

N° d'ordre : 1026

50376
1983
211-1

50376
1983
211-1

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE

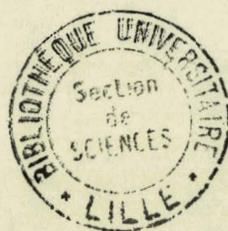
présentée pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR EN 3^{ème} CYCLE EN
BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALE**

par

Marc MEREAU

**UTILISATION DE TETRAHYMENA PYRIFORMIS SYNCHRONE
EN ECOTOXICOLOGIE : CONTRIBUTION A L'ETUDE DES EFFETS DU
THIRAME (FONGICIDE DITHIOCARBAMATE) SUR
L'ULTRASTRUCTURE CELLULAIRE**



Soutenu le 28 janvier 1983 devant la Commission d'Examen

Jury :	Président :	M. E. VIVIER
	Rapporteur :	M. D. DIVE
	Examineurs :	M. A. DHAINAUT
		M. H. LECLERC
		M. P. DE PUYTORAC

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur **E. VIVIER**, qui me fait le grand honneur de présider ce jury, a rendu possible les études ultrastructurales en mettant à ma disposition son laboratoire de Protistologie et de Microscopie Electronique à l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I, et en suivant régulièrement l'évolution de mes travaux.

Monsieur le Professeur **H. LECLERC** me fait l'honneur de participer à ce jury. En m'accueillant dans son service d'Ecotoxicologie Microbienne de l'Unité I.N.S.E.R.M.146, il m'a permis de trouver les moyens nécessaires pour réaliser les cultures synchrones; il n'a jamais hésité à me faciliter les conditions de travail.

Monsieur le Professeur **P. de PUYTORAC**, de l'Université de CLERMONT - FERRAND, en acceptant de venir participer à ce jury, me fait l'honneur de soumettre mes résultats à l'épreuve de son expérience.

L'enseignement de microscopie électronique de Monsieur le Professeur **A. DHAINAUT**, de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I, m'a été très profitable. Je suis particulièrement heureux qu'il ait bien voulu participer au jugement de cette thèse.

En me proposant ce sujet, Monsieur **D. DIVE**, Docteur ès Sciences, chargé de recherches à l'I.N.S.E.R.M., m'a accordé sa confiance. Il m'a aidé constamment de ses conseils, de ses critiques perspicaces et de ses encouragements. Sa présence dans ce jury me donne le plaisir de remettre ce travail à son examen.

Je prie Monsieur le Professeur **VIVIER**, Monsieur le Professeur **LECLERC**, Monsieur le Professeur **de PUYTORAC**, Monsieur le Professeur **DHAINAUT**, et Monsieur **DIVE**, d'accepter l'expression de ma vive reconnaissance et de mon profond respect.

Que mes amis du Laboratoire de Microscopie Electronique soient aussi très vivement remerciés : Madame **E. FERREIRA**, Monsieur **J.F. DUBREMETZ**, chargé de recherches au C.N.R.S., et Monsieur **G. PRENSIER**, Maître - Assistant à l'Université de LILLE I, pour m'avoir initié avec patience et dévouement à la microscopie électronique.

Mes remerciements vont également à l'équipe de l'Unité I.N.S.E.R.M. 146 et particulièrement à Madame **M.N.FOURMAUX-PRIEM**, à Madame **Cl. BEL** et à Monsieur **E. DEWAILLY** dont l'amitié m'a été très précieuse.

La dactylographie a été effectuée avec soin et célérité par Mesdames **C. DECHY** et **M. TOMCWAK**. Je tiens à leur exprimer tous mes remerciements.

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	p. 1
<u>PREMIERE PARTIE : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	p. 5
A - TETRAHYMENA PYRIFORMIS	p. 6
I - GENERALITES	p. 6
II - MORPHOLOGIE EXTERNE	p. 7
III - MORPHOLOGIE INTERNE	p. 7
- Appareil nucléaire	p. 7
- Le chondriome	p. 9
- Les peroxysomes et les lysosomes	p. 10
B - LA CROISSANCE SYNCHRONE ET SES IMPLICATIONS CHEZ TETRAHYMENA	p. 11
C - LE THIRAME	p. 13
<u>DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES</u>	p. 17
A - ENTRETIEN DE LA SOUCHE	p. 18
B - LA CULTURE SYNCHRONE	p. 19
C - LA NUMERATION CELLULAIRE	p. 22
D - PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	p. 23
I - FIXATION ET INCLUSION	p. 23
II - LES COUPES SEMI FINES ET ULTRAFINES	p. 24
III - ETUDES CYTOCHIMIQUES	p. 24
- Digestion enzymatique des protéines	p. 24
- Mise en évidence du glycogène	p. 24
- Mise en évidence de la phosphatase acide	p. 25
- Mise en évidence des ribonucléoprotéines	p. 26

<u>TROISIEME PARTIE : RESULTATS</u>	p. 27
<u>CHAPITRE I. MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE METHODE DE PREPARATION DES CELLULES EN DISPERSION POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE</u>	p. 28
<u>CHAPITRE II. ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE DE T. PYRIFORMIS G.L. SYNCHRONE EN ABSENCE DE TOXIQUE</u>	p. 30
A - LA COURBE DE CROISSANCE	p. 30
B - ETUDE DE L'ULTRASTRUCTURE DE TETREHYMENA AU COURS DU PREMIER CYCLE SYNCHRONE	p. 31
- Le noyau	p. 31
- Le chondriome	p. 32
- Le Reticulum endoplasmique et le Golgi	p. 32
- Le glycogène	p. 33
- Les peroxyosomes et les lysosomes	p. 33
<u>CHAPITRE III. EFFETS DU THIRAME</u>	p. 34
A - EFFETS DU T.M.T.D. SUR LA DIVISION SYNCHRONE DE LA POPULATION ET SUR LA MORPHOLOGIE GENERALE DES CILIES	p. 34
B - EFFETS DU T.M.T.D. SUR L'ULTRASTRUCTURE	p. 35
B ₁ - Effet de 1,25 µg/ml à T ₀	p. 35
B ₂ - Effet de 1,25 µg/ml à T ₉₀	p. 39
B ₃ - Effet d'une faible dose : 0,25 µg/ml	p. 40
B ₄ - Effet de 1,25 µg/ml de T.M.T.D. sur l'ultrastructure de <u>T. pyriformis</u> GL en culture exponentielle	p. 41
<u>DISCUSSION</u>	p. 43
- L'ULTRASTRUCTURE DES CELLULES NON INTOXIQUEES. L'INFLUENCE DES TRAITEMENTS DE SYNCHRONISATION	p. 44
- L'ACTION DU T.M.T.D.	p. 48
- Le noyau	p. 48

- Le chondriome	p. 52
- Le réticulum endoplasmique	p. 56
- Les gouttelettes lipidiques et le glycogène	p. 58
- INFLUENCE DE LA SYNCHRONISATION SUR LES EFFETS OBSERVES .	p. 59
<u>CONCLUSION</u>	p. 60
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p. 65

A B R E V I A T I O N S

DL 50	Dose létale 50%
CL 50	Concentration létale 50%
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
T.M.T.D.	Tetramethylthiuram disulfide (thirame)
E.D.T.A.	Ethyl diamine tétraacétique
A.F.T.	Après la fin du dernier choc thermique
R.E.R.	Reticulum endoplasmique rugueux
R.E.L.	Reticulum endoplasmique lisse

INTRODUCTION

Près de 50.000 substances chimiques de toute nature sont quotidiennement utilisées par les pays industrialisés ; plusieurs centaines de nouvelles molécules apparaissent sur les marchés chaque année.

Les conséquences désastreuses qu'ont entraîné certaines d'entre elles sur l'homme, soit par action toxique directe, soit au travers des écosystèmes qu'elles contaminent, ont suscité de nombreuses recherches en (éco) toxicologie.

Une série de tests toxicologiques faisant intervenir divers organismes (algues, daphnies, poissons, rongeurs, chiens, primates...) essentiellement basés sur la mortalité, permirent d'aboutir à une standardisation des procédures visant à normaliser les résultats (norme AFNOR pour la France) ; ces derniers se basent essentiellement sur les DL 50 et les CL 50 (toxicité aiguë). L'intérêt économique de ces expérimentations est évident : elles permettent une "quantification" de la toxicité des produits et leur classement relatif... ce qui n'est pas négligeable lorsqu'il s'agit de soumettre les industries polluantes à une taxation ou de faire l'estimation d'un nouveau produit.

Par contre sur le plan scientifique, leur intérêt est moindre. Ces analyses doivent être impérativement complétées, d'une part par l'étude de la toxicité à long terme et, d'autre part, par l'étude de l'influence des facteurs écologiques (biotiques et abiotiques) et de l'état physiologique des organismes testés (âge, jeûne, période de reproduction...) sur l'action des toxiques.

Ces études se heurtent à des problèmes méthodologiques complexes. L'emploi d'organismes supérieurs est indispensable pour l'appréciation des effets neurotoxiques et des effets sur les équilibres endocriniens, les systèmes respiratoire, hépatique, rénaux etc... même s'il n'est pas toujours aisé d'extrapoler à l'homme. De nombreuses critiques peuvent être faites comme :

- le coût et la durée de ces expérimentations sont considérables ;

- exceptés quelques animaux d'élevage (souris, rats...) le toxicologue dispose rarement d'une population animale homogène dont on connaît parfaitement le passé pathologique éventuel (cas d'expérimentation sur des chiens et des chats recueillis au hasard) ;

- les conditions d'élevage provoquent souvent des traumatismes psychologiques voire somatiques non sans effet sur les résultats expérimentaux.

Avant d'engager de tels travaux, il paraît utile d'entreprendre une analyse des effets cellulaires du toxique. L'emploi de cultures cellulaires permet de réaliser ces investigations dans des conditions expérimentales précises.

L'utilisation de cellules de mammifères présente un intérêt évident mais les techniques de cultures sont encore délicates et leur coût est très élevé (milieux sophistiqués).

Dans la mesure où il n'existe pas de cellule ou d'organisme représentatif du règne animal et encore moins de l'homme - les cellules cancéreuses sont des cellules très transformées - l'emploi de culture de protozoaires ciliés ne constitue pas une aberration biologique.

Des ciliés tels que *Colpidium campylum*, *Paramecium aurelia*, *Tetrahymena pyriformis* peuvent être entretenus en culture indéfiniment par simple repiquage. Des populations monospécifiques génétiquement homogènes sont obtenues très aisément. Néanmoins seuls *Tetrahymena* et *Paramecium* bénéficient d'un milieu de culture défini de réalisation simple.

Dans le cadre d'études préliminaires permettant de définir les affinités des toxiques envers les différents compartiments métaboliques cellulaires, l'emploi de culture de *T. pyriformis* G1 est très prometteur. La possibilité de synchroniser ses populations ouvre des perspectives nouvelles que ne permettaient pas d'entrevoir les cultures exponentielles. Le cycle synchrone de *Tetrahymena* étant très court, 3 h, un éventail très complet d'études (biochimie, ultrastructure, éthologie, influence des

facteurs biotiques et abiotiques notamment par l'analyse factorielle etc...) peuvent être très rapidement menées. Connaissant parfaitement l'horloge cellulaire, on peut étudier la relation existant entre toxicité et stade physiologique cellulaire. Disposant d'une population importante d'organismes (30.000 cell/ml), la réponse obtenue est hautement significative de l'espèce.

C'est dans cette optique que nous avons entrepris l'étude de l'ultrastructure de *T. pyriformis* G1 synchrone et de ses altérations consécutives à l'intoxication par un fongicide : le thirame.

Conjointement d'autres chercheurs abordaient la toxicologie de ce produit en étudiant l'activité enzymatique mitochondriale et la synthèse des macromolécules.

Ce cilié, essentiellement bactériophage dans le milieu naturel, est bien connu dans les écosystèmes aquatiques et dans l'interface aqueuse du sol. Il occupe une place importante dans l'économie trophique détritivore qui devient prédominant dans les écosystèmes altérés par les pollutions organiques et toxiques. En conséquence, ce test prend une dimension écotoxicologique originale.

PREMIERE PARTIE :

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

A - TETRAHYMENA PYRIFORMIS

I - GENERALITES

Tetrahymena pyriformis (EHRENGBERG, 1830) (124) est un protozoaire cilié holotriche d'eau douce distribué sur l'ensemble du continent européen et américain (124). Euryèce vis-à-vis de nombreux facteurs écologiques (10) tels que la température, la salinité, le pH, la lumière, la teneur en oxygène dissous, cette espèce colonise des biotopes aussi divers que des flaques temporaires, des mares, voire des sources thermales chaudes (41). Ce cilié occupe dans ces milieux une place clé : essentiellement bactériophage (35, 41), secondairement histophage (41), capable dans une certaine mesure d'utiliser la matière organique dissoute (151), il s'intègre dans la chaîne trophodynamique détritivore où son rôle de régulateur des populations bactériennes (31, 83) paraît essentiel au métabolisme de ces biotopes.

Son choix fréquent comme matériel biologique repose également sur d'autres critères :

- il s'agit vraisemblablement de l'un des organismes dont la biologie (écologie, biochimie, ultrastructure) est la mieux connue. Il est à ce titre considéré comme l'un des modèles de protozoaires à l'instar de *Escherichia coli* pour les bactéries (130) ;

- *T. pyriformis* se cultive très facilement sur différents types de milieux axéniques : il fut le premier à être maintenu ainsi en culture par LWOFF en 1923 (101) et un milieu minimum a été défini dès 1953 (71) ;

- par ailleurs, depuis les travaux de SCHERBAUM et ZEUTHEN (164, 165), de HAMBURGER et ZEUTHEN (59) et de ZEUTHEN (194, 195, 196), des cultures synchrones de *T. pyriformis* ont été mises au point.

II - MORPHOLOGIE EXTERNE

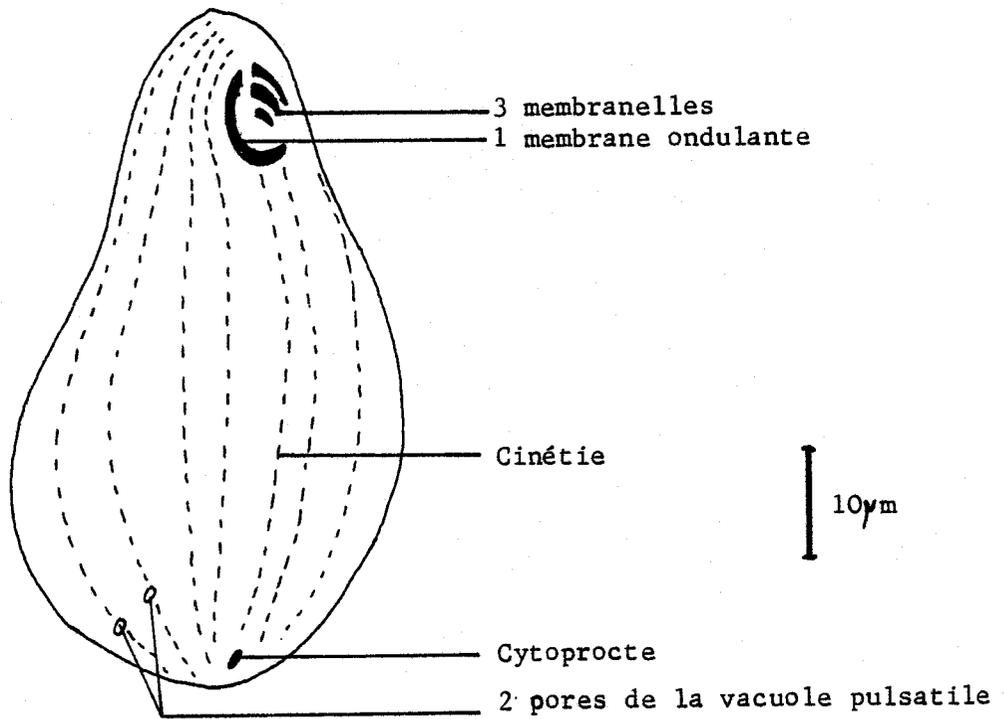
T. pyriformis est un cilié hyménostome d'environ 60 μm de long et 30 μm de diamètre, pyriforme et monomorphe pendant tout son cycle cellulaire. Sa morphologie générale et sa classification sont données à la fig. 1. Les cils, qui couvrent l'ensemble de l'organisme, sont organisés en une vingtaine de cinéties (124), disposés parallèlement dans le sens antéro-postérieur. A la partie antérieure de la cellule se trouve la cavité buccale débouchant dans le cytopharynx, site de formation des vacuoles digestives. La cavité buccale contient quatre membranelles d'où le nom de genre. Dans la zone postérieure de la cellule sont situés les deux pores de la vacuole pulsatile et le cytoprocte.

III - MORPHOLOGIE INTERNE

- Appareil nucléaire

Classiquement, beaucoup de ciliés possèdent un double appareil nucléaire : 1 macro-noyau polyploïde végétatif et 1 ou plusieurs micro-noyaux intervenant lors des phénomènes sexuels. Chez *Tetrahymena*, un certain nombre de souches sont dépourvues de micro-noyau et sont, par conséquent, incapables de conjuguer. Cela est le cas pour la souche que nous avons utilisée lors de notre travail (souche G1 de l'Institut Carlsberg de Copenhague).

Le macro-noyau, de 10 μm de diamètre, est situé juste sous le plan équatorial. Il est limité par une enveloppe constituée de deux membranes séparées par un espace intermembranaire (157). Cette enveloppe est percée de nombreux pores (20). Les nucléoles, au nombre de plusieurs centaines (500 à 1.000) (135), sont répartis en couronne à la périphérie du noyau, immédiatement dans la membrane interne à laquelle ils s'associent (19, 20, 21, 40, 43, 47, 56, 60, 157, 161, 176). Ces nucléoles ont la forme d'une cupule de 0,3 μm de diamètre (126) dont l'ouverture s'oriente souvent vers l'intérieur du noyau. Le centre de chacune de ces cupules est occupé par un corps dense : l'organisateur nucléolaire (20) constitué d'ADN qui se présente sous la forme d'une molécule libre, linéaire et de masse



Tetrahymena pyriformis G1
Place systématique

Phylum	Ciliophora
Classe	Oligohymenophora
Sous-classe	Hymenostomatia
Ordre	Hymenostomatida
Sous-ordre	Tetrahymenina
Famille	<i>Tetrahymenidae</i>
Genre	<i>Tetrahymena</i>
Espèce	<i>Pyriformis</i>
Souche	G1 (phenoset B)

FIG. 1. Dessin schématique (d'après NILSSON, 1976) et place systématique (d'après LEVINE et coll., 1980) de *T. pyriformis* G1.



moléculaire de 13.000.000 (45, 54). PERRY (147) et GALL (54) ont montré que les nucléoles sont le site de la synthèse de l'ARN ribosomal et de son association avec les protéines ribosomales pour former les sous-unités 60 S et 40 S (41). La chromatine se présente sous la forme de granules denses aux électrons d'environ 0,1 μm de diamètre (126), dispersés dans le nucléoplasme. Pendant la phase S, la chromatine se présente sous une configuration dispersée : chaque granule émet de nombreux filaments rayonnants ; au contraire, pendant les phases G1 et G2, chaque granule est condensé au sein d'un nucléoplasme d'aspect granulaire (126).

Le macronoyau de *Tetrahymena* est hautement polyploïde. Au moment de la division, des masses de chromatine s'individualisent ; ces agrégats ou "subnucléi", qui sont au nombre de 90, sont haploïdes (126, 130, 190, 191). Chaque "subnucléus" contient la même quantité d'ADN (126) ; la répartition des "subnucléi" dans les cellules filles est sensiblement identique (108).

La quantité d'ADN dans chaque cellule est très variable au sein d'une même population (130). La réplication de l'ADN est de type semi-conservatif mais il apparaît qu'à chaque phase S, un excédent d'ADN est synthétisé. La régulation de la quantité d'ADN cellulaire s'effectue par l'exclusion de globules appelés "corps chromatinien extra-nucléaires" contenant du matériel chromatinien, qui, dans le cytoplasme, est inclus dans une vacuole autophagique (28, 39, 52, 62, 107, 108, 126, 139, 160, 163, 168, 174, 186).

