

N° d'ordre : 785

50376
1990
107-1

69319

50376
1990
107-1

THÈSE

présentée à

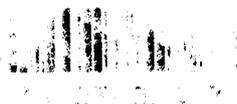
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

Daniel VINCKIER



**DIFFERENCIATION CELLULAIRE CHEZ LES MICROSPORIDIES.
ETUDE ULTRASTRUCTURALE DU DEVELOPPEMENT DE
NOSEMOIDES VIVIERI V.D. et P. ET NOSEMA APIS ZANDER ET
MISE EN EVIDENCE DE L'EVOLUTION DES SYSTEMES
MEMBRANAIRES PAR LA
TECHNIQUE DE CRYOFRACTURE**



Soutenue le 2 Juillet 1990 devant la Commission d'Examen

JURY :

Président et Directeur du Travail :	M.	E.	VIVIER
Rapporteurs :	M.	J.	VAVRA
	M.	G.	BOUX
	Mme	I.	DESPORTES-LIVAGE
Examineurs :	M.	A.	DHAINAUT
	M.	G.	DEVAUCHELLE

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

M. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DECUYPER,
DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, GERMAIN, GLACET, GONTIER, KOURGANOFF,
LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL,
PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI, Mes BEAUJEU, LELONG.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN

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

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON, J. CORTOIS.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

M. A. DUBRULLE.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNELLE Jean Pierre	Chimie-Physique
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie-Physique
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DHAINAUT André	Biologie animale
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LEROY Jean Marie	Spectrochimie
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MIGEON Michel	E.U.D.I.L.
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PETIT Francis	Chimie organique
M. POUZET Pierre	Modélisation - Calcul scientifique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHAMPS Joel	Spectroscopie moléculaire
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2^{ème} CLASSE

M. ALLAMANDO Etienne	Composants électroniques
M. ANDRIES Jean Claude	Biologie des organismes
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
M. BASSERY Louis	Génie des procédés et réactions chimiques
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERTRAND Hugues	Sciences Economiques et Sociales
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIS Pierre	Mécanique
M. BOISSIER Daniel	Génie civil
M. BOIVIN Jean Claude	Spectrochimie
M. BOUQUELET Stéphane	Biologie appliquée aux enzymes
M. BOUQUIN Henri	Gestion
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CATTEAU Jean pierre	Chimie organique
M. CAYATTE Jean Louis	Sciences Economiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. CHARET Pierre	Biochimie structurale
M. CHIVE Maurice	Composants électroniques optiques
M. COMYN Gérard	Informatique théorique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
M. CORIAT Benjamin	Sciences Economiques et Sociales
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Tectonique Géodynamique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean jacques	Biologie
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DEJAEGER Roger	Electrochimie et Cinétique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences Economiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide - Cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DHAMELINCOURT Paul	Chimie physique
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides

M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.A.E.)
Mme EVRARD Micheline	Génie des procédés et réactions chimiques
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FAUQUEMBERGUE Renaud	Composants électroniques
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GOURIEROUX Christian	Probabilités et statistiques
M. GREGORY Pierre	I.A.E.
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrice	Sciences Economiques
M. GRIMBLLOT Jean	Chimie organique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.A.E.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEBVRE Jacques	Physique
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEGRAND Pierre	Chimie
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.A.E.)
M. LEROY Yves	Composants électroniques
M. LESENNE Jacques	Systèmes électroniques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAHIEU Jean Marie	Optique - Physique atomique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MAURISSON Patrick	Sciences Economiques et Sociales
M. MESMACQUE Gérard	Génie Mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MORCELLET Michel	Chimie organique
M. MORTREUX André	Chimie organique
Mme NOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
M. NICOLE Jacques	Spectrochimie
M. NOTELET Francis	Systèmes électroniques
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée

M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POSTAIRE Jack	Informatique industrielle
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean Claude	EUDIL
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Systèmes électroniques
M. THIEBAULT François	Sciences de la terre
M. THUMERELLE Pierre	Démographie - Géographie Humaine
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOURSEL Bernard	Informatique
M. TREANTON Jean René	Sociologie du Travail
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VASSEUR Christian	Automatique
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WACRENIER Jean Marie	Electronique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
M. WEINSTEIN Olivier	Analyse économique de la recherche et développement
M. WERNER Georges	Informatique théorique
M. WOZNIAK Michel	Spectrochimie
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Algèbre

à mes Parents,

Claudie,

Marion, Jeanne, Sarah et Frédérique.

AVANT PROPOS

Je ne saurais commencer l'exposé de ce travail sans remercier Monsieur le Professeur E.VIVIER qui, en m'initiant à la Protistologie et en m'accueillant dans son laboratoire, m'a proposé et a dirigé ce travail de recherche relatif aux Microsporidies. Sa confiance, ses conseils et ses encouragements m'ont permis de mener à bien le travail entrepris, concrétisé par ce mémoire. Qu'il veuille bien y trouver l'expression de ma profonde reconnaissance et de ma respectueuse gratitude.

