation form of Besnoitia jellisoni.

J. Parasitol., 52, p. 583-594.

SHEFFIELD (H. G.), GARNHAM (P. C. C.) et SHIROISHI (T.), 1971. - The fine structure of the sporozoïte of Lankesteria culicis.

J. Protozool., 18, p. 98-105.

SHEFFIELD (H. G.) et HAMMOND (D. M.), 1966. - Fine structure of first generation merozoïtes of Eimeria bovis.

J. Parasitol., 52, p. 595-606.

SHEFFIELD (H. G.) et HAMMOND (D. M.), 1967. - Electron microscope observations on the development of first generation merozoïtes of Eimeria bovis.

J. Parasitol., 53, n° 4, p. 831-840.

SICHEL (G.), 1964. - Ricerche sui coelomociti dei policheti. IV - Osservazioni sull'ultrastruttura dei coelomociti di Perinereis cultrifera (Grübe)

P. C. (G.) Boll. Accad. Gioenia Sci. Nat. Catania, 76, n° 257, p. 86-93.

SLEIGH (M. A.), 1962. - The biology of cilia and flagella.

Pergamon Press Inc. Elms ford NY., p. 1-229.

SLEIGH (M. A.), 1968. - Patterns of ciliary beating.

Symp. Soc. Exp. Biol., 22, p. 131-150.

SNIGIREVSKAYA (E. S.), 1969. - Changes in the ultrastructure of the nucleus and of the kinetic apparatus during microgametogenesis in Coccidian Eimeria intestinalis and E. magna.

In STRELKOV (A. A.), SUKHANOVA (K. M.) et RAIKOV (I. B.). Eds. Progress in Protozoology, 3rd Int. Congr. Protozoology Leningrad 1969, p. 73, Nauka Leningrad.

SNIGIREVSKAYA (E. S.), 1969. - Electron microscopic study of the schizogony process in Eimeria intestinalis (en russe).

Acta Protozool., 7, 57-67.

SNYDER (J. A.) et Mc INTOSH (J. R.), 1975. - Initiation and growth of microtubules from mitotic centers in lysed mammalian cells.

J. Cell Biol., 67, p. 744-760.

STEPHENS (R. E.), 1973. - A thermodynamic analysis of mitotic spindle equilibrium at active metaphase.

J. Cell Biol., 57, p. 133-147.

SUMMERS (K. E.) et GIBBONS (I. R.), 1971. - Adenonine triphosphate induced sliding of tubules in trypsin treated flagella of sea urchin sperm.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 68, p. 3092-3096.

TAKEUCHI (T.), 1977. - Ultrastructural study on the mechanism of entry into host cells in Toxoplasma gondii.

Jap. Journal Parasitol., 26, p. 75-85.

TATA (J.R.) . 1970 . - Regulation of protein synthesis by growth and developmental Hormones .

In Biochemical Actions of Hormones . ACADEMIC PRESS . NEW YORK . I , p. 89-133

TATA (J.R.) SMITH (D.F.) . 1979 . - Vitellogenesis . Versatile model for hormonal regulation of gene expression . Recent progress in Hormone research R.O. GREER Edt. ACADEMIC PRESS NEW YORK . 35 , p. 47-96 .

TELZER (B. R.), MOSES (M. J.) et ROSENBAUM (J. L.), 1975. - Assembly of microtubules and kinetochores of isolated mitotic chromosomes of HeLa cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 72, p. 4023-4027.

TELZER (B. R.) et ROSENBAUM (J. L.), 1977. - Assembly of microtubules and kinetochores centrioles and pericentriolar material of mitotic HeLa cells.

J. Cell Biol., 75, p. 281 a.

TERZAKIS (J. A.), 1968. - Uranyl acetate, a stain and a fixative.

J. Ultr. Res. U. S. A., 22 (1-2), p. 168-184.

TERZAKIS (J. A.), 1971. - Transformation of the Plasmodium cynomolgi oocyst.

J. Protozool., 18, 1, p. 62-73.

THIERY (J. P.), 1967. - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique.

J. de Microscopie, 6-7, p. 987-1018.

TRONCHIN (G.) et SCHREVEL (J.), 1977. - Chronologie des modifications ultra-structurales au cours de la croissance de Gregarina blaberae.

J. Protozool., 24 (1), p. 67-82.

TUCKER (J. B.), 1967. - Changes in nuclear structure during binary fission in the ciliate Nassula.

J. Cell Sci., 2, p. 481.

VARGHESE (T.), 1975. - The fine structure of the endogenous stages of Eimeria Labbeana. 2°) Mature macrogamètes and young oocysts.

Z. Parasitenk., 46, p. 43-51.

VIVIER (E.), 1970. - Observations nouvelles sur la reproduction asexuée de Toxoplasma gondii et considérations sur la notion d'endogénèse.

C. R. Acad. Sci., 271, p. 2123-2126.

VIVIER E., 1970, -Criteria of fine structure to be considered for taxonomy of Sporozoa.

2nd Internat. Cong. of Parasitology , WASHINGTON.

J. of Parasitology , 56 , n°4 , Section II, part 1 , p. 354

VIVIER (E.), 1979. - Données nouvelles sur les Sporozoaires. Cytologie - cycle systématique.