. Le chondriome

D'aspect cylindrique (3,5 μm de long et 0,8 μm de diamètre), les mitochondries sont limitées par deux membranes séparées par un espace inter-membranaire (158, 167). La membrane interne émet des tubules dans la matrice dont les constituants principaux sont : des mitoribosomes (24, 33, 143, 176), une molécule linéaire d'ADN de 100 μm de longueur (22, 175) et un équipement enzymatique intervenant dans les processus respiratoires (34, 99, 159). La mitochondrie est capable de biosynthétiser son ADN (14, 15, 24, 140, 141), son ARN (33, 143) et quelques-unes de ses protéines (1, 14, 116). Le chondriome se présente donc comme une entité structurale,

doué d'une autonomie partielle (65, 149) et placé sous le contrôle du génome nucléaire (143).

Dans les ciliés en phase exponentielle de croissance, les mitochondries sont situées en majorité à la périphérie de la cellule. Elles quittent cette disposition pour se répartir dans le cytoplasme pendant la phase stationnaire (42, 44).

Le chondriome se divise par divisions binaires selon un processus encore discuté (42, 74) comme nous le verrons plus loin.

. Les péroxysomes et les lysosomes

Ces organites d'environ 1 μ m de diamètre sont limités par une membrane unitaire contenant une matrice finement granulaire. ELLIOTT (41) et KOLB-BACHOFFEN et VOGELL(73) y localisant la phosphatase acide, les ont considérés comme des lysosomes primaires. MULLER (121, 122), WILLIAMS et LUFT (189), LARNED et ANTIPA (82) et NILSSON (128, 129, 130, 133), à la suite d'examens biochimiques, cyto-chimiques et morphologiques, s'opposent à cette détermination et considèrent ces organites comme des péroxysomes. Ce problème de distinction est fondamental car ces organites ont des rôles très différents : les lysosomes interviennent dans les processus de digestion en s'intégrant aux vacuoles digestives et autophagiques alors que les péroxysomes, grâce aux enzymes du cycle glycoxylique qu'ils contiennent, participent à la néoglucogénèse (123).

Le réticulum endoplasmique s'observe sous forme de citernes réticulaires qui s'associent étroitement aux mitochondries, à la membrane plasmique, à l'enveloppe nucléaire, aux vacuoles digestives et autophagiques (41, 42, 130). Associé à l'appareil de Golgi, il intervient dans les processus de synthèse membranaire, enzymatique, protéique et lipidique (8, 41, 130, 182).

Le glycogène a été mis en évidence chez *T. pyriformis* par MANNERS et RYLEY en 1952 (103). Il est formé par l'enchaînement de résidus glycosil, et constitue la réserve énergétique de la cellule qui est capable de le

synthétiser en utilisant une source de carbone exogène (103) ou endogène par néoglycogénèse (29, 61, 85, 88, 89, 90, 91, 103, 159, 169, 170). La réserve intracellulaire de glycogène varie en fonction des conditions de culture et peut atteindre près de 30 % du poids sec de la cellule (87, 88, 170). La distribution cytoplasmique du glycogène, telle qu'elle apparaît au microscope électronique, serait un indicateur de sa quantité : plus cette substance est abondante, plus elle occupe de grandes surfaces dans le cytoplasme (87, 130, 133).

B - LA CROISSANCE SYNCHRONE ET SES IMPLICATIONS CHEZ TETRAHYMENA

ANDERSEN et coll. (5), GABORIT (53) et SLIMANE (172) ont effectué des revues bibliographiques sur les différentes méthodes de synchronisation et leurs implications physiologiques. Parmi les méthodes sélectives (basées sur le tri des cellules se trouvant à un stade déterminé), celle proposée par LLOYD et coll. (100), utilisant la centrifugation différentielle, respecte le cycle cellulaire mais donne des résultats insuffisamment stables pour les besoins de notre travail. C'est aussi une méthode lourde et son rendement est faible (10 % des cellules contenues dans la culture avant centrifugation).

Parmi les méthodes inductives (bloquant toutes les cellules à un point quelconque de leur cycle, grâce à un traitement physique ou chimique) celle mise au point par ZEUTHEN (186), appelée "un choc thermique par génération", permet d'obtenir les résultats suivants :

- un taux de synchronisation élevé et reproductible (90 % lors de la première division synchrone) ;

- des cellules morphologiquement très comparables à celles maintenues en culture exponentielle (130, 133, 136) ;

- la réplication synchrone de l'ADN codant pour les ARN ribosomiaux dans les minutes qui suivent la division synchrone (4) ;

- une division synchrone du chondriome à la fin de la phase S (74) ;

- des synthèses et des activités enzymatiques (malate déshydrogénase et succinate déshydrogénase) comparables à celles observées dans les cultures exponentielles (48) ;

- une synthèse à taux constant des protéines durant tout le cycle cellulaire synchrone (48).

Néanmoins, les chocs thermiques induisent des altérations multiples mais réversibles dont on ignore encore l'origine exacte (18) :

- le cycle cellulaire de *T. pyriformis* G1 synchrone se caractérise par l'absence de phase G₁ (réplication de l'ADN immédiatement après la division) et une phase G₂ plus courte (le temps de génération est de 130 minutes au lieu de 150 minutes pour les cultures exponentielles) ;

- la réplication de l'ADN ribosomal s'effectue au début de la phase S juste après la division cellulaire dans les cultures synchrones (4), alors que d'après CHARRET (21), l'ADN nucléolaire se réplique en fin de phase S voire au début de phase G₂ dans les cultures exponentielles.

D'autres effets attribuables au choc thermique, n'ont pas été directement étudiés avec des cultures traitées suivant la méthode décrite par ZEUTHEN en 1971. Il s'agissait de choc thermique unique ou de chocs multiples rapprochés (164) :

- l'élévation de température modifie le métabolisme de l'ARN (27, 67, 81, 117, 118, 193). On observe la dégradation de l'ARN messager (16, 17, 118, 193), alors que l'ARN ribosomal n'est pas affecté. L'incorporation d'uridine tritiée dans l'ARN cellulaire total est réduit de 50 % mais il faut noter également une forte réduction de l'assimilation de nucléosides exogènes tels que l'adénosine tritiée qu'accompagne une chute de la quantité d'ATP (67) ;

- en ultrastructure, on observe, pendant l'exposition au choc thermique, une agrégation des nucléoles (126, 136), la présence de corpuscules denses dans la matrice mitochondriale (130), mais les cellules restaurent très rapidement une morphologie normale ;

- la perturbation du métabolisme de l'ARN messager a pour conséquence une inhibition de la synthèse des protéines nécessaires à la division (152, 187, 188) ;

- une régression de la structure buccale (63) entraînant la suspension transitoire de l'endocytose, a été observée. Les cellules recouvrent rapidement une morphologie normale à la fin du choc (130, 133, 136).

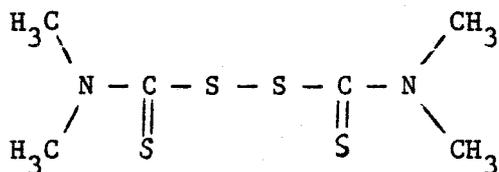
Toutes ces altérations doivent être prises en compte lors d'études toxicologiques car elles peuvent influencer l'action des toxiques. Toutefois, les avantages multiples présentés par la division synchrone sont manifestes et nous ont encouragé à utiliser la méthode de synchronisation décrite par ZEUTHEN en 1971 (196) : "un choc thermique par génération".

C - LE THIRAME

Le thirame est le nom d'origine américaine donné à un dithiocarbamate dont la formule brute est : $C_6 H_{12} N_2 S_4$. Il est appelé par les chimistes :

- Bis (diméthylthiocarbamate) disulfide,
- Tétraméthylthiuram disulfide (T.M.T.D.)
- Tétraméthylthioperoxydicarbonic diamide

La formule développée est la suivante :



Il entre pour près de 25 % dans la constitution de nombreux produits commercialisés : arasan (149) ou mercuran (72). Les domaines d'utilisation de ce produit sont multiples. L'industrie chimique l'utilise comme agent vulcanisant, stabilisant de copolymères, inhibiteur de corrosion (80, 156). L'industrie agro-alimentaire est l'un des plus gros consommateurs de T.M.T.D. En effet, ce produit présente de nombreuses propriétés : fongicide (30, 113, 120), bactériostatique (114) et insecticide (58, 180). Il possède également d'autres intérêts économiques secondaires : propriétés répulsives vis-à-vis de nombreux oiseaux et rongeurs (104, 177), antioxydant (181), algicide (166). En France, le T.M.T.D. constitue près de 64 % du marché des fongicides (162) utilisés dans l'agriculture.

Ce n'est qu'à partir des années 1960, soit 40 ans après le début de son utilisation industrielle, que l'on s'est soucié de l'action du thirame sur les organismes et sur l'environnement. On s'est alors rendu compte que le thirame pouvait être toxique pour de nombreux organismes autres que les cibles d'utilisation en agriculture :

- bactériostatique à l'égard de certains cocci (183), le T.M.T.D. modifie profondément la microflore du sol par son action bactéricide sélective (70). Il est inactif envers les bactéries symbiontes des végétaux (46, 57, 138, 173) ;

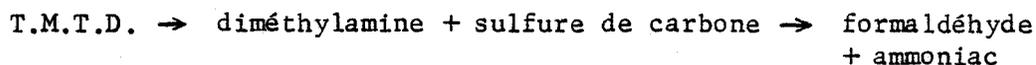
- les végétaux semblent très tolérants (sous respect de la réglementation française des pesticides agricoles : A.C.T.A., P.N.G.C.). On notera néanmoins une inhibition de la photosynthèse chez certaines algues (92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 184) ;

- le thirame inhibe la croissance des protozoaires ciliés pour des doses inférieures au ppm (53, 56). Il est toxique envers la Daphnie (111) et la limnée *Lymnae stagnalis* (12), alors que l'un de ses catabolites, la diméthylamine, corrode la peau et les branchies des poissons (125). Chez les mammifères et les oiseaux, le T.M.T.D. affecte le fonctionnement des gonades et de la thyroïde alors que chez l'homme en contact permanent avec ce produit, la quasi-totalité des organes sont touchés : modification de la formule sanguine (75), dérèglements hormonaux (11), lésions du système

nerveux central (193), de l'appareil vasculaire (69), du système hépatobiliaire (68), de l'appareil visuel (171). On a également observé des dermatites et allergies (6, 105, 142), une embryotoxicité se manifestant notamment par des anomalies morphologiques foetales, une stérilité secondaire et des avortements.

L'action du T.M.T.D. sur ces activités enzymatiques cellulaires est complexe : tantôt activateur des nucléases hépatiques (186), il est aussi inhibiteur des enzymes respiratoires (7, 76, 77). FOURMAUX -PRIEM (48) a montré que ce toxique bloquait chez T. pyriformis synchrone l'évolution de l'activité totale de la malate déshydrogénase et de la succinate déshydrogénase sans provoquer aucune chute d'activité. Sur le même matériel biologique, SLIMANE (172) a constaté une nette diminution de la synthèse de l'ADN et de l'ARN après l'addition de thirame dans le milieu de culture.

Le thirame est métabolisé par les bactéries selon les réactions suivantes (102) :



Ces produits de dégradation s'observent aussi dans les urines des ruminants et d'autres mammifères (109, 155); toutefois, ces substances de dégradation sont potentiellement toxiques : ainsi le disulfure de carbone inhibe la monoamineoxydase et l'alcooldéshydrogénase (109, 155). La diméthylamine se combine aux nitrites pour former la diméthylnitrosamine dont le caractère carcinogène est bien connu.

Quelques hypothèses ont été avancées quant au mode d'action du thirame : LINDHALL et ALKERSTRÖM (98) ainsi que DUBOIS et coll.(37) pensent que le T.M.T.D. inhibe les enzymes respiratoires en bloquant de façon réversible les fonctions thiol de ces enzymes.

Néanmoins, il ressort des études citées plus haut que le thirame ne possède pas une seule cible moléculaire, mais touche, à des degrés divers, l'ensemble des fonctions cellulaires, l'une d'entr'elles pouvant être déterminante. C'est pourquoi il nous a semblé intéressant d'entreprendre une étude au microscope électronique; aucune analyse ultrastructurale des effets du

thirame n'avait été réalisée précédemment. Un tel travail pouvait permettre une orientation des recherches en fonction des structures cellulaires les plus sensibles.

DEUXIEME PARTIE :

MATERIEL ET METHODES

A - ENTRETIEN DE LA SOUCHE

Tetrahymena pyriformis G1 provient de l'Institut Biologique de la Fondation Carlsberg de Copenhague. Il est maintenu à 28°C en phase exponentielle de croissance par repiquage quotidien de la culture de façon stérile, sur milieu P.P.Y.S. (PLESNER et coll., 148), à raison de 50 µl pour 10 ml de milieu dans des Erlenmeyer de 125 ml.

Composition du milieu P.P.Y.S.

- Protéose Peptone Base	100	ml
- Solution A	1	ml
- Solution B	1	ml

a) Protéose peptone base

- Protéose peptone	7,5	g
- Yeast extract	7,5	g
- Eau distillée q.s.p.	1	l

b) Solution A

- Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	1	g
- Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 6 H ₂ O	0,25	g
- Mn Cl ₂ , 4 H ₂ O	5	mg
- Zn Cl ₂	0,5	mg
- Eau distillée q.s.p.	100	ml

c) Solution B

- Ca Cl ₂ , 2 H ₂ O	0,5	g
- Cu Cl ₂ , 2 H ₂ O	50	mg
- Fe Cl ₃ , 6 H ₂ O	12,5	mg
- Eau distillée q.s.p.	100	ml

Après avoir bouilli 5 minutes, le milieu P.P.Y.S. est filtré sur papier filtre sans cendre et est stérilisé à 121°C pendant 20 minutes.

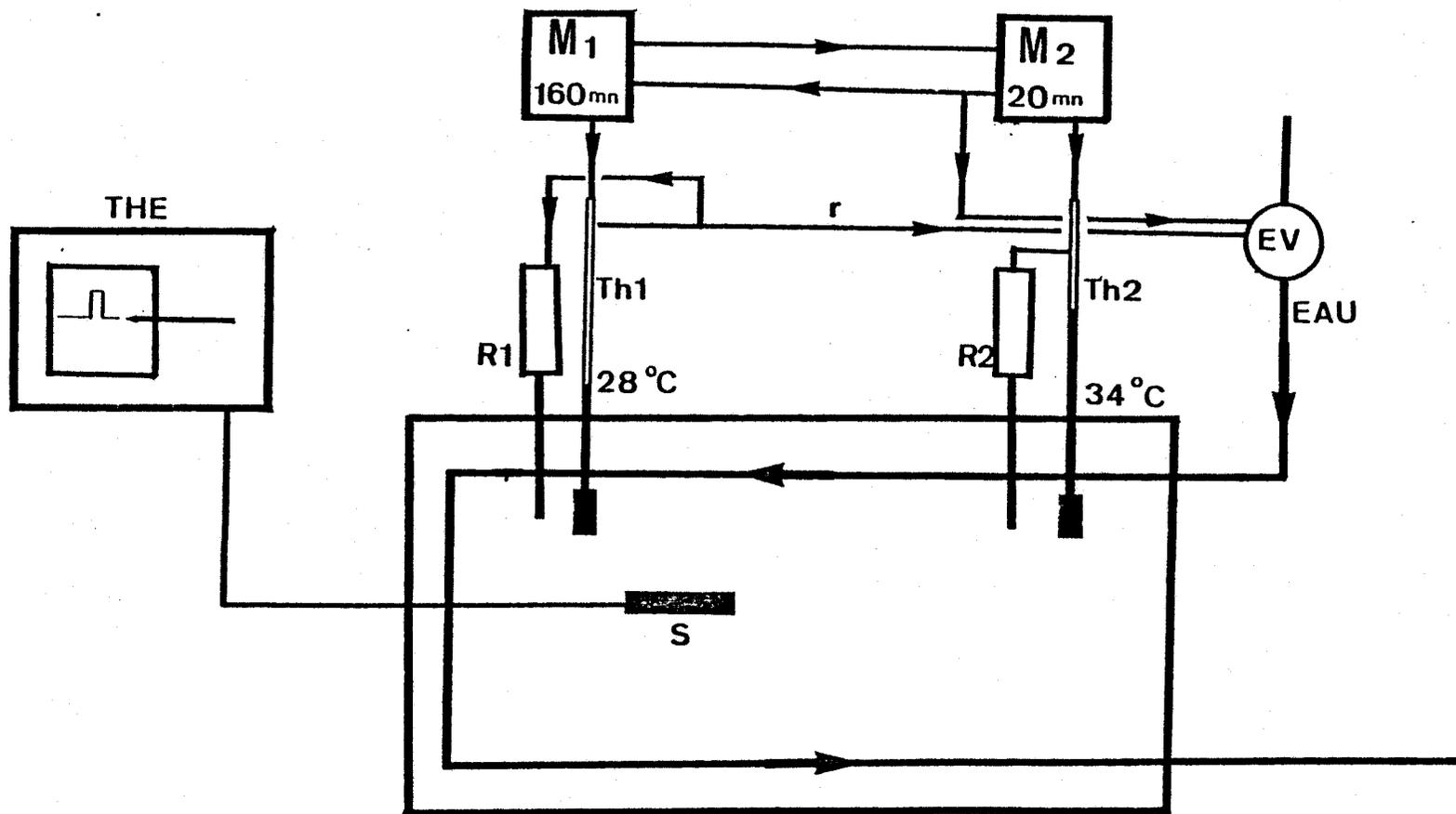


FIG. 2a - SCHEMA DU SYSTEME DE SYNCHRONISATION :

- M1, M2 - Minuterics dirigeant respectivement les thermomètres régulateurs Th. 1 et Th. 2
- R1, R2 - Résistances chauffantes
- EV - Electrovanne ouvrant le circuit de refroidissement à la fin du cycle de M₂
- r - Fermeture de l'électrovanne quand la température est revenue à 28° C
- s - Sonde de température
- THE - Thermographe enregistrant la température de l'eau du bain-marie



Pour l'entretien de la souche en collection, les cultures sont maintenues à 13 - 15°C et repiquées tous les mois.

B - LA CULTURE SYNCHRONE

La technique de synchronisation utilisée est celle décrite par ZEUTHEN en 1971 (196) : "un choc thermique par génération". L'appareillage qui est décrit à la fig. 2a, comprend un bain-marie à agitation giratoire (New-Brunswick Scientific), transformé pour les besoins de l'étude. Le principe de synchronisation adopté ici consiste à soumettre brutalement les cellules à une température sub-léthale (33°9 C) qui stoppe la multiplication. Chaque choc thermique d'une durée de 20 mn est suivi d'une période de culture à la température normale de croissance (28°C), d'une durée égale au temps de génération normal de la souche (160 mn). La culture subit 6 cycles successifs avant d'être utilisée pour l'expérimentation (Fig. 2 b).

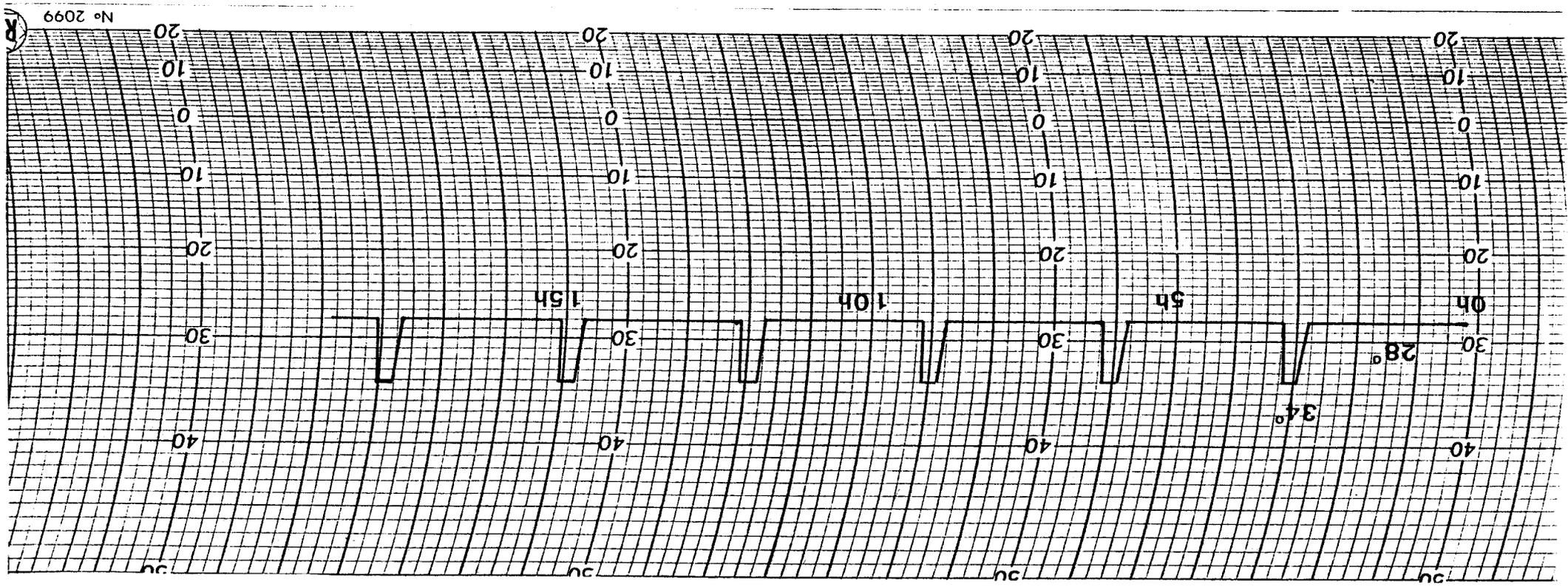
Le taux de synchronisation obtenu dépend étroitement de la précision du traitement thermique d'une part, et de la rapidité de la montée et de l'abaissement de température (3 à 5 minutes au maximum) d'autre part.