Je suis très honoré de compter parmi mes juges, Monsieur J.VAVRA, Professeur à la Faculté des Sciences de Prague, et dont les travaux m'ont souvent servi de référence. Je lui exprime avec ma profonde admiration, ma sincère gratitude pour avoir bien voulu s'intéresser à mes recherches et participer à mon jury de thèse.

Que Monsieur le Professeur G. BOUIX, Directeur du Laboratoire d'Ichthyologie de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc qui, malgré ses nombreuses occupations, m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie de ce jury, trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.

J'exprime ma profonde gratitude à Madame I. DESPORTES-LIVAGE, Chargée de Recherche au CNRS et que les Microsporidies intéressent beaucoup, d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes plus vifs remerciements vont également à Monsieur G. DEVAUCHELLE, Directeur de Recherche à l'INRA, pour m'avoir toujours apporté son soutien et pour avoir bien voulu faire partie de ce jury. Qu'il trouve ici l'expression de mon amicale gratitude.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Monsieur le Professeur A. DHAINAUT, Directeur du Centre Commun de Microscopie Electronique, en consentant à juger ce travail. Je l'en remercie bien vivement.

Je voudrais également remercier Monsieur le Professeur M.DURCHON d'avoir éveillé mon intérêt pour la Biologie et d'avoir facilité mon intégration au sein du Laboratoire de Biologie Animale, lors de mon arrivée à Lille.

Je tiens aussi à exprimer mon amicale reconnaissance au personnel technique du Laboratoire de Biologie Animale, en particulier à Madame HIMPENS à qui revient tout le mérite de la frappe et de la mise en page du manuscrit, Madame FERREIRA et Monsieur DEREMAUX Techniciens, Madame AUGER et Monsieur LAZARECKI Photographes, Messieurs DOBIN et DEFOSSE

Techniciens, pour l'aide précieuse et efficace qu'ils m'ont apportée durant l'élaboration de ce travail.

Enfin que toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont apporté leur soutien, trouvent ici un témoignage de mon amitié.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : HISTORIQUE	4
1) Les Microsporidies - Généralités	5
2) Les microsporidies parasites de Protozoaires	7
3) La microsporidie <i>Nosema apis</i>	9
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	12
CHAPITRE III : ETUDE DE LA MICROSPORIDIE NOSEMOIDES VIVIERI	
HYPERPARASITE DE LA GREGARINE LECUDINA LINEI	16
A) La grégarine-hôte	18
B) Etude du développement de <i>Nosemoides vivieri</i> : Morphologie ultrastructurale des différents stades du cycle	20
C) Un exemple de différenciation cellulaire : Etude de la différenciation sporoblastique et genèse des différentes structures de la spore chez <i>Nosemoides vivieri</i>	37
D) Remarques sur la position systématique de la microsporidie <i>Nosemoides vivieri</i>	54
CHAPITRE IV : ETUDE DE LA MICROSPORIDIE NOSEMA APIS	57
A) La phase végétative ou mérogonie	59
1) le sporoplasme	59
2) Les mérontes	60
a) Structure générale	60
b) La membrane plasmique	61
c) Le diplocaryon	62
3) La phase de multiplication des mérontes	67
a) La caryocinèse	67
b) La cytodièrese	69
B) La phase de sporulation ou sporogonie	69
1) Les sporontes	69
a) Le sporonte proprement dit	69
b) Les stades plasmodiaux	70
2) Les sporoblastes : la transformation sporoblastique et l'organitogenèse de la spore	71
a) Le filament polaire et ses annexes	72
a) Origine et formation du filament polaire	72
* Le sac polaire	73
* Le filament polaire	74
* Insertion du filament sur le sac polaire	78

b) Le polaroplaste	79
* Le polaroplaste lamellaire	79
* Le polaroplaste vésiculaire	80
g) La vacuole postérieure	80
b) La paroi du sporoblaste	81
a) La membrane plasmique	82
b) Le dépôt de matériel dense	83
c) Le cytoplasme sporoblastique	84
3) La spore	85
a) Le sporoplasme	85
b) Le filament polaire et ses annexes	86
* Le filament polaire	86
* Le polaroplaste	87
* La vacuole postérieure	88
c) La paroi sporale	88
a) La membrane plasmique	89
b) L'endospore	90
g) L'exospore	92
C) Les contacts hôte-parasite	94

CHAPITRE V : ETUDE EN CRYOFRACTURE DE LA STRUCTURE DE QUELQUES
MICROSPORIDIES. LA VESICULE SPOROPHORIQUE ET LA PAROI
SPORALE

	97
A) La vésicule sporophorique	98
B) La paroi sporale	99
1) L'exospore	99
2) L'endospore	100
3) La membrane plasmique	100

CHAPITRE VI : DISCUSSION

	113
1) Le cycle	114
2) Les mérontes	116
a) Structure générale	116
b) Le diplocaryon	118
c) la caryocinèse	119
3) Les sporontes	122
4) Les sporoblastes	127
a) Le filament polaire	127
b) Le polaroplaste	133
c) La paroi	136

5) La spore	137
a) Le filament polaire	137
b) La paroi sporale	139
- La membrane plasmique	139
- L'endospore	141
- L'exospore	143
RESUME ET CONCLUSION	145
BIBLIOGRAPHIE	151
PLANCHES	181

La grégarine *Lecudina linei* n.sp., parasite intestinal du néemerte *Lineus viridis* Johnston, hôte de la microsporidie *Nosemoides vivieri* (V.D. et P.).