Bull. Soc. Zool. de France 104, n° 4, p. 345-381.

VIVIER (E.), DEVAUCHELLE (G.), PETITPREZ (A.), PORCHET-HENNERE (E.), PRENSIER (G.), SCHREVEL (J.) et VINCKIER (D.), 1970. - Observations de cytologie comparée chez les Sporozoaires. I) Les structures superficielles chez les formes végétatives.

Protistologica, T. VI, Fasc. 1, p. 127-150.

VIVIER (E.), ORMIERES (R.) et TUZET (O.), 1964. - Observations sur le cycle et affinités des Grégarines parasites du Polychète Perinereis cultrifera Grube
Arch. Zool. Exp. Gen. 103, Notes et Revues n° 1, p. 20-29.

- VIVIER (E.) et PETITPREZ (A.), 1968. - Les ultrastructures superficielles et leur évolution au niveau de la jonction chez les couples de Diplauxis hatti parasite de Perinereis cultrifera.
C. R. Acad. Sci., 266 (Série D), p. 491-493.
- VIVIER (E.) et PETITPREZ (A.), 1968. - Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus fils chez Toxoplasma gondii.
J. Cell Biol., 43, p. 329-342.
- VIVIER (E.) et PETITPREZ (A.), 1972. - Données ultrastructurales complémentaires morphologiques et cytochimiques sur Toxoplasma gondii.
Protistologica, 8, p. 199-222.
- VIVIER (E.), PETITPREZ (A.) et LANDAU (I.), 1973. - Observations ultrastructurales sur la sporoblastogenèse de l'Hémogragérine Hepatozoon domerguei, Coccidie Adeleidea.
Protistologica, 8, p. 315-333.
- VIVIER (E.), PETITPREZ (A.) et PONCHEL (G.), 1974. - Multiplication nucléaire et schizogonie chez Anthemosoma (Piroplasma). Etude à l'aide de la microscopie électronique et des coupes sériées.
Protistologica, X, p. 113-123.
- VIVIER (E.), PETITPREZ (A.) et PRENSIER (G.), 1969. - Recherches sur les polysaccharides et les lipides chez la Grégarine Diplauxis hatti ; observations en microscopie électronique.
C. R. Acad. Sci., 268, p. 1197-1199.
- VIVIER E. , SCHREVEL J. et HENNERE E. , 1963 - Corrélations entre le cycle de quelques Sporozoaires et le cycle de leurs hôtes(Annélides Polychètes)
Protistologica . 102 - p. 231-238 .
- VIVIER (E.) et VICKERMAN (K.), 1974. - Divisions nucléaires chez les Protozoaires.
In DE PUYTORAC P. et GRAIN J. Eds., Actualités Protozoologiques. Vol. 1,
p. 161-177. Université de Clermont-Ferrand - CLERMONT-FERRAND.
- WARNER (F. D.), 1974. - In Cilia and Flagella.
M. A. SLEIGH Ed. (Academic press London), p. 11-37.

WARNER (F. D.), 1976. - Cross bridge mechanisms in ciliary motility the sliding bending conversion.

In Cell Motility, vol. C. R. Goldman, T. Pollard and J. Rosenbaum Eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor New-York, p. 891-914.

WARNER (F. D.), 1978. - Cation induced attachment of ciliary dynein cross bridges.

J. Cell Biol., 77, R 19-R 26.

WARNER (F. D.) et MEZA (I.), 1974. - Configuration of flagellar microtubule subunits.

J. Cell Sci., 15, p. 495-511.

WARNER (F. D.) et MITCHELL (D. R.), 1978. - Structural conformation of ciliary dynein arms and the generation of sliding forces in Tetrahymena cilia.

J. Cell Biol., 76, p. 261-277.

WARNER (F. D.) et SATIR (P.), 1973. - The substructure of ciliary microtubules.

J. Cell Sci., 12, p. 313-326.

WARNER (F. D.) et SATIR (P.), 1974. - The structural basis of ciliary bend formation. Radial spoke positional changes accompanying microtubule sliding.

J. Cell Biol., 63, p. 35-63.

WARR (J. R.), Mc WITTIE (A.), RANDALL (J. T.) et HOPKINS (J. M.), 1966. - Genetic control of flagellar structure in Chlamydomonas reinhardtii.

Genet. Res., 7, p. 335-351.

WEISENBERG (R. C.) et ROSENFELD (A. C.), 1975. - In vitro polymerisation of microtubules into asters and spindles in homogenates of surf clam eggs.

J. Cell Biol., 64, p. 146-158.

WHEAT (B. E.), JENSEN (J. B.), ERNST (J. V.) et CHOBOTAR (B.), 1976. - Ultra-structure of macrogametogenesis of Eimeria mivati.

Z. Parasitenk., 50, p. 125-136.

WYATT (G.R.) . 1972 . - Insect Hormones .

In Biochemical Actions of hormones .

ACADEMIC PRESS NEW YORK . II , p. 385-490 .

ZANETTI (N. C.), MITCHELL (D. R.) et WARNER (F. D.), 1979. - Effects of divalent cations on dynein cross bridging and ciliary microtubule sliding.

J. Cell Biol., 80, p. 573-588.