PLESNER, RASMUSSEN et ZEUTHEN (148) ont décrit les méthodes pratiques utilisables pour la synchronisation qu'a adaptées GABORIT (53) pour les études en toxicologie.

Les cultures ont été réalisées dans des fioles de FERNBACH de 2.500 ml contenant 700 ml de milieu P.P.Y.S. conditionné selon la fig.2c afin de permettre le renouvellement de l'atmosphère au-dessus des cultures. Une agitation modérée (71 rpm) permet d'obtenir une homogénéisation correcte du milieu. L'inoculum provient d'une culture de moins de 24 heures. La concentration initiale est de 800 cellules/ml. L'inoculum est calculé de façon à obtenir, à la suite de 18 heures de traitement thermique, environ 30.000 cellules/ml.



FIG. 2b - Variations de température au cours du traitement de synchronisation



N° 2099

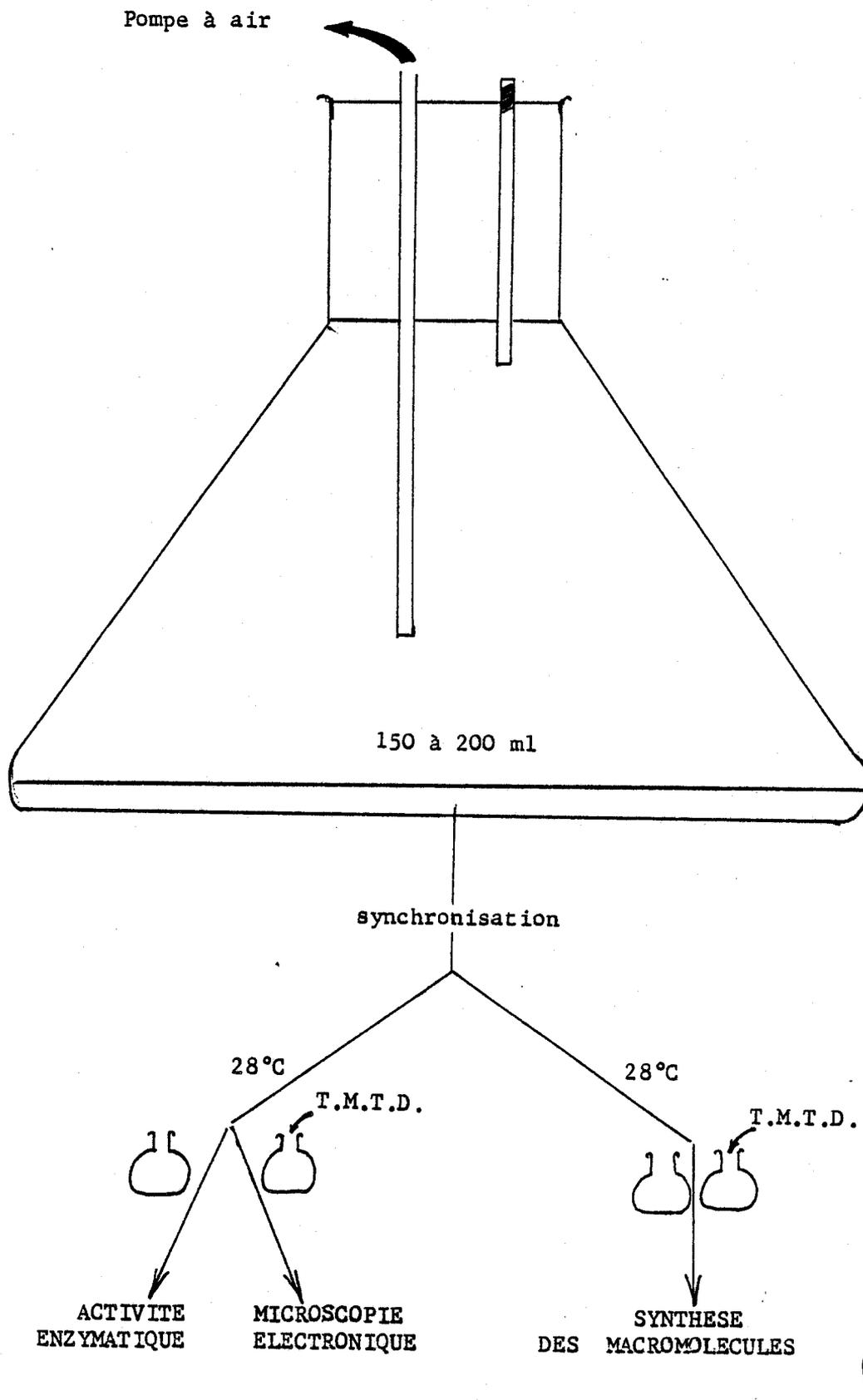


Fig. 2c: CONDITIONNEMENT ET UTILISATION DE LA CULTURE SYNCHRONE

C - NUMÉRATION CELLULAIRE

Le principe de l'appareil (Coulter counter modèle Z Bic), est le suivant : une sonde S, remplie d'électrolyte, est percée d'un micro-orifice calibré matérialisant un canal de volume connu. Deux électrodes impolarisables (platine) situées de part et d'autre du micro-orifice, permettent d'appliquer un courant continu réglable et de mesurer la résistance du système qui dépend de la forme géométrique de l'orifice et de la conductivité de l'électrolyte. La sonde est reliée à un manomètre à mercure et à un système de vide, l'ensemble permettant l'aspiration d'un volume connu d'électrolytes, contenant les particules à énumérer au travers du micro-orifice dont le diamètre est calculé de façon à ce que les particules en suspension le traversent une à une. Chaque fois qu'une particule pénètre dans le micro-orifice, elle déplace un volume d'électrolyte égal à son propre volume et modifie la résistance du système. Comme le passage est très rapide, la modification de résistance est très brève et constitue une impulsion qui est captée et enregistrée. L'étalonnage de l'appareil est réalisé à l'aide d'une suspension de particules de taille proche des protozoaires étudiés (pollen de noisetier).

L'échantillon à dénombrer (1 ml) est fixé par 1 ml de formol à 4 %. 10 ml d'électrolyte (NaCl à 1 %, filtré sur membrane millipore de 0,45 µm de diamètre de pore), sont ajoutés à la suspension en vue du comptage. Après homogénéisation, on pratique trois comptages (0,5 ml à chaque numération). L'échantillon étant dilué 12 fois et chaque comptage effectué sur 0,5 ml, le nombre de cellules contenues dans 1 ml de culture s'obtient en multipliant la somme N, des trois comptages, par 8 :

$\frac{N}{1,5} \times 12 = N \times 8$. Les réglages du coulter counter sont les suivants :

- Diamètre du microorifice : 200 µm
- Impédance d'entrée : 10 KΩ
- Trimer de gain : 0
- Courant d'ouverture : 1
- Atténuateur : 2
- Seuil inférieur de détection des particules : 12 µm de diamètre de sphère équivalente.

D - PRÉPARATION DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE POUR LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

I - FIXATION ET INCLUSION

Pour les études ultra-structurales classiques, les cellules, rassemblées selon une nouvelle méthode (110) décrite au chapitre I de la troisième partie, sont traitées selon le protocole suivant :

- préfixation 20 minutes à la glutaraldéhyde 0,5% dans tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH : 7,4 ;
- lavage dans tampon phosphate 0,1 M, pH : 7,4 ;
- postfixation 1 heure à l'acide osmique 1 % dans tampon phosphate 0,1 M, pH : 7,4 ;
- lavages dans tampon phosphate 0,1 M, pH : 7,4, deux fois 10 minutes puis à l'eau distillée 10 minutes ;
- coloration à l'acétate d'uranyle 1 % dans l'alcool 70° ;
- déshydratation dans des bains d'alcool de degré croissant :
 - . 2 fois 10 minutes dans l'alcool 70°
 - . 2 fois 10 minutes dans l'alcool 95°
 - . 3 fois 10 minutes dans l'alcool 100°
- élimination de l'alcool par 3 bains de 1/4 heure chaque dans l'oxyde de propylène ;
- imprégnation dans le mélange : 1 volume d'oxyde de propylène, 1 volume de résine d'inclusion pendant 1 heure ;
- l'inclusion s'effectue dans la résine EPON : 3 bains de 2 h. à température ambiante puis la polymérisation est effectuée à 60°C pendant 72 h.

II - LES COUPES SEMI-FINES ET ULTRAFINES

Les coupes semi-fines (1 à 2 μm d'épaisseur) ont été réalisées au couteau de verre à l'aide d'un microtome Porter Blum. Recueillies sur lame de verre, elles sont colorées à l'azur III - Bleu de méthylène (154) et examinées au microscope optique.

Les coupes ultrafines sont réalisées à l'aide d'un couteau de diamant (LEITZ ou DIAMOND) avec un microtome Porter Blum et sont recueillies sur des grilles en cuivre de 100 trous recouverts d'une membrane au parlodion, puis colorées à l'acétate d'uranyle (5 minutes) et au citrate de plomb (3 minutes) (153). Les observations s'effectuent au microscope électronique à transmission, HITACHI HU 11 E et JEOL JEM 100 CX.

III - ETUDES CYTO-CHIMIQUES

. Digestion enzymatique des protéines

Les coupes ultrafines sont recueillies sur grille or, puis flottées sur une solution de pronase 0,5 % dans l'eau distillée (pH ajusté à 7,4 par la soude 0,01 M) à 37°C pendant 40 minutes (119). Après rinçage à l'eau distillée, elles sont colorées à l'acétate d'uranyle puis au citrate de plomb (153).

. Mise en évidence du glycogène

Les coupes fines sont recueillies sur grille or puis flottées successivement sur les solutions suivantes, selon la méthode de SELIGMAN modifiée par THIERRY (178) :

- acide périodique à 1 % dans l'eau distillée pendant 20 mn ;
- lavage à l'eau distillée ;

- Thiocarbohydrazide (T.L.H.) à 0,2 % dans l'acide acétique (20 % dans l'eau distillée) pendant 35 mn ;

- lavages dans chaque solution d'acide acétique suivante (2 lavages rapides de 5 mn et 3 bains de 20 mn chaque) : 10 %, 5 %, 1 % ;

- lavages dans l'eau distillée (2 rapides de 5 mn puis 3 de 20 mn chaque) ;

- coloration au protéinate d'argent (ROQUE) à 1 % dans l'eau distillée pendant 30 mn à l'obscurité et à la température du laboratoire ;

- lavages à l'eau distillée avec la pissette.

Les coupes ainsi traitées, puis séchées, sont prêtes pour l'observation au microscope électronique.

. Mise en évidence de la phosphatase acide

La phosphatase acide est un enzyme caractéristique des lysosomes. Sa mise en évidence s'effectue selon la méthode proposée par MILLER et PALADE (115) :

- fixation des cellules dans la glutaraldéhyde 0,5 % dans tampon cacodylate 0,1 M, pH : 7,2, pendant 15 mn ;

- 3 lavages de 10 minutes dans le tampon cacodylate ;

- 2 lavages de deux minutes dans tampon acétate de sodium 0,1 M, pH : 7,4 ;

- incubation 1 h 30 mn à 37°C dans une solution de β -glycéro-phosphate de sodium et nitrate de plomb, préparée extemporanément à partir de :

. 10 volumes de $\text{NO}_3 \text{ Pb}$ à 0,12 % dans tampon acétate 0,1 M,

pH : 5,2 et 1 volume de β -glycéro-phosphate de sodium 3 % dans NaCl 3 %. Le mélange est dissous 1 heure à 60°C, puis laissé refroidi à la température du laboratoire, puis est filtré (filtre Whatman GFC 4,2 μ m de vide de pores).

- à ce stade les ciliés sont rassemblés selon la méthode décrite à la 3ème partie ;

- 2 lavages de 30 minutes dans tampon acétate 0,1 %, pH : 5,2 ;

- 2 lavages de 1 mn dans tampon cacodylate 0,1 M, pH : 7,2 ;

- post-fixation d'une heure dans une solution d'acide osmique à 2 % dans tampon cacodylate 0,1 M, pH : 7,2 ;

- lavage d'1 mn dans du tampon cacodylate 0,1 M, pH : 7,2 ;

- coloration à l'acétate d'uranyle à 1 % dans l'alcool 70° (1/4 d'heure) ;

- déshydratation et inclusion selon la méthode décrite au paragraphe D de la deuxième partie.

. Mise en évidence des ribonucléoprotéines

La mise en évidence des ribonucléoprotéines s'effectue selon la technique mise au point par BERNARD (8). Les cellules sont fixées 20 mn à la glutaraldéhyde 0,05 M dans du tampon phosphate 0,1 M, pH : 7,4, puis rassemblées selon notre méthode de rassemblement, puis incluses sans post-fixation osmique ni coloration à l'acétate d'uranyle.

Les coupes ultrafines sont recueillies sur des grilles en or à 200 trous, puis flottées sur une solution aqueuse d'acétate d'uranyle à 3 % pendant 1 mn 30 s. Après rinçage à l'eau distillée, les grilles sont flottées sur une solution aqueuse d'E.D.T.A. 0,2 M, pH : 7, pendant 15 mn, rincées à l'eau distillée, puis colorées au citrate de plomb (153) pendant une minute et rincées à l'eau distillée.

TROISIEME PARTIE :

RESULTATS

Les observations en microscopie électronique ont été menées conjointement avec deux autres séries d'études : synthèse des macromolécules (172) et dosage de l'activité d'enzymes mitochondriaux (48).

Il s'est alors avéré rapidement nécessaire de mettre au point une méthode de rassemblement et de fixation des ciliés. Le chapitre I est consacré à sa description.

Les effets de deux concentrations de thirame ajoutées à deux périodes de cycle synchrone ont été étudiés. Chaque expérience a été répétée au minimum trois fois. Au cours de chacune d'elles, l'ultrastructure des ciliés de la population témoin était contrôlée ; la synthèse de ces observations fait l'objet du deuxième chapitre. Le troisième est consacré aux effets du thirame.

CHAPITRE I - MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE MÉTHODE DE PRÉPARATION DES CELLULES EN DISPERSION POUR LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Le cycle synchrone de *T. pyriformis* G1 dure moins de 3 heures. De nombreux prélèvements étaient nécessaires afin de pouvoir suivre de façon précise le cycle de ce cilié. De plus, d'autres expériences étant menées simultanément sur la même culture, nos échantillons devaient être de volume réduit.

La centrifugation exige de nombreuses manipulations et n'est pas adaptée aux résines d'inclusion trop visqueuses. Le fibrinogène (25), le plasma de coq fraîchement extrait (55), les nucléohistones (64) et l'agar (26) ont été proposés pour obtenir des culots compacts. Mais ces techniques sont délicates et exigent des centrifugations préliminaires.

Avant d'entreprendre l'étude du cycle synchrone de *T. pyriformis* et de la toxicologie du thirame, la mise au point d'une méthode de rassemblement des ciliés s'avérait donc nécessaire. Elle devait être rapide, simple, ne nécessiter qu'un matériel courant et permettre des échantillonnages

de faible volume. Le culot obtenu devait être le plus compact, possible afin de pouvoir observer le maximum de ciliés par plan de coupe sans entraîner aucune altération morphologique. Après divers essais, nous avons retenu le principe de la filtration des ciliés sur membrane par succion. L'appareillage utilisé ne comprend qu'un matériel simple (fig. 4)

Le mode opératoire est le suivant (fig. 3) :

Préfixation : les cellules sont fixées dans leur milieu de culture (1 ml) avec 1 ml de glutaraldéhyde 1 % dans tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4. Ce mélange est laissé à température du laboratoire pendant 20 minutes.

Filtration : un filtre (F, fig. 4b), découpé dans un filtre Millipore du type RA de 1,2 μ m de vide de pores et préalablement humecté dans le tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4, est ajusté au sommet d'un tube de verre (p. fig. 4a) de diamètre externe et interne respectivement de 6 mm et 1 mm et maintenu en place par la succion qu'exerce la trompe à vide (V. fig. 4a). Les cellules préfixées sont transférées dans la pipette Pasteur (Pp. fig. 4a), à l'aide de la pompe péristaltique (p.p. fig. 4a). L'effilure de la pipette Pasteur est ensuite placée à environ 1 mm au dessus du filtre au regard de la lumière du tube de verre (fig. 4b). Puis en ajustant le débit d'écoulement de la pipette Pasteur à l'aide de la pompe péristaltique et la succion par la trompe à vide, les ciliés sont rassemblés en culot compact (pe. fig. 4b). Le filtre est ensuite immédiatement immergé dans une solution de lavage (tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4). La suite du protocole de fixation et de déshydratation s'effectue par transfert du filtre et du culot qui y reste adhérent, d'un bain à l'autre. Le culot est aisément séparé du filtre par un léger bombement de ce dernier au cours du deuxième bain d'alcool 100°. Bien que l'inclusion puisse s'effectuer en présence du filtre, il est préférable de l'éliminer à ce stade. En effet, au contact de l'oxyde de propylène, le filtre se dissout partiellement et certains débris peuvent enrober le culot, au risque de gêner l'inclusion.

Outre la grande simplicité et rapidité d'exécution, notre méthode assure une totale reproductibilité de la fixation d'une manipulation à l'autre.

Elle permet d'obtenir des culots compacts. Ainsi, de nombreuses cellules peuvent être observées sur chaque coupe (fig. 4c). Par ailleurs, elle permet des prélèvements rapprochés de faibles volumes.

Nous avons utilisé cette technique pour toutes les applications cytochimiques nécessaires à notre travail : la fixation glutaraldéhyde seule (coloration E.D.T.A) permet d'obtenir quand même des culots suffisamment stables. Cependant, dans le cas de la mise en évidence de la phosphatase acide, il est préférable de ne rassembler les ciliés qu'après leur mise en contact avec les réactifs. Sinon les cellules occupant le centre du culot ne sont pas "colorées". La compacité du bloc obtenu empêche vraisemblablement l'imprégnation rapide des cellules en position interne par les différents réactifs.

Malgré le temps qu'a nécessité sa mise au point, cette méthode nous a permis d'effectuer une étude systématique du cycle synchrone et de la toxicologie du thirame.

CHAPITRE II - ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE DE T. PYRIFORMIS GL SYNCHRONE EN ABSENCE DE TOXIQUE

A - LA COURBE DE CROISSANCE (fig.5a et b)

L'inoculum est calculé de telle sorte que la densité de la population après le traitement thermique soit le même pour toutes les expériences : 30 à 40.000 cellules par ml. La division synchrone débute vers $T_{85} - T_0$ AFT et 90 % des ciliés se sont divisés au temps T_{140} (T_0 désigne ici l'instant où la température de bain-marie est retournée à 28°C après le dernier choc thermique ; T_{20} , T_{80} , T_{140} correspondent respectivement à 20, 80, 140 minutes après T_0).