L'abeille domestique *Apis mellifica* L., hôte de la microsporidie *Nosema apis* Zander.



INTRODUCTION

Dans le règne animal de nombreuses espèces se sont spécialisées secondairement pour coloniser les milieux biologiques vivants que constituent toutes les autres espèces. Ces organismes devenus parasites vont donc vivre aux dépens d'autres êtres vivants. Parmi les Protozoaires, tous les groupes ont un certain nombre d'espèces, plus ou moins important, qui ont adopté ce mode de vie parasitaire, devenu même obligatoire chez certains d'entre eux, comme les Sporozoaires et les Microsporidies. Dans cet état parasitaire divers degrés peuvent se rencontrer et, au sein de l'organisme-hôte, ces protozoaires parasites ont une localisation très variable puisqu'ils peuvent pratiquement se rencontrer dans tous les organes. Ils peuvent alors se développer soit à l'extérieur de la cellule (parasites extracellulaires), soit à l'intérieur de celle-ci (parasites intracellulaires), et parmi ces derniers figurent les Microsporidies.

Chez ces organismes, les contacts entre le parasite et la cellule-hôte peuvent revêtir trois aspects différents (LOUBES, 1979) :

- un contact direct, pendant tout le cycle, du parasite avec le cytoplasme de la cellule-hôte (microsporidies apansporoblastiques).

- l'isolement du parasite du cytoplasme-hôte, au cours de la sporogonie, par la différenciation de membranes limitant soit un pansporoblaste ou vésicule sporophorique, soit une vacuole de sporogonie.

- l'isolement du parasite, tout au long de son cycle, dans une vacuole parasitaire.

Parfois des microsporidies peuvent même être localisées dans certains organites cellulaires comme le noyau : ainsi *Nosema bombycis* (TAKIZAWA, VIVIER et PETITPREZ, 1973), *Perezia fumiferanae* (PERCY, 1973), *Perezia lankesteriae* (ORMIERES, LOUBES et MAURAND, 1977), *Nosemoides simocephali* (LOUBES et AKBARIEH, 1977), *Microsporidium rhabdophilia* n.sp. (MODIN, 1981) et une microsporidie non identifiée

(ELSTON, KENT et HARREL, 1987).

Le cycle de ces protozoaires parasites intracellulaires est caractérisé par l'alternance de deux phases : une phase végétative (ou mérogonie) à structure cellulaire non spécialisée, pendant laquelle le parasite croît et se multiplie activement, et une phase sporogonique (ou sporogonie) aboutissant à la formation de la spore qui montre une structure complexe hautement différenciée. La dualité entre ces deux aspects du cycle, et le fait que ces organismes paraissent très bien adaptés à la vie parasitaire, nous ont incités à choisir ce matériel, en tant que très bel exemple de différenciation cellulaire, pour comprendre comment à partir d'une cellule simple et banale on aboutit à une cellule présentant un haut degré de différenciation, très bien adaptée à sa fonction. Nous avons donc entrepris cette étude chez deux microsporidies apansporoblastiques, *Nosemoides vivieri*, hyperparasite de la grégarine *Lecudina linei* et *Nosema apis*, parasite des cellules épithéliales de l'intestin moyen de l'abeille domestique *Apis mellifica*. Dans le cycle du parasite, le rôle de la spore est essentiel : transmettre le parasite et l'infection. En effet elle contient et protège le germe infectieux ou sporoplasme, mais aussi tout l'appareil nécessaire à son inoculation dans la cellule-hôte. Cet appareil tire son origine de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique, ces deux organites présentant souvent entre-eux des liens étroits. Le but de cette étude est de montrer la structure fine des différents stades du cycle et de bien mettre en évidence le rôle primordial des vésicules golgiennes et du réticulum endoplasmique dans la genèse des différents organites de la spore, tous ces phénomènes paraissant similaires chez les deux microsporidies. L'apport de la cryofracture, très peu utilisée jusqu'ici dans l'étude des microsporidies, permettra, chez *Nosema apis*, de confirmer les résultats obtenus en ultrastructure classique, d'aborder des problèmes tels que l'association permanente des deux noyaux en un diplocaryon, l'état de la membrane plasmique tout au long du cycle du parasite, la texture de la paroi sporale, et de comparer toutes ces données avec quelques travaux effectués sur d'autres microsporidies.

Chapitre I
HISTORIQUE

1 - LES MICROSPORIDIÉS - GENERALITÉS

Il y a plus d'un siècle que les premières microsporidies furent observées et c'est en 1882 que BALBIANI crée, parmi les Protozoaires, l'ordre des Microsporidies pour regrouper des organismes de petite taille caractérisés par la présence de spores. Cependant il ne propose aucun système de classification et ce n'est qu'en 1892 que THELOHAN propose une première classification des microsporidies. LABBE en 1899 établit la première revue complète des microsporidies connues. STEMPELL (1909) propose une classification comprenant trois familles, puis LEGER et HESSE (1922, 1924) tentent un essai de systématique du groupe des microsporidies bactériiformes, mais la plus importante monographie concernant ces organismes est publiée par KUDO en 1924. Puis il faudra attendre POISSON (1953), WEISER (1961), LOM et VAVRA (1962), CORLISS et LEVINE (1963) pour voir évoluer sensiblement cette classification. TUZET et Coll. (1971), en abandonnant le système proposé par LEGER et HESSE proposent <<un nouveau cadre systématique pour les genres de Microsporidies>>. Dans ce domaine de la taxonomie les apports de certains auteurs concernant des ordres, des familles ou des genres bien précis ont également contribué à la clarification et à l'évolution de la systématique des microsporidies : LOM et WEISER (1969), CALI (1971), MAURAND et Coll. (1971), la mise au point de VIVIER (1975) concernant le nouvel ordre des Metchnikovellidae, HAZARD et OLDACRE (1975), ORMIERES et Coll. (1977), LOUBES et AKBARIEH (1977), SPRAGUE (1978), CANNING et NICHOLAS (1980), CANNING et HAZARD (1982), LARSSON (1983) pour ne citer que les principaux. Parallèlement d'autres auteurs ont également analysé les caractères permettant de définir avec plus de précision les différents genres de microsporidies : VIVIER (1975), PILLEY (1976), CANNING et VAVRA (1977), LOUBES et MAURAND (1977), SPRAGUE (1978), MADDIX et SPRENKEL (1978), VAVRA et Coll. (1981), LARSSON (1986, 1988). En 1977, deux nouvelles classifications sont proposées indépendamment l'une de l'autre : celle de WEISER (avec 38 genres) et celle de SPRAGUE (avec

47 genres); celles-ci seront d'ailleurs reprises et améliorées par ces mêmes auteurs respectivement en 1985 et 1982. Puis LARSSON (1986) tente de classer les microsporidies selon leurs caractères ultrastructuraux. Cette systématique n'est cependant pas encore stabilisée et des aménagements y seront certainement encore apportés, les connaissances en ce domaine montrant encore des lacunes.

Ces microsporidies, qui sont des parasites animaux intracellulaires obligatoires, appartiennent à l'embranchement des Protozoaires où elles ont longtemps constitué, associées aux Myxosporidies et aux Actinomyxidies, le sous-embranchement des Cnidosporidies (POISSON, 1953) : organismes présentant des spores munies d'un filament dévaginable. Cependant certains auteurs comme SCHUBERG (1910) et DEBAISIEUX (1928) avaient très vite affirmé que la spore des microsporidies était uninucléée ou au maximum binucléée et non pentanucléée comme celle des myxosporidies. Il a fallu attendre l'avènement de la microscopie électronique pour résoudre définitivement le problème : ainsi GRASSE (1960) montre que les myxosporidies sont des organismes pluricellulaires et LOM et VAVRA (1961, 1963) puis VAVRA (1965) établissent que le sporoblaste et la spore des microsporidies sont uninucléés ou parfois binucléés. Les Microsporidies et les Myxosporidies représentent donc deux groupes zoologiques différents. Le sous embranchement des Cnidosporidies est dissocié, les Microsporidies, organismes unicellulaires, constituant un nouveau sous-embranchement éloigné du nouvel embranchement des Myxozoaires, organismes pluricellulaires, qui rassemble les Myxosporidies, Actinomyxidies et Paramyxidies (GRASSE, 1970).

Les Microsporidies comportent un très grand nombre de formes et ont une large distribution zoologique, des Protozoaires aux Mammifères, les hôtes les plus fréquents étant toutefois les Arthropodes (Crustacés, Insectes), (SPRAGUE, 1977).

Il faut reconnaître que pendant assez longtemps l'étude des microsporidies n'avait intéressé que relativement peu d'auteurs, ces parasites ne présentant à priori qu'un

intérêt restreint, que ce soit d'ordre médical ou économique, avec cependant quelques exceptions telles *Nosema bombycis* Naegeli 1857 et *Nosema apis* Zander 1909, connues depuis longtemps comme agents de nosémoses causant respectivement des dommages importants dans les élevages du ver à soie *Bombyx mori* et de l'abeille domestique *Apis mellifica*.

Ce n'est qu'à partir de la deuxième moitié de ce siècle que nos connaissances concernant ces organismes ont considérablement progressé, d'une part à cause de l'intérêt croissant de la pathologie des Invertébrés et d'autre part l'avènement de la microscopie électronique a permis là aussi un important bond en avant : la cytologie, l'organisation cellulaire et les cycles ont pu être décrits de façon précise et la systématique a pu être affinée.