B - ETUDE DE L'ULTRASTRUCTURE DE TETRAHYMENA AU COURS DU PREMIER CYCLE

SYNCHRONE

. Le noyau

Pendant la partie de la phase G_2 précédant la première division synchrone (T_0 à T_{80}), le macronoyau, d'un aspect circulaire, présente des nucléoles d'environ $0,6 \mu\text{m}$ de diamètre, au nombre moyen de 60 à 70 par coupe équatoriale, organisés en une "couronne" caractéristique de l'espèce où chaque nucléole est disposé juste sous les membranes internes de l'enveloppe nucléaire (fig. 6 et 7a). Le nucléoplasme montre une configuration granulaire dense et homogène (fig. 6b et 7a). Les granules chromatiniens d'un diamètre variant entre $0,3$ et $0,08 \mu\text{m}$, ne paraissent pas être distribués au hasard mais semblent s'associer en "chapelets" (fig. 7a) où ils sont équidistants l'un à l'autre. Juste avant la division (T_{80} AFT), ces granules sont beaucoup plus nombreux (fig. 7b). A ce stade les nucléoles sont de taille plus réduite que précédemment ($0,4 \mu\text{m}$) mais plus nombreux (140 environ) et forment une double couronne périphérique (fig. 7c). On voit alors s'organiser dans le macronoyau des "subnucléi" au nombre de 35 environ par coupe équatoriale (fig. 8a). Ils se présentent sous forme d'ilôts de taille très variable (1 à $7 \mu\text{m}$) constitués de matériel granulaire dense aux électrons dans lesquels se regroupe la chromatine. Quelques uns, situés à proximité de l'enveloppe nucléaire, contiennent des nucléoles.

Pendant la division, le macronoyau s'allonge et la cellule présente une zone de constriction médiane (fig. 8b). Selon le plan de coupe, on peut observer une couronne nucléolaire désorganisée, certains nucléoles se trouvent au centre du noyau (fig. 8b) ou fusionnent (fig. 8c). Des microtubules s'observent dans le nucléoplasme (fig. 8d).

Les jeunes cellules filles montrent un noyau au contour irrégulier (fig. 9b). Les nucléoles, bien individualisés, d'un diamètre de $0,5 \mu\text{m}$ environ, nettement moins nombreux que pendant la phase de division (60 environ) se réorganisent en une couronne périphérique (fig. 9b, 9c). Les granules chro-

matiniens, moins nombreux mais de grande taille (0,15 à 0,35 μm) forment encore des groupes distincts qui correspondent peut-être à des "reliques" de "subnucléi" (fig. 9b).

La phase S : T₉₀ à T₁₇₀ (fig. 10 et 11) se caractérise par un accroissement de diamètre des nucléoles qui peuvent atteindre 1 μm . Au début de cette phase, les granules chromatiniens sont peu nombreux et émettent du matériel fibrillaire dans un nucléoplasme peu granulaire (fig. 10a). A T₁₇₀ AFT, soit en fin de phase S, le nucléoplasme apparaît de nouveau très granulaire ; les granules chromatiniens, dispersés, sont beaucoup plus nombreux et paraissent condensés (fig. 11). On peut observer à la fig. 10, la présence de globule légèrement contrasté où convergent des fibres émises par la chromatine. On ignore totalement sa composition. Par ailleurs, dans le cytoplasme, on peut relever l'existence d'un "globule chromatiniens extranucléaire".

. Le chondriome (fig. 6 à 11)

Le chondriome présente l'aspect caractéristique de l'espèce et ne montre pas d'altération de sa morphologie générale (fig. 9c). Les tubules sont très nombreux au cours de l'ensemble du cycle synchrone de telle sorte qu'ils apparaissent juxtaposés les uns aux autres. La matrice est légèrement sombre (fig. 6b, 7a, 8b et c, 9, 10, 11). Durant l'ensemble du cycle la matrice renferme quelquefois des corps denses (fig. 9c) dont on ignore la composition exacte (réaction négative à la pronase - fig. 14b). On notera par ailleurs que le chondriome se répartit dans l'ensemble du cytoplasme durant tout le cycle.

. Le réticulum endoplasmique et le Golgi

Le réticulum endoplasmique granulaire se présente sous forme d'un réseau simple (en opposition aux réseaux multiples où les citernes du réticulum s'associent en empilements ou en anneaux concentriques). Il s'observe au niveau des mitochondries (fig. 7a, 8c, 9b et c, 10b, 11b) quelquefois en

continuité avec l'enveloppe nucléaire (fig. 9c), de la membrane plasmique (fig. 10b), des vacuoles digestives (fig. 10a et b) ou encore libre dans le cytoplasme (fig. 7a et 10b).

On observe dans les mêmes zones mais de façon plus ponctuelle le réticulum lisse et les vésicules golgiennes (fig. 10b).

. Le glycogène

Le glycogène est présent dans le cytoplasme sous forme de particules plus ou moins contrastées (fig. 10b et 11b), d'un diamètre légèrement plus grand que celui des ribosomes, que l'on met en évidence par la coloration de THIERRY (178) (fig. 12a). Ces particules sont soit isolées, soit regroupées en îlots qu'aucune membrane ne limite. Ces îlots paraissent quelquefois "vides" (fig. 8d, 9a, 10a) à la suite de la préparation pour la microscopie électronique. Bien que variable d'une cellule à l'autre, la surface occupée par le glycogène semble augmenter légèrement pendant la division. Les cellules filles présentent des grains de glycogène occupant de larges surfaces (fig. 9a). Par la suite, ces îlots semblent se résorber (fig. 10) alors qu'en^{fin} de phase S, le glycogène se présente sous l'aspect de grains isolés et dispersés au sein du cytoplasme (fig. 11).

. Les péroxysomes et les lysosomes

Les organites visibles à la fig. 10b (Ly) limités par une membrane unitaire et contenant une matrice finement granulaire, présentent une réaction nettement positive à la mise en évidence de la phosphatase acide (fig. 13a).

Ces résultats ne concordent pas avec ceux de NILSSON (128, 129, 130, 133), de MULLER (121, 122), de WILLIAMS et LUFT (189), et LARNED et ANTIPA (80), mais confirment ceux de KOLB-BACHOFEN (71) et d'ELLIOTT (39).

Cette "coloration" est spécifique des lysosomes primaires. Ces organites ne correspondraient donc pas à des péroxysomes. La mise en évidence de la catalase permettrait d'identifier la morphologie de ces derniers.

CHAPITRE III - EFFET DU THIRAME

Des études antérieures ont montré la grande sensibilité de *Tetrahymena* à l'égard du T.M.T.D. et l'influence du moment de son ajout au cours du cycle cellulaire synchrone (51). En conséquence, nous avons testé deux concentrations inférieures à la dose létale qui est de 8 µg/ml (51) : 1,25 µg/ml et 0,25 µg/ml ajoutées à deux stades du cycle cellulaire synchrone : T_0 et T_{90} .

Le thirame est solubilisé dans l'acétone. La concentration de cette solution est calculée de façon à ce que 10 µl prélevés à l'aide d'une micropipette PEDERSEN suffisent pour obtenir dans les cultures, les quantités de T.M.T.D. recherchées. A cette concentration, l'acétone n'est pas toxique pour les ciliés (51) et s'évapore rapidement à la température du bain-marie (28°C).

A - EFFET DU T.M.T.D. SUR LA DIVISION SYNCHRONE DE LA POPULATION ET SUR LA MORPHOLOGIE GENERALE DES CILIES

Additionné à T_0 , 1,25 µg/ml de T.M.T.D. inhibe temporairement la division synchrone qui s'effectue avec près de 4 heures de retard. Ajouté à T_{90} , le T.M.T.D. bloque totalement la division qui a débuté et entraîne progressivement la mort des ciliés 170 minutes plus tard.

A la concentration de 0,25 µg/ml, additionné à T_0 , le T.M.T.D. induit un retard de division d'environ 30 minutes alors qu'ajouté à T_{90} , la division reprend vers T_{140} .

La morphologie des ciliés n'est pas modifiée lors de l'intoxication par les plus faibles concentrations. Au contraire, l'addition de T.M.T.D. à la concentration de 1,25 µg/ml entraîne des altérations prononcées (fig. 15). Lorsque le toxique est introduit à T_0 , les ciliés conservent leur aspect piriforme mais le cytoplasme devient granulaire, le noyau, moins apparent, présente des agrégats nucléolaires ; les cellules naissent lentement. Lorsque le T.M.T.D. est ajouté à T_{90} , la cytodivision est bloquée et les cellules conservent pendant quelques temps la configuration qu'elles présentaient au moment de l'ajout du toxique. La croissance des cellules filles est inhibée. Toutes les cellules s'arrondissent et s'immobilisent. Le cytoplasme se raréfie et certaines cellules éclatent. La vacuole pulsatile est très volumineuse.

B - EFFET DU T.M.T.D. SUR L'ULTRASTRUCTURE

Nous allons suivre l'évolution de l'ultrastructure cellulaire au cours du temps en fonction de la concentration et du moment d'ajout du toxique.

B₁ -- Effet de 1,25 µg/ml à T_0

. Fig. 16 et 17 : T_{10} à T_{40}

De nombreuses extrusions contenant du matériel chromatinien et des agrégats nucléolaires apparaissent à la périphérie du noyau ; certaines semblent s'en détacher (fig. 16a). La structure des nucléoles est fortement altérée : on observe de nombreux agrégats nucléolaires contenant deux organisateurs nucléolaires (fusion de deux nucléoles) (fig. 16a et b). Ces agrégats semblent être constitués en grande partie de matériel fibrillaire alors que le cortex granulaire paraît s'en désolidariser en se détachant par petits fragments (fig. 16b).

La plupart des mitochondries sont déformées en cupules qui ceinturent un îlot de cytoplasme (fig. 16b). Le sommet de cette cupule est constitué

de la juxtaposition des deux doubles membranes mitochondriales, ce qui provoque le rejet de la matrice aux extrémités de l'organite. Les différentes configurations visibles à la figure 16b correspondent en fait au même morphotype, comme le montre la figure 17, constituée de quelques séquences des coupes sériées. L'interprétation de ces images est donnée à la figure 19. Certaines mitochondries montrent une matrice très éclaircie ou au contraire très dense. Par ailleurs les membranes émettent des vésicules dans lesquelles elles s'invaginent (fig. 17c).

. Fig. 19 et 20 : T₄₀ à T₈₀ AFT

Les déformations nucléaires décrites précédemment s'amplifient ; les extrusions qui se forment évoluent en vacuoles autophagiques (fig. 19a). Les agrégats nucléolaires sont de plus en plus nombreux et importants. Le cortex granulaire forme quelques cupules disposés sous l'enveloppe nucléaire (fig. 19b). Quelques grains de chromatine sont de grande taille (0,5 µm) (fig. 19a). Des globules constitués d'un matériel granulaire légèrement contrasté apparaissent à la périphérie du nucléoplasme (fig. 19a). On ignore leur origine et leur mode de formation.

Les altérations mitochondriales se généralisent à l'ensemble du chondriome. Les mitochondries à matrice sombre dominant. Des mitochondries en cupules étirées apparaissent ; leur longueur est très importante et dépasse quelquefois 5 µm (fig. 19b).

Le réticulum endoplasmique granulaire prolifère en formant des empilements concentriques ceinturant souvent des mitochondries (fig. 19b, 20a). Par endroit, ce réticulum se trouve en continuité avec des zones où s'accumule un matériel granulaire (fig. 20b). A ce niveau, l'ergastoplasme paraît altéré et dans certaines vacuoles, on observe des invaginations contenant des formations membranaires enroulées sur elles-mêmes (fig. 20c). De nombreuses vésicules de taille variable apparaissent dans le cytoplasme ; leur contenu est difficilement identifiable (fig. 20a). A leur proximité on peut observer de nombreux lysosomes (fig. 20a et 13b). Des vacuoles et les zones

d'accumulation de matériel granulaire apparaissent quelquefois en continuité, le réticulum endoplasmique granulaire les ceinturant ; seul la vacuole montre une réaction positive à la mise en évidence de la phosphatase acide (fig. 13c). Ces zones granulaires sont très riches en ribosomes.

La répartition cytoplasmique du glycogène se modifie : alors qu'il se présente sous la forme de grains isolés dans les cellules témoins (fig. 12a), ces particules de glycogène se rassemblent en de larges îlots dans le cytoplasme de cellules intoxiquées (fig. 12b).

. Fig. 21 à 26 : T₈₀ à T₂₀₀

On n'observe plus aucun nucléole typique (fig. 21a). Les agrégats nucléolaires sont moins nombreux mais très volumineux (fig. 21a). Les organisateurs nucléolaires sont en nombre multiple de 2, ce qui indiquerait que les nucléoles fusionnent en couple dans un premier temps puis s'agglutinent ensuite entre eux. Cela correspondrait à la chronologie que nous avons observée jusqu'à présent. De nombreux corps cupuliformes ou annulaires s'observent à proximité des agrégats nucléolaires sous l'enveloppe nucléaire, plus rarement au sein du nucléoplasme. Des colorations réversibles à l'E.D.T.A. montrent la constitution de ces cupules (fig. 21b et c) : il s'agit en fait du cortex granulaire des nucléoles qui se détachent des agrégats nucléolaires qui sont, eux, constitués de la fusion de la partie fibrillaire des nucléoles originels.

Le nucléoplasme présente un aspect comparable à celui des cellules témoins au même moment : la chromatine semble émettre de nombreux filaments rayonnants (fig. 21a). Certains grains chromatiniens paraissent fusionner et former des agrégats de taille importante (0,9 µm) (fig. 21a).

Les vacuoles autophagiques prolifèrent (fig. 22a). Dans nombre d'entre elles, on peut observer des mitochondries (fig. 22c et 24b), ou des formations membranaires en empilement concentrique (fig. 22b, coupe traitée à la pronase). Certaines vacuoles autophagiques vraisemblablement récentes, sont limitées par les membranes du réticulum lisse -par endroit granulaire- enroulées sur elles-

mêmes (fig. 23). Elles renferment des extrusions nucléaires contenant des agrégats nucléolaires. Ces vacuoles ne sont pas isolées et communiquent avec des vésicules présentant la même structure mais dont le contenu, très variable, est difficilement identifiable. Certaines ne renferment que des ribosomes (fig. 23a).

Le chondriome est encore profondément altéré : déformation en cupule et matrice sombre (fig. 20a, 24a). La membrane interne émet quelquefois une invagination lamellaire qui se juxtapose à la double membrane (fig. 14a). On observe encore des mitochondries en cupules aplaties. Néanmoins, des mitochondries caractéristiques de l'espèce, mais à matrice sombre, réapparaissent vers T₁₆₀ (fig. 24a et b).

Les zones d'accumulations de matériel granulaire, toujours associées au réticulum endoplasmique rugueux, occupent de très importantes surfaces cytoplasmiques (fig. 24a, b, c et 26a, b, c). Certaines de ces formations sont directement associées à l'enveloppe nucléaire (fig. 24a). Traitées à la pronase, ces structures révèlent en lieu et place du matériel granulaire (fig. 25a), un réseau complexe et "anarchique" de vésicules, de membranes lisses et granulaires, de ribosomes. Le réticulum granulaire ceinture l'ensemble en s'associant avec des mitochondries (fig. 24a et b, 25a, 26a et b). La coloration réversible à l'E.D.T.A. permet d'y mettre en évidence de nombreux ribosomes (fig. 25b et c) mais aussi des grains peu contrastés mais bien définis, de taille équivalente à celle des ribosomes (fig. 25b et c). Un traitement à la pronase montre que ces zones sont très riches en ribosomes (fig. 26a).

Le glycogène forme toujours de nombreux îlots (fig. 22 à 26). Des gouttelettes lipidiques apparaissent quelquefois ceinturées par du réticulum granulaire (fig. 24, 26b et d).

. Fig. 27 et 28 : T₂₂₀ à T₂₈₀

Alors que les agrégats nucléolaires sont toujours abondants (fig. 27a) des nucléoles typiques de l'espèce réapparaissent, étroitement associés à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire (fig. 28b).

La plupart des mitochondries présentent un aspect normal mais sont de petite taille (fig. 28b) : 1,2 μm en moyenne.

Les vacuoles autophagiques sont toujours très nombreuses (fig. 27a).

Les zones d'accumulation de matériel granulaire occupent toujours de larges surfaces cytoplasmiques. Le réticulum endoplasmique rugueux, toujours très développé, présente des citernes plus lâches que précédemment (fig. 27b). Il communique parfois directement avec des vacuoles qu'il ceinture (fig. 27b, 28a).

Le cytoplasme renferme encore de vastes îlots de glycogène (fig. 28a).

. Fig. 29 : T_{280} à T_{310}

Toutes les altérations décrites auparavant ont régressé totalement (fig. 29a). Les nucléoles et les mitochondries ont une configuration typique de l'espèce, comparable à celle que l'on observe chez les cellules non traitées en fin de phase G_2 (fig. 29c). Les vacuoles autophagiques ont régressé presque totalement. Les globules lipidiques sont encore nombreux alors que les masses de matériel granulaire ont totalement disparu (fig. 29a).

Vers T_{320} , de nombreuses cellules se divisent (fig. 29b).

B_2 - Effet de 1,25 $\mu\text{g/ml}$ à T_{90}

Ajouté au début de la division synchrone, le T.M.T.D. bloque cette dernière immédiatement de façon irréversible. Certaines altérations (mitochondries, réticulum, noyau) sont identiques aux manifestations de l'intoxication décrites précédemment. Mais leur évolution est différente.

. Fig. 30 et 31a : T_{90} à T_{130}

Les premières manifestations de l'intoxication sont "classiques" : déformation prononcée du noyau et altérations nucléolaires. Les agrégats se dispersent dans le nucléoplasme (fig. 30a).

Le chondriome montre les altérations que l'on a déjà décrites : déformation en cupules et matrice très sombre, ou au contraire mitochondries dilatées à matrice très éclaircie (fig. 30a et b, 31a).

Le réticulum endoplasmique se développe massivement et élabore également des réseaux complexes associés aux mitochondries sombres (fig. 30a et b).

. Fig. 31b et 32 : T_{130} à T_{170} AFT

Les nucléoles se raréfient puis disparaissent complètement (fig. 32a, b, c). Le noyau est alors extrêmement déformé, d'où l'existence de zones cytoplasmiques en son sein (fig. 32c).

Toutes les mitochondries évoluent vers le type éclairé avec raréfaction des tubules (fig. 31b, 32a, b, c).

Le cytoplasme disparaît (fig. 32c). A ce stade de nombreuses cellules ont éclaté (fig. 15). La population cellulaire baisse progressivement, ce qui laisse supposer la mort des ciliés.

B_3 - Effet d'une faible dose : 0,25 $\mu\text{g/ml}$

On observe les mêmes altérations que celles provoquées par 1,25 $\mu\text{g/ml}$ aux temps correspondants (T_0 et T_{90} AFT), mais elles sont éphémères et moins généralisées. Le noyau montre quelques agrégations partielles des nucléoles, mais aucune vacuole autophagique contenant des agrégats nucléolaires ne se forme (fig. 33a et 34a).

Les mitochondries des cellules intoxiquées à T_0 montrent une matrice assombrie et sont quelquefois déformées en cupules (fig. 33d). Au contraire, le chondriome des ciliés soumis au T.M.T.D. à T_{90} AFT présente une matrice éclaircie (fig. 34b).

Le réticulum se développe quelquefois en structures complexes (fig. 33b) au contact desquelles des vacuoles montrent des invaginations renfermant des formations membranaires concentriques (fig. 33c).

L'ensemble de ces altérations disparaissent rapidement et ce n'est qu'avec un retard d'une trentaine de minutes que la division s'effectue dans chaque culture.

B₄ - Effet de 1,25 µg/ml de T.M.T.D. sur l'ultrastructure de
T. pyriformis G1 en culture exponentielle

Une culture exponentielle de même densité cellulaire a également été intoxiquée par 1,25 µg/ml de thirame. Seul le conditionnement différait de celui des cultures synchrones : la culture fut réalisée dans des fioles ballons sans agitation ni aération.

. Fig. 35a : *T. pyriformis* G1 non intoxiqué

Sur le plan ultrastructural, les ciliés présentent une morphologie comparable aux ciliés synchronisés : de nombreux nucléoles de petite taille (0,5 µm) disposés en couronne sous l'enveloppe nucléaire et des mitochondries semblables à celles décrites chez les cellules synchronisées.