Les premières recherches ultrastructurales sur les microsporidies ont porté essentiellement sur la spore mûre et son filament polaire. WEISER (1959) étant le précurseur en décrivant la structure de la spore de *Nosema laphygmae*. Puis l'ultrastructure des spores d'autres genres a été étudiée par divers auteurs : HUGER (1960, 1961), LOM et VAVRA (1961, 1963), de PUYTORAC (1961,1962) BURNETT et KING (1962), SCHOLTYSECK et DANIEL (1962), KUDO et DANIELS (1963). Puis de PUYTORAC (1962) décrit d'autres stades que la spore chez *Mrazekia lumbriculi*. L'étude de VAVRA (1965) sur la structure fine des différents stades évolutifs et la morphogenèse de la spore des microsporidies, a été le point de départ d'une longue liste de travaux sur ces parasites dont SPRAGUE et VAVRA (1976, 1977) ont tiré un remarquable travail de synthèse, <<Comparative Pathobiology>> (volumes 1 et 2), considéré comme ouvrage de référence sur les microsporidies.

2 - LES MICROSPORIDIÉS PARASITES DE PROTOZOAIRES

Les protozoaires chez lesquels des microsporidies ont été observées appartiennent aux deux principaux groupes que sont les Ciliés et les Grégarines. VIVIER (1975) qui en a fait une revue complète, insiste sur le fait que ces parasites de protozoaires sont presque

toujours des hyperparasites puisqu'ils se rencontrent surtout chez les grégarines (parasites obligatoires) ainsi que chez quelques ciliés parasites, une seule espèce étant connue chez un cilié libre. Récemment, GÖRTZ (1987) a également observé des spores de microsporidies chez des ciliés du genre *Stentor*. VIVIER (1975) en avait recensé 34 espèces se répartissant en 9 genres (mais en y incluant les microsporidies parasites de myxosporidies). Cependant de nombreux travaux sur les protozoaires mentionnent l'existence de parasites dont un certain nombre pourrait bien être des microsporidies, les descriptions qui en sont données n'étant pas suffisantes pour établir leur identité de façon certaine. Il faut également signaler que des microsporidies sont aussi connues comme hyperparasites de trématodes, cestodes, nématodes (SPRAGUE, 1977; AZEVEDO et CANNING, 1987) d'acanthocéphales (LOUBES et Coll., 1988.) Chez les grégarines, hôtes les plus fréquents de ces hyperparasites, de tels cas d'hyperparasitisme sont connus au moins depuis 1897, date à laquelle CAULLERY et MESNIL ont décrit le genre *Metchnikovella* comme type nouveau de microorganisme parasite de grégarines, et plus de la moitié des microsporidies décrites appartiennent à la famille des Metchnikovellidae (MESNIL, 1915; CAULLERY et MESNIL, 1919). Ce n'est d'ailleurs que bien plus tard que les examens, en microscopie électronique, de *Metchnikovella hovassei* ont permis de rattacher cette famille aux Microsporidies (VIVIER 1965, VIVIER et SCHREVEL 1973). En fait, les premières microsporidies parasites de grégarines ont été décrites par LEGER et DUBOSCQ (1909) à propos de *Nosema frenzellinae* et de *Perezia lankesteriae*, respectivement hyperparasites de *Cephaloidophoras conformis* (du tube digestif du crabe *Pachygrapsus marmoratus*) et *Lankesteria ascidiae* (du tube digestif de l'ascidie *Ciona intestinalis*). En 1909, HESSE signale également chez *Monocystis mitis* (de l'intestin de l'oligochète *Fridericia polychaeta*) la présence de *Metchnikovella hessei*. Puis de 1909 à 1955, de nombreuses autres microsporidies, appartenant aux genres *Metchnikovella*, *Amphiamblys*, *Amphiacantha*, ont été décrites chez des grégarines de polychètes et VIVIER (1975) en a dressé la liste complète. CODREANU (1967)

avec *Plistophora hyperparasitica* et CORBEL (1967) avec *Metchnikovella martojai*, ont décrit également des microsporidies respectivement hyperparasites des grégarines *Enterocystis rhithrogenae* (de l'intestin de l'éphémère *Rhithrogena semicolorata*) et *Gregarina cousinae* (de l'intestin du grillon *Gryllus assimilis*). HILDEBRAND et VIVIER (1971), HILDEBRAND (1974) ont étudié, en microscopie électronique, la microsporidie *Metchnikovella wohlfarthi* n.sp. hyperparasite de la grégarine *Lecudina tuzetae* (de l'intestin du polychète *Nereis diversicolor*). Puis VIVIER et SCHREVEL (1973) décrivent avec beaucoup de précision les stades végétatifs et l'évolution de *Metchnikovella hovassei*, hyperparasite de la grégarine *Lecudina pellucida* (du tube digestif du polychète *Perinereis cultrifera*). En 1979, RÜHL et KORN ont observé une nouvelle microsporidie, *Geusia gamocysti*, hyperparasite de la grégarine *Gamocystis ephemerae* (de l'intestin de l'éphémère *Ephemera danica*). Plus récemment d'autres microsporidies de la famille des Metchnikovellidae ont été décrites par DESPORTES et THEODORIDES (1979) (*Amphiamblys laubieri*, parasite d'une grégarine d'un échiurien abyssal) et ORMIERES, LOUBES et MAURAND (1981) (*Amphiamblys bhathiellae* parasitant une grégarine intestinale du polychète *Marphysa sanguinea*)