. Fig. 36 : Effet de 1,25 µg/ml

Après 80 minutes de contact avec le T.M.T.D. on peut observer :

- . Une agrégation prononcée des nucléoles (fig. 35b).

- . Une altération généralisée du chondriome. Certaines cellules présentent un chondriome où dominant des mitochondries en cupules à matrice sombre (fig. 36b) alors que d'autres ciliés possèdent au contraire un chondriome dilaté et éclairci (fig. 36a).

- . Des masses granulaires se développent également en étroite association avec le réticulum (fig. 36b et c).

- . Le glycogène forme des îlots très vastes. Le manque d'agitation et d'aération peut expliquer un tel phénomène (39). Les gouttelettes lipidiques sont également nombreuses.

DISCUSSION

Pour pouvoir interpréter correctement les résultats présentés ici, un certain nombre de questions doivent être discutées :

- Le traitement thermique nécessaire à la synchronisation n'entraîne-t-il pas des modifications ultrastructurales de la cellule ?

- Parmi les effets observés dans les cellules traitées par le thirame, peut-on distinguer des effets caractéristiques et des effets non spécifiques ? Les autres études effectuées sur les mêmes cultures peuvent-elles apporter des renseignements complémentaires ?

- Le traitement thermique interfère-t-il avec l'action du thirame pour donner des effets synergiques ?

Nous nous proposons d'examiner d'abord l'ultrastructure des cellules non traitées, puis celle des ciliés intoxiqués, organite par organite, afin de discuter de ces trois points.

L'ULTRASTRUCTURE DES CELLULES NON INTOXIQUEES. L'INFLUENCE DES TRAITEMENTS DE SYNCHRONISATION

Aucune étude ultrastructurale systématique des cellules en cultures synchronisées selon la méthode de ZEUTHEN "un choc thermique par génération" ne figurait dans la bibliographie. Ce sont essentiellement les cellules synchronisées selon la méthode multichocs (59) qui ont été étudiées (130 - 133 - 136). Dans ce cas, les organismes sont exposés à 7 chocs thermiques à 34°C de 30 mn chacun, séparés par une période de même durée à 28°C. Ce traitement entraîne de nombreuses altérations, dont une agrégation prononcée des nucléoles et un assombrissement de la matrice mitochondriale qui présente par ailleurs des inclusions denses. Néanmoins, NILSSON (136) signale : "la morphologie de macronoyau des cellules synchronisées selon la méthode "un choc thermique par génération" est comparable à celle des ciliés maintenus en culture exponentielle". Cet auteur signale par ailleurs (133) que cette méthode

de synchronisation préserve l'intégrité des structures cellulaires de *T. pyriformis* G1.

GROSLIERE (communication personnelle) observe cependant une dédifférenciation partielle de l'appareil buccal ; mais la stomatogénèse reprend dès que la température du bain-marie revient à 28°C.

L'étude ultrastructurale des ciliés après le traitement thermique, soit à partir de T_0 , ne révèle aucune altération majeure. La taille des nucléoles varie au cours du cycle entre 0,4 μm et 1 μm (0,6 μm de diamètre de T_0 à T_{80} ; 0,4 μm de T_{80} à T_{140} ; 1 μm de T_{140} à T_{170}). La variation de la taille et du nombre des nucléoles, qui double approximativement juste avant la division cellulaire, semble indiquer l'existence d'un cycle nucléolaire lié au cycle cellulaire.

ANDERSEN et ENGBERG (4) ont montré que *T. pyriformis* G1 dans les mêmes conditions de culture, répliquait son ADN nucléolaire juste après la division cellulaire, d'où l'absence de phase G1; KEIDING et ANDERSEN (70) constatent que la synthèse de l'ARN est couplée à la division cellulaire. Ces auteurs ont montré que la synthèse de l'ARN ribosomal était couplée à la répllication de l'ADN ribosomal. Si un inhibiteur de la répllication de l'ADN (méthotrexate) est additionné au cours de la division synchrone, la synthèse de l'ARN (notamment l'ARN ribosomal) n'est affectée qu'à la seconde division synchrone. Par contre, si cet inhibiteur est placé juste avant la division synchrone, la synthèse de l'ARN est affectée après celle-ci.

SLIMANE (172) a étudié l'incorporation d'uridine tritiée dans chaque cellule. On constate alors que l'incorporation du précurseur augmente nettement dans la cellule juste avant la division. En microscopie électronique, nous observons qu'à ce stade (T_{80} AFT), le nombre de nucléoles double. Les nucléoles de la cellule fille s'élaboreraient juste avant la division, dans la cellule

mère, à partir de l'ADN nucléolaire répliqué après la division précédente. En fait, le pic d'incorporation qu'observe SLIMANE (172) juste avant la division cellulaire correspondrait à la phase de "lecture" de l'ADN nucléolaire, précédemment synthétisé, jusque là inhibé, d'où une incorporation active d'uridine. Cela ne signifierait pas nécessairement que la synthèse de l'ARN total augmente. Un phénomène de régulation, limitant l'activité métabolique des nucléoles préexistants, interviendrait alors. ANDERSEN et NIELSEN (4) ont montré que *T. pyriformis* sécréterait un facteur dialysable susceptible de contrôler la production de l'ARN de la population.

Après la division, les cellules filles possèderaient ainsi un ensemble complet de nucléoles "opérationnels" d'où l'augmentation immédiate de la quantité d'ARN ribosomal dans la population cellulaire.

Il paraît indispensable de comprendre la signification des variations cycliques de la taille des nucléoles (effet induit par la synchronisation ?). *T. pyriformis* G1 synchrone constitue par ailleurs un excellent modèle d'investigation pour approfondir l'étude du métabolisme nucléolaire et la nucléogénèse. Une étude comparative détaillée avec le *T. pyriformis* G1 en culture exponentielle serait indispensable.

En ce qui concerne le nucléoplasme et la chromatine, nous avons vu que le noyau présentait trois aspects distincts au cours du cycle synchrone : un aspect granulaire (T₁₀ à T₈₀ AFT) ; un aspect en mosaïque (T₈₅ AFT) ; un aspect fibrillogranulaire (T₉₀ à T₁₇₀ AFT). Ces trois stades ne sont pas spécifiques de *Tetrahymena* synchrone et ont déjà été décrits par NILSSON chez la même souche en culture exponentielle (126, 127, 130). On sait dans ce cas, que le cycle de *T. pyriformis* se décompose en 4 périodes : G₁, S, G₂, D, où S désigne la phase de synthèse des acides nucléiques, D la division, G₁ et G₂ désignent respectivement les périodes succédant à la division et à la phase S. Sur le plan morphologique, NILSSON a montré que les phases G₁ et G₂ se caractérisent par une configuration granulaire du nucléoplasme, la phase S par un aspect fibrillaire - la chromatine, en période de synthèse des acides nucléiques émet des filaments rayonnants dans le nucléoplasme - alors que l'aspect mosaïque dû à l'individualisation de "subnucléi" définit le noyau en division. On

sait que la synchronisation entraîne l'absence de la phase G₁ dans le cycle synchrone de *T. pyriformis*. Il est donc normal d'observer sur le plan morphologique la succession G₂ (aspect granulaire) ; D (aspect mosaïque) ; S (aspect fibrillogranulaire).

La morphologie générale des mitochondries n'est pas modifiée par la synchronisation. On constate cependant la présence de corpuscules denses dans la matrice de certaines mitochondries. Ce phénomène s'observe dans d'autres conditions de culture : phase stationnaire de cultures non synchronisées (23, 42, 44, 130) ou en cas de jeûne (87). NILSSON (130, 133) suppose qu'il s'agit d'accumulations d'ions tels que le calcium. CHARRET (23) a observé chez *T. pyriformis* G₁ et ST en culture exponentielle "des inclusions denses et homogènes de 0,07 µm de diamètre et 0,2 µm de long dans la matrice mitochondriale, plus nombreuses en phase stationnaire ; un traitement à la pronase des cellules fixées en épon fait disparaître ces inclusions et met ainsi en évidence leur nature protéique". Dans notre cas, un tel traitement s'est révélé négatif. Les conditions dans lesquelles on observe ces inclusions indiqueraient une réaction de l'activité métabolique mitochondriale (phase stationnaire, jeûne). Bien que nous ne possédons pas suffisamment d'informations sur ce sujet, les premiers résultats de FOURMAUX -PRIEM (48) sur deux enzymes mitochondriales - la malate déshydrogénase et la succinate déshydrogénase - qui montrent en cultures exponentielles et synchronisées une activité enzymatique identique, n'abonderaient pas dans ce sens.

La définition morphologique des péroxysomes et des lysosomes ne fait pas l'unanimité alors que des techniques cytochimiques de mise en évidence sont relativement bien mises au point en microscopie électronique. Les organites identifiés comme étant des péroxysomes par NILSSON (128, 129, 130, 133), LARNED et ANTIPA (80), WILLIAMS et LUFT (189) et MULLER (121, 122) ont révélé une action très nettement positive à la mise en évidence de la phosphatase acide au cours de notre travail. Or cette "coloration" est spécifique des lysosomes. Ces résultats concordent par contre avec ceux d'ELLIOTT (41) et KOLB-BACHOFEN (73) qui ont appelé ces organites : lysosomes primaires. Nos résultats sont encore trop fragmentaires pour donner une réponse définitive à ce problème. Des analyses plus approfondies, ne reposant pas seulement sur

des "colorations cytochimiques" sont à ce titre indispensables. Cependant, la recherche de la catalase, enzyme caractéristique des péroxysomes et dont la mise en évidence est relativement aisée, constituerait la première étape de cette étude et définirait la nature morphologique des péroxysomes. Des fractionnements cellulaires permettant d'isoler ces organites compléteraient cette investigation.

D'un strict point de vue ultrastructural, la cellule de *T. pyriformis* G1 ne semble pas être altérée après synchronisation selon la méthode de ZEUTHEN "un choc thermique par génération", exceptées les remarques émises plus haut. D'un point de vue biochimique, les premiers résultats obtenus, certes encore incomplets, par différents auteurs (48, 172) semblent abonder dans ce sens.

L'ACTION DU T.M.T.D.

La présence du T.M.T.D. dans le milieu de culture de *T. pyriformis* G1 synchrone entraîne l'apparition d'altérations nucléaires et mitochondriales, Un développement massif du réticulum endoplasmique qui se dégrade par la suite. Un changement sensible de la répartition des grains de glycogène ainsi que l'apparition de gouttelettes lipidiques et de vacuoles autophagiques accompagnent ces modifications morphologiques.

. Le noyau

Dans les cellules témoins, le macronoyau est sphérique. Par contre, les ciliés intoxiqués présentent un noyau très déformé émettant de nombreuses extrusions qui se détachent et évoluent en vacuoles autophagiques. Leur contenu, essentiellement des agrégats nucléolaires, laisse penser qu'il s'agit d'un processus d'élimination des nucléoles devenus inactifs. Ces phénomènes s'observent également lorsque la croissance cellulaire est inhibée, notamment par le jeûne (87).

Les nucléoles paraissent être les structures nucléaires les plus sensibles alors que la chromatine ne montre pas d'altération significative. Lorsque le T.M.T.D. est ajouté à T_0 à la concentration de 1,25 $\mu\text{g/ml}$, la chronologie des événements est la suivante : dans les dix premières minutes qui suivent l'ajout du toxique, on constate la fusion progressive des parties fibrillaires des nucléoles, ce qui entraîne leur raréfaction puis leur disparition. La partie granulaire, après s'être fragmentée, s'organise en structures cupuliformes ceinturant quelquefois un grain dense, ce qui leur confère une configuration semblable à celle de nucléoles de taille réduite. De nombreux nucléoles d'aspect typique réapparaissent ensuite.

Que signifie cette réorganisation nucléolaire ? Serait-elle la conséquence d'une action directe du thirame sur le métabolisme nucléolaire ou plus simplement un effet induit par un "mauvais état général" de la cellule ? Quelle est l'origine des nouveaux nucléoles qui réapparaissent par la suite dans les cellules intoxiquées ?

Les nucléoles ne sont pas des organites "*sensus stricto*". En effet, ils sont la manifestation d'une activité métabolique de synthèse de ribosomes propre au noyau. On sait que les trois constituants structuraux des nucléoles sont la "traduction ultrastructurale" des trois étapes de la synthèse des sous-unités ribosomales. Celle-ci s'effectue de façon centrifuge par rapport à l'organisateur nucléolaire contenant l'ADN codant pour la synthèse ribosomale ; l'ARN ribosomal transcrit s'associe aux protéines ribosomales synthétisées dans le cytoplasme pour donner le pré-ribosome 80 S dans la partie fibrillaire qui est ensuite transformé en deux sous-unités ribosomales 60 S et 40 S dans la partie granulaire (8).

Chez *T. pyriformis* G1 en phase de croissance active, la configuration et la disposition des nucléoles sont à mettre en relation avec le taux très élevé de synthèse des ribosomes qui caractérise cette espèce. En effet, ce cilié synthétise un ribosome 10 fois plus vite que les cellules Hela et peut en doubler sa quantité et deux heures et demi (LEICK, 1969, in NILSSON et LEICK, 1970 - 135). Ce métabolisme élevé rend compte du grand nombre de nucléoles de petite taille et leur association avec l'enveloppe nucléaire (135). Au contraire,

BUS
LILLE

lorsque la synthèse de l'ARNr est inhibée, on observe une désolidarisation du cortex granulaire qui constitue alors de nombreux fragments en forme de cupules ou d'anneaux et un regroupement des organisateurs nucléolaires qui s'accompagne d'une fusion des parties fibrillaires. Ceci intervient notamment pendant des périodes de jeûne prolongées (87, 130, 135) ou sous l'action de drogues comme la cytochalasine B (131) employée comme inhibiteur de la formation des vacuoles digestives et surtout l'actinomycine D, antibiotique inhibant l'ARN polymérase et secondairement l'ADN polymérase (161).

SLIMANE (172) a montré que le T.M.T.D. provoquait une chute très importante, mais réversible, de l'incorporation de l'uridine marquée, même aux plus basses concentrations testées (0,125 µg/ml). Les images obtenues en microscopie électronique montrent une chronologie semblable à celle décrite précédemment : désolidarisation du cortex granulaire, agrégation progressive des parties fibrillaires, apparition de structures cupuliformes, puis de nouveaux nucléoles. Cela permet de supposer une forte réduction de la synthèse d'ARN ribosomal dans les cellules intoxiquées. La chute de l'incorporation du précurseur marqué correspond à la phase de désorganisation des nucléoles. L'incorporation de l'uridine reprend par la suite. Dans la mesure où SLIMANE a suivi l'incorporation par pulse, c'est en fait à la fois les synthèses de l'ARNr et de l'ARNm qui ont été étudiées. La réapparition de nouveaux nucléoles dans les cellules intoxiquées nous permet d'interpréter la reprise de l'incorporation comme étant celle de la synthèse de l'ARNr (on ne peut pas se prononcer en ce qui concerne les ARNm). Or, d'après CARATERRO (communication personnelle), les agrégats nucléolaires ne sont plus le site de la synthèse de l'ARNr. Il est donc peu probable que les nouveaux nucléoles proviennent de ces agrégats qui sont, par ailleurs, éliminés par autophagie. Faut-il donc voir dans les structures cupuliformes, disposées sous l'enveloppe nucléaire et d'un aspect rappelant celui de nucléoles de taille réduite, des nucléoles en formation (nucléogénèse) d'où la reprise d'incorporation de l'uridine ? Mais dans ce cas, quelle est l'origine de l'ADN nucléolaire nécessaire à la nucléogénèse ? Nous avons vu que les agrégats nucléolaires sont éliminés par autophagie ; est-ce que les organisateurs nucléolaires - donc l'ADN nucléolaire - sont préservés ? (l'altération des agrégats nucléolaires au sein des vacuoles autophagiques ne permet pas de répondre directement à cette question). Y-a-t-il

au contraire utilisation de l'ADN nucléolaire répliqué juste après la division précédente (avant intoxication) et dont la lecture a été jusque là réprimée. Dans ce cas, est-ce que la cellule régule son stock d'ADN nucléolaire par répllication immédiate ou est-ce que cette carence se transmettra aux cellules filles ? Il est intéressant à ce stade de comparer ces résultats avec ceux obtenus en additionnant le T.M.T.D. à T_{90} AFT. A cette période, les cellules qui viennent de se diviser sont en train de répliquer l'ADN et plus précisément l'ADN nucléolaire dans un premier temps. Elles ne possèdent donc que la moitié du stock d'ADN nucléolaire des cellules mères (celles qui sont intoxiquées lorsque le T.M.T.D. est ajouté à T_0). Par la suite, contrairement à ce que nous avons vu précédemment, les cellules filles ne "récupèrent pas" et meurent. Or les nucléoles altérés sont éliminés mais ne sont pas remplacés. Il est vraisemblable que cette différence de comportement entre cellules mères et cellules filles est à mettre en relation avec l'existence d'un deuxième "stock" d'ADN nucléolaire dans la cellule mère, absent chez les cellules filles. Les premières compenseraient la perte des nucléoles par nucléogénèse permettant l'élaboration d'une deuxième génération de nucléoles une fois le T.M.T.D. dégradé. Cette faculté de récupération fait justement défaut aux cellules filles.

La présence du T.M.T.D. dans le milieu de culture entraînerait immédiatement d'une part l'inhibition de la synthèse de l'ARNr et d'autre part la répllication de l'ADN. L'incorporation de l'uridine et de la thymidine marquées chute quel que soit le moment d'ajout du toxique. On ne sait pas encore si cette inhibition est une action directe du T.M.T.D. sur l'ARN polymérase et l'ADN polymérase, ou une conséquence induite par un "stress" cellulaire. Les travaux de SLIMANE et les nôtres révèlent la rapidité de l'action du thirame, mais cela ne permet pas d'affirmer que ces enzymes sont les cibles cellulaires du thirame. En effet, l'activité des nucléoles et leur morphologie sont extrêmement sensibles à des modifications de conditions de culture : NILSSON (130 - 135) a observé que les premières altérations nucléolaires apparaissaient 5 minutes après le transfert des cellules dans un milieu inorganique alors que 30 minutes après, les premiers agrégats nucléolaires se forment.

En fait pour répondre à cette question, il est nécessaire de faire le dosage de l'activité de l'ARN polymérase et de l'ADN polymérase en présence de thirame. Il serait également intéressant de comparer l'action de ce toxique avec celle de l'actinomycine D additionnée à T₉₀ AFT. Par ailleurs, un marquage de l'ADN nucléolaire avant l'intoxication visualiserait son évolution intracellulaire (formation de nouveaux nucléoles ou au contraire élimination par autophagie). Un dosage de l'ADN par cytophotométrie permettrait d'apprécier sa quantité et sa répllication dans les cellules après intoxication.

. Le chondriome

Nous avons observé trois types morphologiques de mitochondries dans les cellules intoxiquées par le T.M.T.D quelles que soient les concentrations choisies :

- (1) mitochondries, souvent dilatées, à matrice éclaircie et aux tubules apparemment fragmentés ;
- (2) mitochondries en "cupules" ou en "cloches" en coupe transversale ou en "mosaïque" en coupe oblique ;
- (3) mitochondries allongées, présentant sur une longueur assez importante une construction rejetant la matrice aux extrémités de l'organite.

On observe quelquefois des mitochondries de type (1) à matrice très sombre et des morphotypes (2) à matrice éclaircie.

En début d'intoxication, les mitochondries se présentent uniquement sous la configuration (1) et (2) ; lorsque le T.M.T.D. est additionné à T₀, le type (2) domine alors que le morphotype (1) régresse puis disparaît à partir de T₁₀₀-T₁₂₀ AFT, le type (3) apparaissant vers T₈₀ AFT. Au contraire, lorsque le T.M.T.D. est ajouté à T₉₀ AFT les types (1) et (2) puis (3) sont également présents mais très rapidement (T₁₃₀ AFT), on n'observe plus que des mitochondries de type (1) qui se dilatent et voient leur matrice et leurs tubules disparaître (T₁₇₀ AFT). A ce stade, le noyau et le cytoplasme présentent également des symptômes prononcés de lyse ; les cellules meurent ensuite.

Ces différentes déformations mitochondriales ne sont pas spécifiques à l'action du T.M.T.D., ce qui ne signifie pas néanmoins qu'elles ne correspondent pas à une action donnée de ce toxique. Le type (2) s'observe notamment lors de jeûne prolongé (41 - 87). L'assombrissement de la matrice est souvent corrélé avec une diminution de l'activité respiratoire (130 - 135). Le type (3) a été décrit comme étant une division mitochondriale chez *T. pyriformis* WH6 et E par ELLIOTT et BACK (42) et ressemble aux descriptions de PERASSO et BEISSON (145-146) pour le même phénomène chez *Paramecium aurelia*. Le type (1) est présent chez *T. pyriformis* ST au contact du chloramphénicol (143).

Est-ce que ces trois altérations correspondent à une chute de métabolisme mitochondrial et notamment respiratoire ? Constituent-elles des étapes distinctes d'une même évolution ? Sont-elles à mettre en relation avec d'autres événements contemporains telle que l'agrégation nucléolaire ?

Lorsque le thirame est additionné à T_0 à la concentration de 1,25 µg/ml, on n'observe pas de régression de la population mitochondriale alors que de très nombreuses vacuoles autophagiques se développent aux dépens du chondriome. Cela laisse supposer que de nouvelles mitochondries sont élaborées. Les morphotypes (3) ressemblent aux mitochondries de type (2), en cupules qui seraient étalées, qui apparaissent précédemment. Il s'agit vraisemblablement de mitochondries qui connaissent la même évolution. Le morphotype (3) pourrait représenter des mitochondries en cours de division comme chez *T. pyriformis* WH6 et E et *Paramecium aurelia*. Mais d'après KOLB-BACHOFEN et VOGELL (74), chez *T. pyriformis* G1 synchronisé selon la méthode de ZEUTHEN que nous avons utilisée, le chondriome se diviserait de façon synchrone à la suite de l'apparition d'une double membrane transversale dans la partie médiane de l'organite mère. Bien que n'observant ce type de mitochondries qu'en très petit nombre et ne montrant pas les stades intermédiaires, ces auteurs excluent tout autre mode de division mitochondriale chez cette espèce. Les observations d'ELLIOTT et BACK (42) sont intéressantes. Ces auteurs réalisent des cultures de *T. pyriformis* WH6 et E en présence de glucose et sous oxygénation limitée ; après 48 à 72 heures d'incubation, pendant la phase stationnaire tardive, ils observent alors des mitochondries de type (2) et (3) et attribuent ce dernier morphotype à des divisions mitochondriales.

Il s'agit peut-être des divisions mitochondriales dans des cellules en mauvaises conditions physiologiques. Dans le cas d'intoxication par le T.M.T.D. ce processus permettrait le maintien d'une population mitochondriale malgré son élimination intensive par autophagie ; mais l'absence de configuration intermédiaire entre "mitochondries filles" et morphotype (3) ne plaide pas en la faveur de cette hypothèse.

Quelle est l'activité métabolique du chondriome des ciliés intoxiqués ? D'après NILSSON (130 - 135) l'assombrissement de la matrice correspond à une baisse de l'activité respiratoire des mitochondries. Nous ne possédons pas encore suffisamment d'indications relatives aux activités enzymatiques de ces organites en présence de thirame. FOURMAUX -PRIEM (48) a étudié l'action du thirame sur l'activité de la succinate déshydrogénase (S.D.H.) et de la malate déshydrogénase (M.D.H.) respectivement associées à la membrane interne et à la matrice. L'activité totale de ces deux enzymes croît linéairement au cours du cycle synchrone en absence de T.M.T.D. Le toxique est ajouté au milieu à T_0 , à la concentration de 1,25 $\mu\text{g/ml}$, l'évolution des activités enzymatiques totales de la M.D.H. et de la S.D.H. est bloquée. Additionnée à T_{90} AFT, la même concentration de T.M.T.D. induit également une stabilisation de l'activité de la M.D.H. mais entraîne une baisse de celle de la S.D.H. ; à T_{140} AFT, l'activité totale de cet enzyme est comparable à celle observée à T_{10} AFT. Il semble qu'il y ait blocage de la synthèse de ces enzymes mais non une inhibition spécifique. A ce titre, il faut souligner que le taux de protéines, croissant linéairement chez les témoins, est constant lorsque le toxique est additionné à T_0 , mais chute après son addition à T_{90} AFT.

Nous avons vu que sur le plan morphologique, ce sont les mitochondries en "cloches" qui dominent nettement lorsque le T.M.T.D. est introduit dans le milieu de culture à T_0 . Au contraire, le chondriome évolue vers le type (1) quand le T.M.T.D. est présent à partir de T_{90} AFT. Cela semblerait indiquer que l'assombrissement de la matrice et la déformation de la mitochondrie ne correspondent pas à un arrêt du métabolisme de ces organites. Par contre, le morphotype (1) montrerait une perturbation métabolique plus intense. L'activité de la S.D.H. baisse ; cet enzyme est associé à la membrane interne, donc aux tubules qui régressent dans les mitochondries du type (1).

Quelle est la signification de la déformation caractérisant le morphotype (2) ? Cette altération morphologique semble signifier un défaut de croissance de la mitochondrie. KOLB-BACHOFEN (74) a en effet très bien étudié la croissance et la division des mitochondries chez *T. pyriformis* GL synchronisé selon la méthode de ZEUTHEN. Il apparaît que le rapport surface mitochondriale/surface cellulaire demeure constant durant l'ensemble du cycle cellulaire. La chondriogenèse s'effectuerait en trois étapes distinctes : pendant la phase G_2 et la division cellulaire, seraient synthétisées les membranes enveloppantes et la matrice (croissance de la mitochondrie) ; pendant la phase S seraient élaborés les tubules, la fin de la phase S serait marquée par la division synchrone du chondriome.

Or, l'apex des mitochondries de type (2) et (3), qui sont de grande taille, est constitué de la juxtaposition des membranes enveloppantes interne et externe ; les tubules et la matrice y sont absents et sont rejetés aux extrémités de l'organite. Les mitochondries en "cloches" présentent également des vésicules extrudées renfermant des formations membranaires concentriques. Ces morphotypes mitochondriaux s'observent en grand nombre lorsque le thirame est additionné à T_0 , c'est-à-dire en phase G_2 durant la synthèse des membranes interne et externe et de la matrice. Ces configurations indiquent que la synthèse des membranes n'est pas inhibée alors que celle de la matrice le serait ; d'où ces déformations en "cloches". La réversibilité de ces altérations serait rendue possible par la dégradation spontanée (action de la lumière) ou/et biologique (métabolisation par *Tetrahymena*) du toxique.

Au contraire, lorsque le T.M.T.D. est additionné vers T_{90} AFT, on observe davantage de mitochondries de type (1) dans un premier temps, puis tous les morphotypes évoluant vers ce stade - type (2) à matrice éclaircie et à tubules fragmentés - avant la mort de la cellule. Ce morphotype mitochondrial s'observe également lorsque le toxique est ajouté à T_0 , mais en plus petit nombre et de façon éphémère. A T_{90} AFT, d'après KOLB-BACHOFEN (74), le chondriome se trouve en fin de phase de synthèse des membranes enveloppantes et de la matrice alors que celle des tubules va prochainement débiter. La raréfaction des tubules lorsque l'ajout du toxique s'effectue à T_{90} AFT, phénomène qui se généralise à l'ensemble de chondriome ou celui de type (2),

semble indiquer que le thirame provoque, certes peut-être indirectement, l'inhibition de la synthèse des tubules. L'éclaircissement de la matrice est peut-être engendré par la dilatation des mitochondries et la raréfaction des tubules. L'irréversibilité de ces phénomènes est vraisemblablement due au fait que la cellule meurt. En effet, nous avons vu que le cytoplasme se lysait ainsi que le noyau qui se caractérise par l'absence de nucléoles. Le morphotype (1) a été notamment observé par PERASSO (143) chez *T. pyriformis* St au contact du chloramphénicol. Cet antibiotique se fixe sur les mitoribosomes, induisant ainsi l'inhibition de la synthèse protéique mitochondriale. Or, FOURMAUX-PRIEM (48) a montré que le taux de protéines chutait rapidement lorsque le toxique est additionné à T_{90} . En microscopie électronique, les images que nous avons obtenues montrent une lyse du cytoplasme et une disparition des nucléoles. Or, ces derniers sont le siège de la synthèse de l'ARN ribosomal, donc des ribosomes nécessaires à la synthèse protéique. Bien que le chondriome jouisse d'une relative autonomie (65, 143), il dépend néanmoins pour la plupart de ses constituants, dont de nombreuses protéines, des synthèses cytoplasmiques qui sont placées sous le contrôle nucléaire (143).

La dégénérescence irréversible du chondriome semble être la conséquence de l'état général de la cellule. Néanmoins, il n'est pas surprenant d'observer deux populations mitochondriales au sein d'une même cellule (type (1) et (2)). En effet, une partie de la population mitochondriale n'est pas synchronisée (74). Les morphologies (1) et (2) correspondraient à la réponse des mitochondries se trouvant à deux phases distinctes de leur cycle.

Le réticulum endoplasmique

Nous avons vu que le réticulum endoplasmique rugueux (R.E.R.) se développait massivement en structure organisée (citernes en empilement ou en enroulement concentrique). Le réticulum lisse (R.E.L.) abonde à ce niveau sous forme de vésicules. Le R.E.R. est souvent associé aux mitochondries allongées à matrice sombre. Au niveau de ces structures s'accumule un matériel granulaire de nature protéique contenant de nombreux ribosomes. Dans ces zones, les membranes de l'ergastoplasme sont souvent fragmentées et à proximité, des vacuoles

renferment des structures de type myélinique. On sait que le réticulum présente une grande plasticité morphologique, selon les types cellulaires mais aussi selon l'état physiologique des cellules. Dans certains cas, l'abondance de réticulum est liée à une fonction précise de la cellule ; par exemple, les cellules du pancréas exocrine où le réticulum est responsable de la synthèse des enzymes. Dans d'autres cas, on peut constater un développement anormal du R.E.R., sans pouvoir lui donner un rôle précis (DE PUYTORAC et CARATERRO, communications personnelles) comme par exemple chez *T. pyriformis*, à la suite de l'exposition aux ultraviolets. On sait que le réticulum granulaire intervient à de nombreux niveaux du métabolisme cellulaire :

- synthèse des membranes et de nombreux enzymes, notamment ceux indispensables au métabolisme digestif telle que la phosphatase acide (8, 41) ;
- la formation des vacuoles autophagiques (41, 130) ;
- les phénomènes de détoxification (8).

La détoxification s'effectue dans les membranes du réticulum endoplasmique grâce au cytochrome P₄₅₀ et à la NADPH cytochrome P₄₅₀ réductase, essentiellement par des réactions d'hydroxylation et de conjugaison ; les membranes sont ensuite dégradées par autophagie. Morphologiquement, la détoxification se traduit souvent par un accroissement de la surface du réticulum endoplasmique lisse et granulaire (8). La chronologie des phénomènes que nous observons chez *T. pyriformis* intoxiqué par le T.M.T.D. nous laisse supposer que le développement massif du réticulum correspond à un phénomène de détoxification cellulaire. On constate d'abord une prolifération du réticulum endoplasmique dont l'association fréquente avec les mitochondries s'explique vraisemblablement par l'apport énergétique qu'assurent ces organites (nous avons vu plus haut qu'ils étaient encore métaboliquement actifs). Les zones d'accumulation de ribosomes au contact du R.E.R. correspondraient à des secteurs de biogénèses membranaires actives. Au niveau des membranes du réticulum rugueux et lisse, s'effectuerait la dégradation du thirame ; puis ces structures sont dégradées, d'où une accumulation de matériel granulaire contenant des protéines (sensibilité à la pronase), des ribonucléoprotéines très dégradées

(réaction légère à l'E.D.T.A.). Ce matériel est finalement éliminé par autophagie comme le laisse supposer la présence de nombreuses vésicules et vacuoles renfermant des structures membranaires de type "myélinique". Ce n'est qu'après l'élimination totale de ce matériel que la cellule se divise (T₃₂₀ AFT).

Les gouttelettes lipidiques et le glycogène

Dans les cellules témoins, le glycogène forme des îlots de taille réduite ou se présente sous l'aspect de grains isolés ; les gouttelettes lipidiques sont quant à elles absentes.

Dans les ciliés intoxiqués, de larges îlots de particules de glycogène et des gouttelettes lipidiques apparaissent. Ces caractères traduisent une perturbation profonde du métabolisme cellulaire et caractérisent les cellules dont la croissance est inhibée (87, 88, 130, 133).

L'apparition de larges îlots de glycogène dans le cytoplasme de *T. pyriformis* est souvent mise en relation avec la néoglucogénèse (29, 41, 61, 85, 88, 89, 103, 130, 133, 169). Le cycle de KREBS est court-circuité au niveau de l'isocitrate vers le malate par l'intermédiaire du cycle glyoxylique ce qui active la synthèse du glucose stocké sous forme de glycogène. Cette voie métabolique intervient notamment lorsque le milieu de culture est carencé en oxygène.

L'apparition de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme est observée au début de la phase stationnaire de croissance (3, 14, 85, 86, 179). Elle correspond à une forme de stockage de réserves énergétiques (13). Ces triglycérides servent également à la synthèse des membranes, notamment celles des vacuoles autophagiques très nombreuses en fin de phase stationnaire (42, 44, 130, 134). Chronologiquement, dans les cultures de *T. pyriformis* GL traitées par le thirame, l'apparition de gouttelettes lipidiques précède celle des vacuoles autophagiques (vers T₁₂₀ AFT). Elles ne représenteraient donc qu'un épisode normal du processus de détoxification qui va intervenir dans la cellule.

INFLUENCE DE LA SYNCHRONISATION SUR LES EFFETS OBSERVES

Dans quelle mesure la synchronisation n'entraîne-t-elle pas des modifications morphologiques et métaboliques susceptibles d'interférer avec les effets du thirame ?

Nous avons vu au chapitre I, paragraphe "les implications physiologiques de la synchronisation", que la méthode de synchronisation était réputée pour sa "douceur" (130, 133, 136). Il s'avère que les altérations métaboliques et morphologiques sont limitées aux périodes de chocs thermiques alors que la durée de "récupération" est extrêmement courte.

Sur le plan de l'ultrastructure intracellulaire, nous avons montré qu'il n'existait pas de modification morphologique significative entre les cellules synchronisées et celles maintenues en culture exponentielle telles que les ont décrites de nombreux auteurs tels qu'ELLIOTT et NILSSON. Nous avons néanmoins entrepris une étude sommaire de l'ultrastructure de *T. pyriformis* GL en culture exponentielle en absence et en présence de thirame. Elle confirme l'absence de différence morphologique entre les cellules témoins. Quant aux cellules intoxiquées à l'aide de 1,25 µg/ml à T_0 , on n'observe également aucune différence significative dans les "réponses" des ciliés. Les cultures exponentielles contiennent seulement 10 % des cellules au même stade. Néanmoins on retrouve des ciliés présentant les altérations morphologiques (agrégations nucléolaires, mitochondries à matrice sombre et déformées en cupules) caractérisant les ciliés intoxiqués en début du cycle synchrone, ainsi que des ciliés montrant au contraire un chondriome sous la configuration dilatée éclaircie, comparables aux cellules intoxiquées à T_{90} AFT.

Bien que cette étude n'ait pas été menée de façon systématique (évolution séquentielle de l'intoxication), on peut estimer que la synchronisation cellulaire n'implique pas d'effets synergiques susceptibles de fausser les résultats.

Soulignons enfin, que le thirame est additionné au milieu de culture qu'une fois la température stabilisée à 28°C. Aucune synergie thermique ne peut être incriminée.

CONCLUSION

Lorsque nous entreprîmes ce travail, l'ultrastructure de *T. pyriformis* G1 synchronisée selon la méthode de ZEUTHEN "un choc thermique par génération" n'avait guère été étudiée de façon satisfaisante alors que l'action du thirame sur l'ultrastructure cellulaire était encore inconnue.

Mise au point méthodologique

Bien qu'ayant nécessité un investissement temps relativement important, la mise au point de cette nouvelle méthode de rassemblement des cellules en suspension fût un préalable nécessaire à notre travail. Elle a permis un gain de temps important dans la manipulation des cellules au cours du traitement pour la microscopie électronique. Les cellules, étant réunies dès le départ en un culot, ne subissent plus de contrainte susceptible de les altérer. La compacité du culot obtenu facilite l'observation au microscope électronique : sur une coupe fine, près d'une centaine de ciliés peuvent être observés, ce qui est appréciable pour mener une étude comparée cellule par cellule de l'ultrastructure.

Ultrastructure de *T. pyriformis* G1 synchrone

Nous avons pu montrer que, sur le plan ultrastructural, la synchronisation des cellules par la méthode utilisée n'entraîne aucune altération majeure irréversible : après T_0 les cellules sont morphologiquement comparables aux ciliés maintenus en culture exponentielle (voir revue de ELLIOTT (41) et NILSSON (130)).

Nos résultats indiqueraient l'existence d'un cycle nucléolaire. On sait que la réplication de l'ADN nucléolaire est couplée à la division synchrone (3). SLIMANE (172) a montré l'existence d'un pic d'incorporation de l'uridine tritiée juste avant la division. Les images obtenues en microscopie électronique semblent indiquer que ce pic d'incorporation correspond, au moins en partie, à la "lecture" de l'ADN nucléolaire répliqué immédiatement après la division mais qui serait jusque là réprimé : la nucléogénèse s'effectuerait juste avant la division.

La définition morphologique des péroxysomes et des lysosomes primaires serait à reprendre : nos résultats comme ceux d'ELLIOTT (41) et de

KOLB-BACHOFEN (73) contredisent ceux de NILSSON (128, 129, 130, 133), de MULLER (121, 122), de WILLIAMS et LUFT (189) et de LARNED et ANTIPA (82). Cet aspect est important car le rôle de ces organites dans le métabolisme cellulaire est très différent.

Toxicologie du thirame

La présence de T.M.T.D. dans le milieu de culture de *T. pyriformis* G1 entraîne l'altération immédiate des nucléoles et des mitochondries mais provoque le développement du réticulum endoplasmique.

La sensibilité des cellules n'est pas la même selon le moment d'ajout du toxique : alors que les ciliés "récupèrent", si le T.M.T.D. est introduit à T_0 , elles meurent à la suite de son ajout à T_{90} . La microscopie électronique, en apportant d'importantes précisions relatives au cycle nucléolaire, permet d'avancer une hypothèse quant à l'action de ce toxique.

Le thirame agirait, pas nécessairement de façon directe, au niveau du métabolisme nucléolaire. La différence de sensibilité des cellules selon le moment d'ajout du toxique serait liée au stade du cycle nucléolaire pendant lequel intervient le T.M.T.D. Si ce dernier est introduit à T_0 , soit 80 minutes avant la nucléogénèse, seul l'ADN nucléolaire associé à un nucléole est éliminé par autophagie avec ce dernier. Mais l'ADN nucléolaire réprimé ne serait pas altéré, ce qui permet au noyau de reconstituer de nouveaux nucléoles assurant ainsi la survie de la cellule. Par contre, ajouté à T_{90} , soit 10 minutes après la nucléogénèse, le T.M.T.D. agit, alors que l'ensemble de l'ADN nucléolaire est associé à des nucléoles. L'ensemble de l'ADN nucléolaire est ainsi altéré. Le noyau, contrairement au cas précédent, ne dispose plus d'ADN nucléolaire et ne peut plus reconstituer de nucléole. La survie de la cellule ne peut plus être assurée. Peut-on ainsi distinguer deux stades de l'ADN nucléolaire ? Une phase sensible au T.M.T.D. lorsque l'ADN est associé à un nucléole, qu'il engendre par transcription, et une phase insensible pendant laquelle la lecture serait réprimée. Il n'est guère possible, dans l'état actuel de nos connaissances, de préciser si le T.M.T.D. agit directement sur l'ADN. Nous indiquerons plus loin quelles sont les études expérimentales à même de répondre à ces questions.

La réponse des mitochondries dépendrait du stade de croissance où elles se trouvent au moment de l'intoxication. L'irréversibilité des altérations que l'on observe lorsque le toxique est ajouté à T_{90} , est vraisemblablement à mettre en relation avec l'état général de la cellule.

Le fait que les ciliés récupèrent et se divisent lorsque le toxique est ajouté à T_0 , semble indiquer que le T.M.T.D. est dégradé ou inactivé. Le rôle du réticulum dans la détoxification est bien connu (8) ; d'après les images fournies par la microscopie électronique, cet organite jouerait un rôle semblable chez *T. pyriformis* Gl.