En ce qui concerne les Némertiens, MONTGOMERY (1898) et AWERINZEW (1908, 1909) ont décrit et représenté chez des grégarines respectivement parasites des némertes *Lineus gesserensis* et *Amphiporus* sp., des figures dont on peut penser qu'il s'agissait d'une microsporidie. Nous avons également observé une nouvelle microsporidie, *Nosemoides vivieri*, hyperparasite de la grégarine *Lecudina linei* (VINCKIER, 1972) de l'intestin du némerte *Lineus viridis*, dont les différents stades de développement et la différenciation sporoblastique ont pu être étudiés avec précision.

3 - LA MICROSPORIDIE *NOSEMA APIS*

Nosema apis Zander est la microsporidie agent de la nosérose de l'abeille domestique adulte *Apis mellifica*, maladie contagieuse largement répandue dans de nombreux pays. Le parasite se multiplie dans la paroi de l'intestin moyen et provoque une affection pouvant évoluer de façon inapparente ou causer un affaiblissement des colonies dont l'issue parfois fatale peut-être à l'origine d'importantes pertes économiques. C'est pourquoi de tout temps, les hommes se sont préoccupés des maladies des abeilles. Au cours des siècles de nombreux apiculteurs ont décrit des maladies des abeilles, sans en connaître l'origine, montrant les symptômes les plus apparents et donnant à ces maladies des noms différents. Souvent les spores de *Nosema apis* ont été considérées comme étant celles de champignons et ce n'est qu'en 1909 que ZANDER découvre la véritable identité de l'agent de la nosérose, et faisant l'analogie avec la microsporidie *Nosema bombycis* (agent responsable de la pébrine du ver à soie) le nomme *Nosema apis*. FANTHAM et PORTER (1912) en décrivent le cycle complet, et par la suite, cette microsporidie sera l'objet de multiples travaux concernant son cycle et sa structure : KUDO (1920,1924), TRAPPMAN (1923), BAILEY (1955), THOMSON (1960), KRAMER (1960), ZHDANOV (1960), WEISER (1961, 1979), POPA (1964), STECHE (1965), GRAY, CALI et BRIGGS (1969), SHABANOV (1973), mais aussi l'épidémiologie de la maladie (travaux cités par DOTTIN, 1986).

De même très tôt, *Nosema apis* a été l'objet d'études ultrastructurales, principalement la spore, aussi bien en microscopie électronique à transmission : SHOLTYSECK et DANNEEL (1962), CODREANU et Coll. (1965), POPA et Coll. (1967), WILDFÜHR et FRITZSCH (1969), CALI (1971), qu'en microscopie à balayage : LIU H.J et LIU T.P. (1973), STECHE et HELD (1981), LIU T.P. (1983), ou encore par la technique du "freeze-etching"

(sur tissus non préalablement fixés) : LIU T.P. (1973), LIU T.P. et LIU H.J (1974), LIU T.P.(1975). Par contre les jeunes stades de développement de *Nosema apis* n'ont suscité que très peu de travaux et seuls YOUSSEF et HAMMOND (1971) ont abordé cette étude. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de compléter celle-ci, aussi bien en microscopie électronique à transmission classique que par la technique de la cryofracture (mais sur tissus préalablement fixés).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL

Nos observations ont été effectuées sur deux espèces de microsporidies : *Nosemoides vivieri nomen novum* (= *Nosema vivieri* Vinckier Devauchelle et Prensier, 1970) (Unikaryonidae) et *Nosema apis* Zander 1909 (Nosematidae).

Nosemoides vivieri est parasite de la grégarine *Lecudina linei* Vinckier 1972, elle-même parasite intestinal du némerite *Lineus viridis* (Fabricius) Johnston. Les némerites ont été récoltés sur le littoral boulonnais, à la Station de Biologie Maritime de Wimereux. Ils ont été ramassés sous les pierres de la zone supérieure de l'estran et conservés au laboratoire, en eau de mer renouvelée, dans des cristallisoirs, à l'obscurité et à une température de 4 à 8°C. Ils supportent très bien le jeûne durant de longues périodes. Un tiers environ des individus s'est révélé être parasité par la grégarine *Lecudina linei*.