Perspective de la recherche

La microscopie électronique permet d'obtenir une vision globale des évènements et d'établir leur chronologie. Son apport est indéniable et complète les résultats que l'on peut obtenir par d'autres méthodes d'étude. Mais il n'est pas aisé de corréler les observations observées et l'action toxique du produit testé. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action du thirame, des études complémentaires sont nécessaires.

L'étude de la nucléogénèse chez *Tetrahymena* en absence de toxique constitue un préalable. Peut-on corréler le pic d'incorporation d'uridine tritiée juste avant la division et l'augmentation du nombre de nucléoles qui se disposent en une double couronne au même stade ? Est-ce que l'hypothèse d'une nucléogénèse à cette phase du cycle cellulaire, que nous avons émise dans notre étude et sur laquelle reposent nos interprétations, est juste. L'étude par autoradiographie de l'incorporation d'uridine tritiée au cours du cycle cellulaire permettra de répondre à cette question.

L'étude détaillée du métabolisme nucléolaire des cellules intoxiquées paraît être l'étape suivante logique. Elle s'articulerait autour des axes suivants :

- analyse des différents ARN synthétisés ;
- dosage de l'activité de l'ARN et de l'ADN polymérase ;
- étude de la transcription des nucléoles isolés selon la méthode de HIGASHINAKAGAWA et coll. (60) sur la même souche.

Par ailleurs, l'étude de la réplication de l'ADN mitochondrial permettra de vérifier l'éventuelle division du chondriome dans les cellules intoxiquées à T_0 .

Bien qu'aucune anomalie n'apparaisse au microscope électronique à transmission en ce qui concerne les membranes plasmiques, nucléaires, mitochondriales, une étude biochimique de leur constitution permettra de vérifier leur intégrité.

Dans l'étude que nous avons faite, une grande inconnue demeure : quel est le comportement du thirame dans le milieu, son mode de passage dans la cellule (libre, associé, dégradé...), son évolution chimique (rôle du réticulum, produit de dégradation...).

Il ne fait aucun doute que l'utilisation du cilié *Tetrahymena pyriformis* G1 en culture synchrone donne les meilleures chances pour une obtention rapide des réponses souhaitées.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALLEN R.D., SUYAMA Y. Protein synthesis *in vitro* with *Tetrahymena* mitochondrial ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 259, 369-377
2. ALLISON B.M., RONKIN R.R. Lipid cytochemistry and morphologic changes in aging populations of *Tetrahymena*. *J. Protozool.*, 1967, 14, 313-319
3. ANDERSEN H.A., ENGBERG J. Timing of the ribosomal RNA gene replication in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell. Res.*, 1975, 92, 159-163
4. ANDERSEN H.A., NIELSEN S.J. Regulation of RNA synthesis in *T. pyriformis* secretion of regulatory factors. *J. Cell. Sci. H.* 11449 CEL, 1978
5. ANDERSEN H.A., RASMUSSEN L., ZEUTHEN E. Cell division and DNA replication in synchronous *Tetrahymena* cultures. *Cur. Top. in Microbiol. and Immunol.*, 1975, 72. Springer Nerlag Berlin Heidelberg, New-York, 2cp
6. APOL A.G., THOBURN T.W. Health hazard evaluation determination composite report on thiram 75-thiram 352. *Nat. Techn. Inform. Serv. P.B.*, 1977, 273, 729, 66 pp.
7. BALOGH E., SZOCS I., FULOP I. Biochemical modifications induced by tetramethylthiam disulfide in rats. *Rev. Med. (Targn Mures)*, 1965, 11 (3-4), 369-372
8. BERKALOFF A., BOURGUET J., FAVARD P., LACROIX J.C. *Biologie et physiologie cellulaire. I. Membrane plasmique etc.* Herman Editeur, Paris, 1981, 261 pp.
9. BERNARD. A new staining procedure for electron microscopy cytology. *J. Ultras. Res.*, 1969, 27, 250-265
10. BICK H. *Ciliated protozoa. An illustrated guide to the species used as a biological indicators in freshwater biology.* Wld. Hlth. Org. Geneva, 1972, 198 pp.

11. BLEKHERMAN N.A., IL'INA. Indexes of hormonal function of ovaries and adrenal cortex in women working with chloroorganic pesticides. *Fiziol. Zh. (Kiev)*, 1972, 18 (2), 268-270
12. BLUZAT R., JONOT O., SEUGE J. Toxicité aiguë à un fongicide, le thirame (dithiocarbamate) chez le mollusque pulmoné d'eau douce *Lymnaea stagnalis*. Colloque Intern. D'Ecotoxicologie, LILLE 16-19/11/1981.
13. BOROWITZ M.J., BLUM J.J., Triacyl-glycerol turnover in *Tetrahymena pyriformis*. Relation to phospholipid synthesis. *Biochem. Biophys. Acta*, 1976, 424, 114-124
14. BORST P. Mitochondrial nucleic acids of protozoa. In *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, 2ed. M. Levandowsky and S.H. Hutner eds. Acad. Press New York, 1980, vol. III, pp. 341-364
15. BRUNCK C.F., HANAWALT P.C. Mitochondrial DNA in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell. Res.*, 1969, 54, 143-149
16. BYFIELD J.E., LEE Y.C. The effect of synchronizing temperature shifts on the synthesis and translation of replication supporting messengers in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell. Res.*, 1970 a, 61, 42-50
17. BYFIELD J.E., LEE Y.C. Do synchronizing temperature shifts inhibit RNA synthesis in *Tetrahymena pyriformis* ? *J. Protozool.*, 1970 b, 17, 445-453
18. BYFIELD J.E., SCHERBAUM O.H. Temperature effect on protein synthesis in a heat-synchronized protozoan treated with Actinomycin D. *Science N.Y.*, 1967, 156, 1504-1505
19. CAMERON I.L., GUILLE E.E. Nucleolar and biochemical changes during unbalanced growth of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell. Biol.*, 1965, 26, 844-855
20. CAMERON I.L., PADILLA G.M., MILLER O.L. Macronuclear cytology of synchronized *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.*, 1966, 13, 336-341

21. CHARRET R. L'ADN nucléolaire chez *Tetrahymena pyriformis* : chronologie de la replication. Exp. Cell. Res. 1969, 54, 353-361
22. CHARRET R. L'ADN mitochondrial chez *Tetrahymena pyriformis* : forme et taille des molécules. Abstracts, VII, Congr. Intern. Microsc. Electron. Grenoble, 1970, III, 161-162
23. CHARRET R. L'ADN mitochondrial chez *T. pyriformis* : contribution à l'étude de sa synthèse et de son rôle dans la biogénèse des mitochondries. Thèse d'état, Univers. Paris Sud, 90 p.
24. CHARRET R., CHARLIER M. Visualisation de la transcription et de la traduction dans les mitochondries de *Tetrahymena pyriformis*. J. Microscop., 1973, 17, 19-26
25. CHARRET R., FAURE-FREMIET E. Technique de rassemblement de microorganismes : préinclusion dans un caillot de fibrine. J. Microscopie, 1967, 7, 1063-1066
26. CHATTON E., LWOFF A. Techniques pour l'étude de protozoaires. Bull. Soc. Fr. Micr., 1963, 5, 25-29
27. CHRISTENSSON E.G. Studies of messenger RNA during the cell cycle in synchronized mass cultures of *Tetrahymena pyriformis* GL by hybridization. J. Protozool., 1970, 17, 496-501
28. CLEFFMANN G. Regulierung der DNA-Menge im Macronucleus von *Tetrahymena*. Exp. Cell. Res. 1968, 50, 193-207
29. COOK D.E., RANGAKAJ N.I., BEST N., WILKEN D.R. Conversion of glucose to glycogen in *Tetrahymena pyriformis*. Arch. of Biochem. and Biophys., 1968, 127, 72-78
30. CROSTIER N. Chemical control of seed born fungi during germination testing of peas and sweet corn. Phytopathol., 1946, 36, 92-99

31. CURDS C.R., BAZIN J. Protozoan predation in batch and continuous culture. *Adv. Aquat. Microbiol.* 1977, 1, p 115- 176.
32. CURGY J.J., IFTODE F., PERASSO R., ANDRE J. Croissance des cultures et morphologie des mitochondries chez des mutants à hérédité cytoplasmique, résistants au chloramphénicol, de *Tetrahymena pyriformis*. *Biol. Cell.*, 1980, 37, 51-59
33. CURGY J.J., LEDOIGT G., STEVENS B.J., ANDRE J. Mitochondrial et cytoplasmic ribosomes from *Tetrahymena pyriformis*. Correlative analysis by gel electrophoresis and electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 1974, 60, 628-640
34. DANFORTH W.F. Respiratory metabolism. in *Research in Protozoology*, T-T, CHEN ed., Pergamon Press, Oxford-New York-Toronto, 1967, vol. I, pp. 201-306
35. DIVE D. La nutrition holozoïque des protozoaires ciliés. Ses conséquences dans l'épuration naturelle et artificielle. *Ann. Biol.*, 1973, T. XII, fasc. 7-8, 343-380
36. DIVE D., LECLERC H., PERSOONE G. Pesticide toxicity on the ciliate protozoan *Colpidium campylum* : possible consequences of the effect of pesticides in the aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 4, 129 - 134.
37. DUBOIS K.P., RAYMUND A.B., HIETBRINK B.E. Inhibitory action of dithiocarbamates in enzymes of animal tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1961, 3, 236-255
38. DUVAL J., SOUSSY C.J. *Antibiothérapie*, 1980, 2e ed. Masson edit., 176 pp.
39. DYSART M.P. Cytochemical and quantitative DNA analyses of the macronucleus and its extrusion body in species of *Tetrahymena*. *J. Protozool.*, 1963, 10, suppl., 8-9

40. ELLIOTT A.M. The fine structure of *Tetrahymena pyriformis* during mitosis. in the Cell in mitosis, ed. L. LEVINE, Acad. Press, New York, 1963, pp. 107-124
41. ELLIOTT A.M. Biology of *Tetrahymena*. Dowden, Hutchinson and Ross. Inc. Strondsbrug, Pennsylvania, 1973, 508 pp.
42. ELLIOTT A.M., BACK I.J. The fate of mitochondria during aging in *Tetrahymena pyriformis*. J. Cell. Biol., 1964, 20, 113-129
43. ELLIOTT A.M., KENEDY J.R., BACK I.J. Macronuclear events in synchronously dividing *Tetrahymena pyriformis*. J. Cell. Biol., 1962, 12, 515-531
44. ELLIOTT A.M., TRAVIS D.M., WORK J.A. An ultrastructural study of the effects of aeration and physical activity on aging in *Tetrahymena pyriformis*. J. Exp. Zool., 1966, 161, 177-192
45. ENGBERG J., ANDERSON P., LEICK V., COLLINS J. Free ribosomal DNA molecules from *Tetrahymena pyriformis* GL are giant palindromes. J. Mol. Biol., 1976, 104, 455-470
46. FAWAZ K.M., ABDEL-GHAFFAR A.S., EL-GABALY M.M. Sensitivity of root-module bacteria to different seed protectants. Symp. Biol. Hurg., 1972, 11, 417-422
47. FLICKINGER C.J. The fine structure of the nuclei of *Tetrahymena pyriformis* throughout the cell cycle. J. Cell. Biol., 1965, 27, 519-529
48. FOURMAUX -PRIEM M.N. Utilisation de *Tetrahymena pyriformis* synchrone en écotoxicologie. Valeur indicatrice de deux enzymes mitochondriales. Thèse d'ingénieur CNAM, Lille, 1981, 85 pp.
49. FRANKE W.W., ECKERT W.A. Cytomembrane differentiation in a ciliate, *Tetrahymena pyriformis*. II. Bifacial cisternal and tubular formations. Z. Zellforsch., 1971, 122, 244-253

50. FRANKE W.W., ECKERT W.A., KRIEN S. Cytomembrane differentiation in a ciliate, *Tetrahymena pyriformis*. I. Endoplasmic reticulum and dictyosomal equivalents. *Z. Zellforsch.*, 1971, 119, 577-604
51. FRANKE W.W., KARTENBECK J. Some principles of membrane differentiation. in : *Progress in differentiation Research*, N. MULLER-BERAT, C. ROSENFELD, D. TARIN et D. VIZA eds., North-Holland Publ., Amsterdam, 1976, pp. 213-243
52. FURGASON W.H. The significant cytostomal pattern of the "Glaucoma-*Colpidium* group", and a proposed new genus and species *Tetrahymena gelei*. *Arch. Protistenk.*, 1940, 94, 224-266
53. GABORIT J.M. Les cultures synchrones de *Tetrahymena pyriformis* GL. Contribution à leur application en toxicologie. D.E.A. Univ. Sci. Techn. Lille I, 1979, 67 p.
54. GALL J.G. Free ribosomal RNA genes in the macronucleus of *Tetrahymena*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1974, 71, 3078-3081
55. GLAUERT A.M., BRIEGER E.M., ALLEN J.M. The fine structure of vegetative cells of *Bacillus subtilis*. *Exp. Cell. Res.*, 1961, 22, 73-85
56. GOROVSKY M.A. Macro- and micronuclei of *Tetrahymena pyriformis* : a model system for studying the structure and function of eukaryotic nuclei. *J. Protozool.*, 1973, 20, 19-25
57. GOVINDARAJU K., VLASSACK K., HEREMANS K.A.H. Effect of the thiocarbamates cycloate and diallate and the dithiocarbamate Maneb and Thiram on biological nitrogen fixation and nitrogen mineralization in soils. *Med. Fac. Landbonnoret Rijksuni. Gent*, 1975, 40, I 552, 1209-1219
58. GUY H.G. Organic compounds as insecticides. *Del. Agr. Exp. Sta. Bull.*, 1937, 206, 5-60
59. HAMBURGER K., ZEUTHEN E. Synchronous divisions in *Tetrahymena pyriformis* as studied in an inorganic medium. *Exp. Cell. Res.*, 1957, 13, 443

60. HIGASHINAKAGAWA T., SEZAKI M., KONDO S. Isolation of nucleoli from *Tetrahymena pyriformis*. *Devel. Biol.*, 1979, 69, 601-611
61. HOGG J.F., KORNBERG H.L. The metabolism of C2-compounds in microorganisms. 9. Role of the glyoxylate cycle in protozoal glyconeogenesis. *Biochem. J.*, 1963, 86, 462-468
62. HOLZ G.G. Structural and functional changes in a generation in *Tetrahymena*. *Biol. Bull.*, 1960, 118, 84-95
63. HOLZ G.G.Jr., SCHERBAUM O.H., WILLIAMS N.E. The arrest of mitosis and stomatogenesis during temperature induction of synchronous division in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell. Res.*, 1957, 13, 618
64. HUBERT M., CARASSO N., FAVARD P. Methode de rassemblement de petits organismes en suspension pour l'inclusion dans les milieux visqueux. *J. Microscopie*, 1962, 2, 163-166
65. IFTODE F., CHARRET R. Observations de "divisions" mitochondriales chez *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.*, 1978, 23, 12 A
66. IL'INA V.I. Functional state of the female reproductive system during occupational contact with tetramethyl thiram disulfide. *Pediatr. Akush. Ginekol.*, ISS, 1976, 1, 54, 56
67. KAFFENBERGER W., HEMMERICH B., ECKERT W.A. Synchronizing temperatures and rRNA metabolism in *Tetrahymena pyriformis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1979, 64 (B), 167-173
68. KASKEVICH L.M. Use of rheohepatography in the diagnosis of toxicochemical affection of the liver in persons dealing with tetramethyl thiuram disulfide. *Gig. Tr. Prof. Zabol.*, 1975, 6, 16-19
69. KASKEVICH L.M., BEZUGLYI V.P. State of health of persons working with TMTD at seed control laboratories and seed farms. *Gig. Tr. Prof. Zabol.*, 1973, 17 (3), 49-51

70. KECSKES M., SCHMIDT K. Quantitative change of microorganisms of the effect of TMTD in a chernozem soil with forest residues. *Agrokem. Falaztan.*, 1976, 25 (1-2), 145-162
71. KIDDER G.W., DEWEY V.C. The biochemistry of ciliates in pure culture. In: HUTNER S.H. *Biochem. Physiol. Protozoa*, 1951, V.1. Acad. Press Inc., New York, 1951p.
72. KLINCARE A., KRESLINA D., MISKE I. Composition and activity of the epiphytic microflora of some agricultural plants. *Ecol. Leaf. Surface Microorganisms*, 1970. Proc. Int. Symp., 1970, 191-201
73. KOLB-BACHOFEN V. Electron microscopic localization of the acid phosphatase in *Tetrahymena pyriformis* : the influence of activities of lysosomal enzymes on fixation acid structural preservation. *Cytobiologie*, 1977, 15, 135-144
74. KOLB-BACHOFEN V., VOGELL W. Mitochondrial proliferation in synchronized cells of *Tetrahymena pyriformis*. A morphometric study by electron microscopy on the biogenesis of mitochondria during the cell cycle. *Exp. Cell. Res.*, 1975, 94, 95-105
75. KOMAROVA L.T. Changes in the intracellular metabolism of leukocytes under the effect of some pesticides. *Gig. Primen. Toksikol. Pestits. Klin. Otravl.*, 1971, 9, 306-309
76. KORABIEV M.V., LUKIENKO P.I. Effectiveness of dithiocarbamic acid derivatives and structurally related compounds in hypoxia. *Farmakol. Toksikol.*, 1967, 30 (2), 186-189
77. KORABIEV M.V., SIMOROT R.P. Effects of dithiocarbamic acid and derivatives or activities of cytochrome oxidase, succinic dehydrogenase and catalase. *Farmakol. Toksikol.*, 1965, 28 (2), 234-237
78. KROON A.M., AGSTERIBBE E., DE VRIES H. Protein synthesis in mitochondria and chloroplasts. in *The mechanism of protein synthesis and its regulation*. Bosch. L., ed., North-Holland, Amsterdam, 1972, p. 539-582

79. KROON A.M., ARENDZEN A.J. The inhibition of mitochondrial biogenesis by antibiotics. In *Mitochondria-Biomembranes*. FEBS Symposium, 1972, 28, North-Holland, Amsterdam, p. 71-83
80. KUZNETSOV V.I. Content of residual quantities of TMTD (tetramethyl thiuram disulfide) in the tissues of chickens during experimental poisoning. *Leningr. Vet. Inst.*, 1973, 34, 234-237
81. LANE N.M., PADILLA G.M. Shifts in nuclear and cytoplasmic nucleic acid content in temperature-synchronized *Tetrahymena pyriformis* HSM. *J. Cell. Physiol.*, 1970, 77, 93-102
82. LARNED R.W., ANTIPA G.A. Giant peroxisomes in chemostatically grown *Tetrahymena*. *Progress in Protozoology*, V. Intern. Congr. Protozool., New York, 1977, abstract 111
83. LEGNER M. Experimental approach to the role of Protozoa in aquatic ecosystems. *Amer. Zool.* 1973, 13, p177-192.
84. LEVINE N.D., CORLISS J.O., COX F.E.G., DEROUX G., GRAIN J., HONTGBERG B.M., LEEDALE G.F., LOEBLICH A.R.III, LOM J., LYNN D., MERINFELD E.G., PAGE F.C., POLJANSKY G., SPRAGUE V., VAVRA J., WALLACE F.C. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.*, 27 (1), 37-58
85. LEVY M.R. Regulation of isocitrate metabolism in peroxisomes in *Tetrahymena pyriformis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1972, 152, 463-471
86. LEVY M.R., ELLIOTT A.M. Biochemical and ultrastructural changes in *Tetrahymena*. I. Localization of acid hydrolases and changes in cell ultrastructure. *Exp. Cell. Res.*, 1968 a, 55, 295-305
87. LEVY M.R., ELLIOTT A.M. Biochemical and ultrastructural changes in *Tetrahymena pyriformis* during starvation. *J. Protozool.*, 1968 b, 15, 208-222
88. LEVY M.R., SCHERBAUM O.H. Glyconeogenesis in growing and nongrowing cultures of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Gen. Microbiol.*, 1965, 38, 221-230

89. LEVY M.R., WASMUTH J.J. Effects of carbohydrate on glycolytic and peroxisomal enzymes in *Tetrahymena*. *Bioch. Biophys. Acta*, 1969, 201, 205-214
90. LIANG T., RAUGI G.J., BLUM J.J. Effect of 4-pentenoic acid on intermediate metabolism of *Tetrahymena*. *J. Protozool.*, 1976 a, 23 (1), 186-193
91. LIANG T., RAUGI G.J., BLUM J.J. Inhibition of P-enolpyruvate carboxykinase and of glyconeogenesis in *Tetrahymena* by 3-mercapto-picolinic acid. *J. Protozool.*, 1976 b, 23 (3), 473-477
92. LINDHAL P.E.B. I. Inhibition of growth and photosynthesis in submerged plants with TMTD and Na-dimethyl-dithio-carbamate and reversal of this inhibition of photosynthesis. *Nature*, 1961, 191, 51-53
93. LINDHAL P.E.B. II. Inhibition of growth and photosynthesis in submerged plants with TMTD and Na-dimethyl-dithio-carbamate and reversal of this inhibition of photosynthesis. *Physiol. plantarum*, 1962, 15, 607-622
94. LINDHAL P.E.B. III. Inhibition of growth and photosynthesis in submerged plants with TMTD and Na-dimethyl-dithio-carbamate and reversal of this inhibition of photosynthesis. *Physiol. Plantarum*, 1963, 16 (3), 630-644
95. LINDHAL P.E.B. Effects on aquatic plants of tetramethyl-thiuram disulfide and sodium dimethyl-dithio-carbamate. *Landbrukskogsol. Ann.*, 1964, 30 (2), 375-404
96. LINDHAL P.E.B. The growth inhibition in unicellular green algae by some N-disubstituted dithio-carbamate derivatives. *Landbrukskogsol. Ann.*, 1966 a, 32 (1), 65-86
97. LINDHAL P.E.B. Reversal of inhibitions of photosynthesis induced by sodium dimethyl-dithio-carbamate and tetramethyl-thiuram *Physiol. Plantarum*, 1966 b, 19 (1), 87-98
98. LINDHAL P.E.B., AKERSTROM S. On the mechanism of inhibition of photosynthesis by N-disubstituted dithiocarbamate and corresponding thiuram disulfide. *Landbrukskogsol. Ann.*, 1965, 31 (4), 459-503

99. LLOYD D. The mitochondria in microorganisms. Acad. Press London-New York-San Francisco, 1974, 553 pp.
100. LLOYD D., JOHN L., EDWARDS C., CHAGLA A.H. Synchronous cultures of microorganisms : large scale preparation by continuous flow size selection. J. Gen. Microbiol., 1975, 88, 153-158
101. LWOFF A. Sur la nutrition des infusoires. C.R.Acad. Scien., 1923, 176, 928-930
102. MAEDA, KAZUKO, TONOMURCA, KENZO. Microbial degradation of tetramethylthiuram disulfide. Kogyo Gijustwin, Hakko Kenkycesko Kenkysi Hokoku, 1968 1968, 33, 1-2
103. MANNERS D.J., RYLEY J.F. Studies on the metabolism of protozoa. 2. The glycogen of the ciliate *Tetrahymena pyriformis* (*Glaucocoma pyriformis*). Biochem. J., 1952, 52, 480-482
104. MARTIN H., STRINGER A., WAIN R.L. The qualitative examination of insecticidal properties. Ann. Rept. Agr. Hort. Res. Sta. Long Ashton, Bristol, 1943, 62-76
105. MARZULLI F.N., MAIBACH H.I. Contact allergy predictive testing in man. Contact dermatitis, 1976, 2 (1), 1-17
106. MASSAUX F. The penetration and transport of TMTD in plants. Bull. Soc. Roy. Sci. Liege, 1964, 33 (3-4), 206-213
107. McDONNARD B.B. Quantitative aspect of desoxyribonucleic acid (DNA) metabolism in an amiconucleate strain of *Tetrahymena*. Biol. Bull., 1958, 114, 71-94
108. McDONNARD B.B. Nucleic acids in *Tetrahymena* during vegetative growth and conjugation. In Biology of *Tetrahymena*, ed. A.M. ELLIOTT, DOWDDEN, HUTCHINSON and ROSS Inc., Stroudsburg Pa., 1973, p. 287-306

109. MELSON F., WEIGELT H. The influence of tetramethyl-thiuram (disulfide) and carbon disulfide on the enzymes monoamine oxydase and alcohol deshydrogenase. Toxicol. Carbon. Disulfide Proc. Symp. (Prague), 1968, 100-103
110. MEREAU M., DIVE D., VIVIER E. A new rapid method for collection and preparation of cell suspensions for electron microscopy. *Experientia*, 1982, 38 (2), 282-284
111. MEYER H., PAAPE W., RACHNER M. The action of several rubber constituents in the *Daphnia* test. *Pharmazie*, 1962, 17, 409-410
112. MILADI N., ATTEBA S., DOOH-PRISO E., DESFONTAINES C., ALBRECHT R. Effets de fongicides, Manebe et Zinèbe, sur l'activité des oxygénases et sur la teneur en thiolates dans les microsomes hépatiques de rat. *Food Cosmet. Toxicol.*, 1981, 19, 761-763
113. MILES G.F. The slurry method for treating seed corn. Agr. New Letter Pub. Relation Dept. E.I. Du Pont de Nemours and Co., 1946, 14, 71-74
114. MILLER C.R., ELSON W.D. The regulation of the chemical structure to *in vitro* antibacterial and antifungal activity against human pathogens. *J. Bacteriol.*, 1949, 57, 47-54
115. MILLER F., PALADE G. Lytic activity in renal protein absorption droplets. An electron microscopical cytochemical study. *J. Cell. Biol.*, 1964, 23, 519-522
116. MILLIS A.J.T., SUYAMA Y. Effects of chloramphenicol and cycloheximide on the biosynthesis of mitochondrial ribosomes in *Tetrahymena*. *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 4063-4073
117. MONER J.G. Temperature, RNA synthesis, and cell division in heat-synchronized cells of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell. Physiol.*, 1967, 67, 217-224
118. MONER J.G., BERGER R.D. RNA synthesis and cell division in heat-synchronized cells of *Tetrahymena*. *Exp. Cell. Res.*, 1966, 45, 618-630

119. MONERON A. Utilisation de L-pronase en cytochimie ultrastructurale. J. Microscopie, 1966, 5 (5), 583-596
120. MONTGOMERY M.B.S., MORRE M.M. A laboratory method for testing toxicity of protective fungicides. J. Pomology Hort. Sci., 1938, 15, 253-256
121. MULLER M. Peroxisomes of protozoa. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1965, 168, 292-301
122. MULLER M. Biochemistry of protozoan microbodies : peroxisomes, α -glycerophosphatase bodies, oxidase bodies, hydrogenosomes. Ann. Rev. Microbiol., 1975, 29, 467-483
123. MULLER M., HOGG J.F., DE DUVE C. Distribution of tricarboxylic acid cycle enzymes and glyoxylate cycle enzymes between mitochondria and peroxisomes in *Tetrahymena pyriformis*. J. Biol. Chem., 1968, 243, 5385-8395
124. NANNEY P.I., WYNNE Mc COY J. Characterization of the species of *Tetrahymena pyriformis* complex. Trans. Amer. Micros. Soc., 1976, 95 (4), 664-682
125. NEHRING D. Toxicity of new pesticides and sewage (treatment agents) to fish. Z. Fischerei, 1966, 14 (1-2), 1-8
126. NILSSON J.R. Macronuclear changes in *Tetrahymena pyriformis* GL during the cell cycle and in response to alterations in environmental conditions. Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, 1970 a, 37, 285-300
127. NILSSON J.R. Suggestive structural evidence for macronuclear subnuclei in *Tetrahymena pyriformis* GL. J. Protozool., 1970 b, 17, 539-548
128. NILSSON J.R. Cytolysosomes in *Tetrahymena pyriformis* GL. I. Synchronized cells dividing in inorganic salt medium. Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, 1970 c, 38, 87-106
129. NILSSON J.R. Cytolysosomes in *Tetrahymena pyriformis* GL. II. Reversible degeneration. Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, 1970 d, 38, 107-121

130. NILSSON J.R. Physiological and structural studies on *Tetrahymena pyriformis* GL. C. R. Trav. Lab. Carlsbert, 1976, 40 (18-19), 215-330
131. NILSSON J.R. Fine structure and RNA synthesis of *Tetrahymena* during cytochalasin B inhibition of phagocytosis. J. Cell. Sci., 1977, 27, 115-126
132. NILSSON J.R. Phagotrophy in *Tetrahymena*. In Biochemistry and Physiology of protozoa, 2nd ed., M. Levandowsky et S.H. Hutner eds., Acad. Press New York, 1979, vol. I, pp. 339-379
133. NILSSON J.R. On cell organelles in *Tetrahymena* with special reference to mitochondria and peroxisomes. Carlsberg Res. Commun., 1981, 46, 279-304
134. NILSSON J.R., FORER A. Cyclic appearance and disappearance of cytoplasmic granules in *Tetrahymena pyriformis* GL. J. Protozool., 1972, 19 suppl., 41
135. NILSSON J.R., LEICK V. Nucleolar organization and ribosome formation in *Tetrahymena pyriformis* GL. Exp. Cell. Res., 1970, 60, 361-372
136. NILSSON J.R., ZEUTHEN E. Microscopical studies on the macronucleus of heat synchronized *Tetrahymena pyriformis* GL. C.R. Trav. Lab. Carlsberg, 1974, 40 (1), 1-18
137. NILSSON J.R., ZEUTHEN E. On nucleolar DNA replication in *Tetrahymena pyriformis* GL-8 : an electron microscope autoradiographic study of heat synchronized and exponentially multiplying cells. Carlsberg Res. Commun., 1980, 45, 107-111
138. ODEYEMI O., ALEXANDER M. Resistance of *Rhizobium* strains to phyton, spergon and thiram. Appl. Environ. Microbiol., 1977, 33 (4), 784-790
139. PAINTER T.S. Chromatin diminution. Trans. Cors. Acad. Art. and Sci., 1945, 36, 443-447

140. PARSONS J.A. Mitochondrial incorporation of tritiated thymidin in *Tetrahymena pyriformis*. J. Cell. Biol., 1965, 25, 641-646
141. PARSONS J.A., RUSTAD R.L. The distribution of DNA among dividing mitochondria of *Tetrahymena pyriformis*. J. Cell. Biol., 1968, 37, 683-693
142. PENNEYS N.S., EDWARDS L.S., KATSIKAS J.L. Allergic contact sensitivity of thiram compounds in a hemodialysis unit. Arch. Dermatol., 1976, 112 (6), 811-813
143. PERASSO R. La biogénèse des mitochondries. Relations de la mitochondrie avec son milieu. Thèse de Docteur es-sciences naturelles, Univ. Paris-Sud XI, centre d'Orsay, 1980
144. PERASSO R., ADOUTTE A. The process of selection of erythromycine resistant mitochondria by erythromycine in *Paramecium*. J. Cell. Sci., 1974, 14, 475-497
145. PERASSO R., BEISSON J. Modalités de la multiplication des mitochondries chez la paramécie. Biol. Cell., 1977, 29, 28 a
146. PERASSO R., BEISSON J. Temporal pattern of mitochondrial multiplication during the cell cycle of *Paramecium*. Biol. Cell., 1978, 32, 275-290
147. PERRY R.P. The nucleolus and the synthesis of ribosomes. In Prog. Nucleic Acid Research and Mol. Biol., 6, eds. J.N. Davidson and W.E. Cohn, Acad. Press New York-London, 1967, pp. 219-257
148. PLESNER P., RASMUSSEN L., ZEUTHEN E. Techniques used in the study of synchronous *Tetrahymena*. In Synchrony in cell division and growth, Zeuthen E. ed., New York Interscience Publ., 1964, 543-565
149. PORTER R.P. Arasan (thiosan) as a spinach-seed treatment. Plant. Dis. Rept., 1943, 27, 262-263

150. PREVOT P. Action d'un métal lourd, le cadmium sur un dinoflagellé marin libre : *Prorocentrum micans* E. Thèse 3è cycle, Univ. Pierre et Marie Curie, Paris, 1979
151. RASMUSSEN L. Nutrient uptake by *Tetrahymena pyriformis*. Carlsberg Res. Commun., 1976, 41 (3), 144-167
152. RASMUSSEN L., ZEUTHEN E. Cell division and protein synthesis in *Tetrahymena*. In Synchrony in cell division and Growth, Zeuthen E. ed., Interscience New York, 1962, pp. 543-563
153. REYNOLDS S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque strain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 1963, 17, 208
154. RICHARDSON K.C., JARETT L., FINKE E.H. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. Stain. Technol., 1960, 35 (6), 313-323
155. ROBBINS R.C., KASTELIC J. Fate of tetramethyl-thiuram disulfide in the digestive tract of the ruminant animal. J. Agr. Food Chem., 1981, 9
156. ROMANIE E. Thiuram disulfides as mecanizing agents for rubber. Giorn. Chim. Ind. Appl., 1921, 3, 197-199
157. ROTH L.E., MINICK O.T. Electron microscopy of nuclear and cytoplasmic events during division in *Tetrahymena pyriformis* strains W and HSM 3. J. Protozool., 1961, 8, 12-21
158. RUDZINSKA M.A., PORTER K.R. The fine structure of *Tokophrya infusionum* with emphasis on the feeding mechanism. Trans. N.Y. Acad. Sci., 1954, 16, 408-411
159. RYLEY J.F. Studies on the metabolism of the protozoa. 3. Metabolism of the ciliate *Tetrahymena pyriformis* (*Glaucoma pyriformis*). Biochem. J., 1952, 52, 483-492

160. SALOMONE M.F., NACHTWEY D.S. Formation and fate of extranuclear chromatic bodies in *Tetrahymena*. Protozool., 1970, 26 (2), 227-231
161. SATIR B., DIRKSEN E.R. Nucleolar aging in *Tetrahymena* during the cultural growth cycle. J. Cell. Biol., 1971, 48, 143-154
162. SAUVEGRAIN P. Les micropolluants organiques dans les eaux superficielles continentales. Les pesticides organochlorés et les autres. Etude de synthèse de l'AFEE, rapport 2, 1981
163. SCHERBAUM O.H., LOUDERBACK A.L., JAHN T.L. The formation of subnuclear aggregates in normal and synchronized protozoan cells. Biol. Bull., 1958, 115, 269-275
164. SCHERBAUM O.H., ZEUTHEN E. Induction of synchronous cell division in mass cultures of *Tetrahymena pyriformis*. Exp. Cell. Res., 1954, 6, 221-227
165. SCHERBAUM O.H., ZEUTHEN E. Temperature induced synchronous division in the ciliated protozoa *Tetrahymena pyriformis* growing in synthetic and proteose peptone media. Exp. Cell. Res., 1955, suppl. 3, 312
166. SCHLUTER M. The algicide action of five different fungicide against chlorophyta. Z. Fischerei, 1964, 12 (3-4-5), 373-382
167. SEDAR A.W., RUDZINSKA M.A. Mitochondria of protozoa. J. Biophys. Biochem. Cytol., 1956, 2, 331-336
168. SHEPARD D.C. The production and elimination of excess DNA in ultraviolet irradiated *Tetrahymena pyriformis*. Exp. Cell. Res., 1965, 38, 570-579
169. SHRAGO E., BRECH W., TEMPLETON K. Glyconeogenesis in *Tetrahymena pyriformis*. Relationship of enzyme adaptation to the carbon pathway. J. Biol. Chemis., 1967, 242 (13), 4060-4066

170. SHRAGO E., SHUG A.L. Phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Tetrahymena pyriformis*. Biochim. Biophys. Acta, 1966, 122, 374-376
171. SIVITSKATA I.I. State of the organ of vision in persons working in contact with TMTD. Oftamol. Zh., 1974, 28 (4), 286
172. SLIMANE M. Utilisation de *Tetrahymena pyriformis* GL en écotoxicologie. Action du thirames sur la synthèse de l'ADN et de l'ARN. DEA Univ. Sci. Techn. Lille I, 1981, 59 p.
173. SUD R.K., GUPTA K.G. Sensitivity of isolates of *rhizobium* species and *Azotobacter chroococcum* to TMTD and its degradation product Na DDC. Arch. Mikrobiol., 1972, 85 (1), 19-22
174. SULLIVAN W.D., RICE F.M. Autoradiographic study of the incorporation of ³H-thymidine by synchronously dividing *Tetrahymena pyriformis* GL. Trans. Am. Microsc. Soc., 1965, 84, 48-60
175. SUYAMA Y., MIURA K. Size and structural variations of mitochondrial DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1968, 60, 235-242
176. SWIFF H., ADAMS B.J., CARSEN K. Electron microscope cytochemistry of nucleic acids in *Drosophila* salivary glands and *Tetrahymena*. J. Roy. Microsc. Soc., 1964, 83, 161-167
177. THIEM H., SY M. Experiments on the use of chemical means to prevent birds from eating seed. Arb. Biol. Reichs. Land. Forstiv. Berlin, Dahlem, 1940, 23, 133-139
178. THIERRY. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microscopie, 1967, 6, (7), 987-1018.
179. THOMPSON G.A. Studies of membrane formation in *Tetrahymena pyriformis*. I. Rates of phospholipid biosynthesis. Biochem., 1967, 6, 2015-2022

180. TISDALE W.H., FLENNER A.L. Derivatives of dithiocarmic acid as pesticides. Ind. Eng. Chem., 1942, 34, 501-502
181. TOLLEWARR F.D. Prevention of fishy taste in butter. Use of antioxydants. Felte U. Supen., 1953, 55, 3-7
182. TOKUYASA K., SCHERBAUM O.H. Ultrastructure of microcysts and pellicle in *Tetrahymena pyriformis*. J. Cell. Biol., 1965, 27, 87-81
183. TREUHOFF I. Antimicrobial substances for cosmetic preparations with special consideration of biphenols. Parfucin. Kosmet., 1966, 47 (12), 355-358
184. VASSEUR P., ERB F., DEQUIDT J., AERTS C. Study of the acute cytotoxicity of a dithiocarbamate (thiram) on human KB3 cells *in vitro*. Environ. Pollut., Serv. B, 1980, 1, ISS 3, 167-175
185. VOITENKO V.A., ANINA I.R., RAPPOPORT M.B., DYDICHEVA T.U., KASSIN V.Y. Mechanism of the action of pesticides which are carbamic, thio and dithiocarbamic acid derivatives. Trav. Nanch. Sess. Akad. Med. Nank. SSRR, 1967, 110-117
186. WALKER P.M.B., MITCHISON J.M. DNA synthesis in two ciliates. Exp. Cell. Res., 1957, 13, 167-170
187. WATANABE Y. Mechanism of synchrony induction. III. Changes of water-soluble and water-insoluble protein fractions involved in synchronous rounding in *Tetrahymena pyriformis*. Exp. Cell. Res., 1971, 69, 324-328
188. WATANABE Y., IKEDA M. Isolation and characterization of the division protein in *Tetrahymena pyriformis*. Exp. Cell. Res., 1965, 39, 443-452

189. WILLIAMS N.E., LUFT J.H. Use of a nitrogen mustard derivative in fixation for electron microscopy and observations of the ultrastructure of *Tetrahymena*. J. Ultrastr. Res., 1968, 25, 271-292
190. WOODWARD J., GOROVSKY M., KANESHIRO E. Macronuclear subnuclei in *Tetrahymena*. J. Cell. Biol., 1968, 39, 182
191. WOODWARD J., GOROVSKY M., KANESHIRO E. Cytochemical studies on the problem of macronuclear subnuclei on *Tetrahymena*. Genetics, 1972, 70, 251-270
192. YURCHENKO I., KAZAKEVICH R.L., SASINOVICH L.M. Neurosomatic disorders due to prolonged effect of TMTD. Vrach. Delo. ISS, 1976, 4, 135-138
193. YUYAMA S. Requirement of messenger RNA synthesis for the first division in heat synchronized *Tetrahymena*. Exp. Cell. Res., 1975, 90, 381-391
194. ZEUTHEN E. Artificial and induced periodicity in living cells. Advances in Biol. and Med. Phys., 1958, 6, 37
195. ZEUTHEN E. Synchrony in cell division and growth. Intersci. Publ. New York-London-Sydney, 1964, 624 p.
196. ZEUTHEN E. Synchrony in *Tetrahymena* by heat shocks spaced a normal cell generation apart. Exp. Cell. Res., 1971, 68, 49-60

— : —