En ce qui concerne *Nosema apis*, des abeilles vivantes provenant de colonies "douteuses" nous ont été fournies, au printemps, par des apiculteurs de l'Avesnois et de la région lilloise. Ce sont soit des abeilles écloses à la fin de l'été ou en automne et ayant passé l'hiver, soit les premières abeilles écloses au printemps, les apiculteurs effectuant le dépistage de la nosémose à cette époque. Ces abeilles peuvent survivre quelques jours dans de petites cages grillagées munies d'un nourrisseur contenant un peu de miel ou du sirop de sucre, à une température de 35°C.

B - METHODES

1) Observation *in vivo*

a) Les némerites anesthésiés dans une solution de chlorétone à 0,1 % dans de l'eau de mer filtrée ou au MS 222 (tricaïne méthane sulfonate) à 1 % dans l'eau de mer, sont observés entre lame et lamelles sous binoculaire : il est ainsi possible de voir par transparence s'ils sont parasités ou non par des grégarines. Mais la détection de la

microsporidie chez ces grégarines est impossible sur le vivant; il est alors nécessaire de pratiquer des coupes semi-fines d'environ 0,25 μ d'épaisseur, de vers entiers fixés et inclus pour la microscopie électronique, coupes qui après coloration à l'azur B à pH 10 sont observées en microscopie photonique.

b) La présence de *Nosema apis* dans l'organisme de l'abeille peut ne pas engendrer de signe extérieur (BAILEY, 1976) et il est impossible de distinguer une abeille saine d'une abeille parasitée. Il est alors nécessaire de disséquer les abeilles une à une après anesthésie au gaz carbonique, et les intestins prélevés sont placés dans du liquide physiologique (SPIRA, PARNAS et BERGMAN, 1969) avant d'être fixés pour la microscopie électronique. Les intestins fortement parasités peuvent prendre une couleur blanchâtre plus ou moins laiteuse mais pour mettre en évidence la parasitose il est souvent nécessaire d'observer au microscope photonique, un fragment de mésentéron écrasé entre lame et lamelle dans une goutte de liquide physiologique.

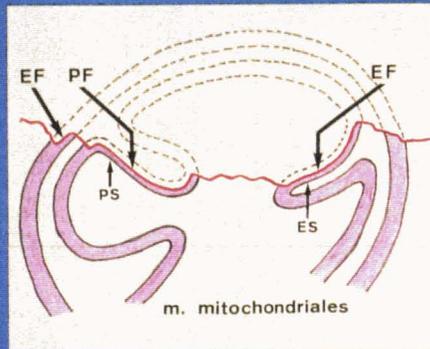
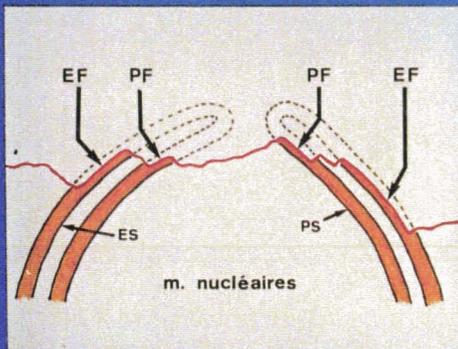
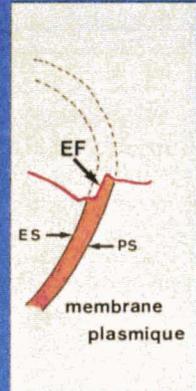
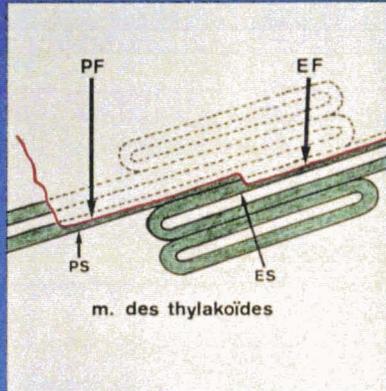
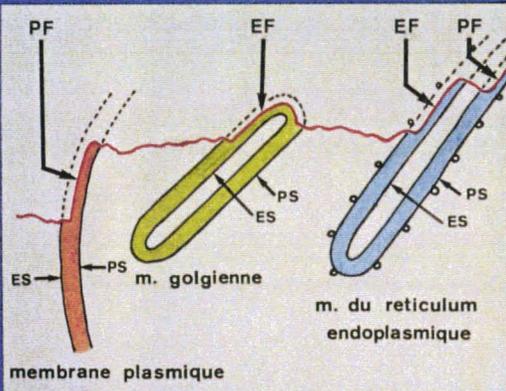
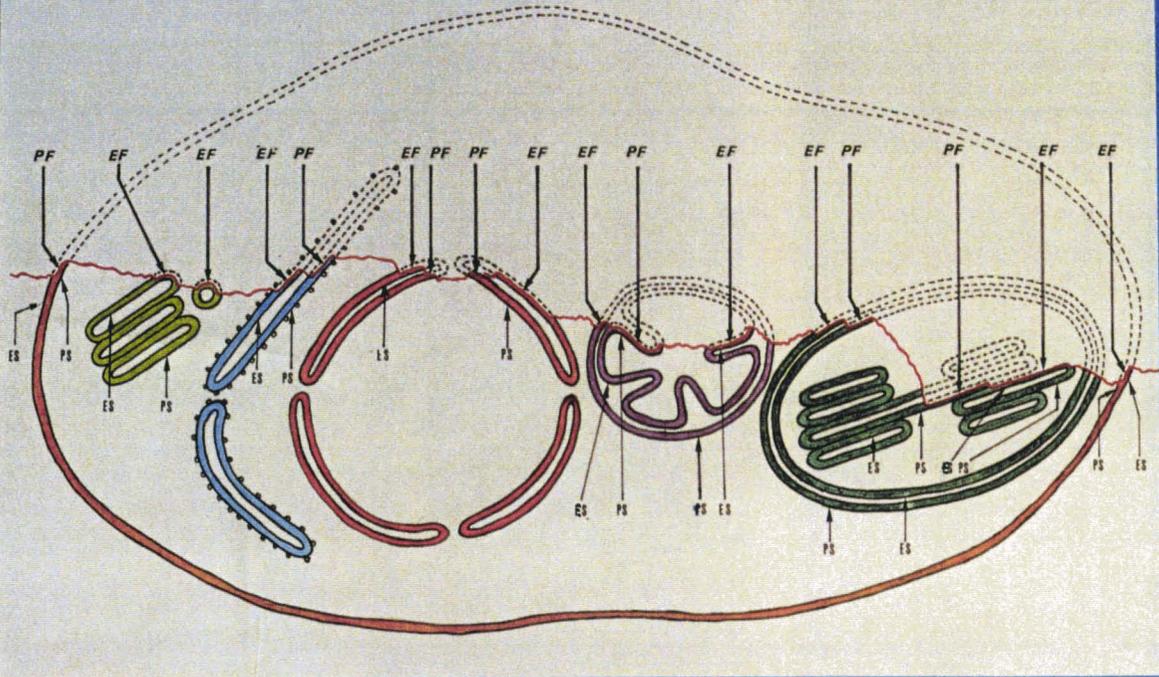
2) Méthodes de microscopie électronique

a) Microscopie électronique à transmission

L'étude ultrastructurale a été faite selon les techniques classiques : double fixation glutaraldéhyde-osmium dans un tampon phosphate 0,1 M (némerites) ou dans le tampon cacodylate de sodium 0,1 M (intestins d'abeilles), déshydratation dans l'acétone, puis inclusion en épon ou araldite.

Les pièces sont coupées à l'ultramicrotome Reichert Om U2 sur couteau de diamant. Les coupes recueillies sur grilles parlodionnées ou non sont contrastées par l'acétate d'uranyle en solution alcoolique et par le citrate plomb.

CRYOFRACTURE : Nomenclature des faces de fracture des membranes biologiques
 (Branton et al. 1975)



Les préparations sont examinées aux microscopes Hitachi HU 11 E et JEOL CX 120.

b) Technique de la cryofracture (freeze-etching)(PORCHET et TORPIER, 1977; DUBREMETZ et TORPIER, 1977).

Les morceaux de mésentéron parasité d'abeille sont rincés dans le liquide physiologique, puis fixés dans une solution de glutaraldéhyde 2,5% (V/V) en tampon cacodylate de sodium 0,1 M (pH 7,2) pendant 1 heure à 4°C. Après fixation, les échantillons sont rincés dans le tampon cacodylate 0,1 M, puis imprégnés pendant 2 heures dans une solution de glycérol à 30 % (V/V) en tampon cacodylate 0,1 M. Puis les morceaux d'intestin sont déposés sur des porte - échantillons pour doubles répliques Balzers. Ils sont alors immédiatement congelés pendant une trentaine de secondes à la température de fusion de l'azote liquide (-210°C) puis conservés dans l'azote liquide. Les fractures sont effectuées à - 120°C sous un vide de 10^{-6} mm de Hg et les répliques sont réalisées dans un appareil Balzers BAF 300 équipé d'un système d'évaporation à faisceau d'électrons et d'un quartz de mesure étalonné pour un dépôt de carbone-platine de 20 Å puis un dépôt de carbone seul de 80 Å. Les répliques sont nettoyées sur une solution d'hypochlorite de sodium, puis lavées plusieurs fois dans l'eau distillée et recueillies sur des grilles de cuivre 300 ou 400 mesh.

En accord avec la nomenclature de BRANTON et al. (1975), pour chaque membrane qui peut être fracturée en deux hemimembranes, la face de fracture de l'hémimembrane juxtaposée au cytoplasme, au nucléoplasme ou à la matrice mitochondriale est étiquetée P (→ PF), et la face de fracture de l'hémimembrane juxtaposée à l'espace extracellulaire, l'espace endoplasmique et l'espace exoplasmique (de DUVE, 1969) est étiquetée E (→ EF). Les faces P et E sont donc les deux faces de fracture complémentaires de toute membrane biologique.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA MICROSPORIDIE *NOSEMOIDES VIVIERI*,
HYPERPARASITE DE LA GREGARINE *LECUDINA LINEI*

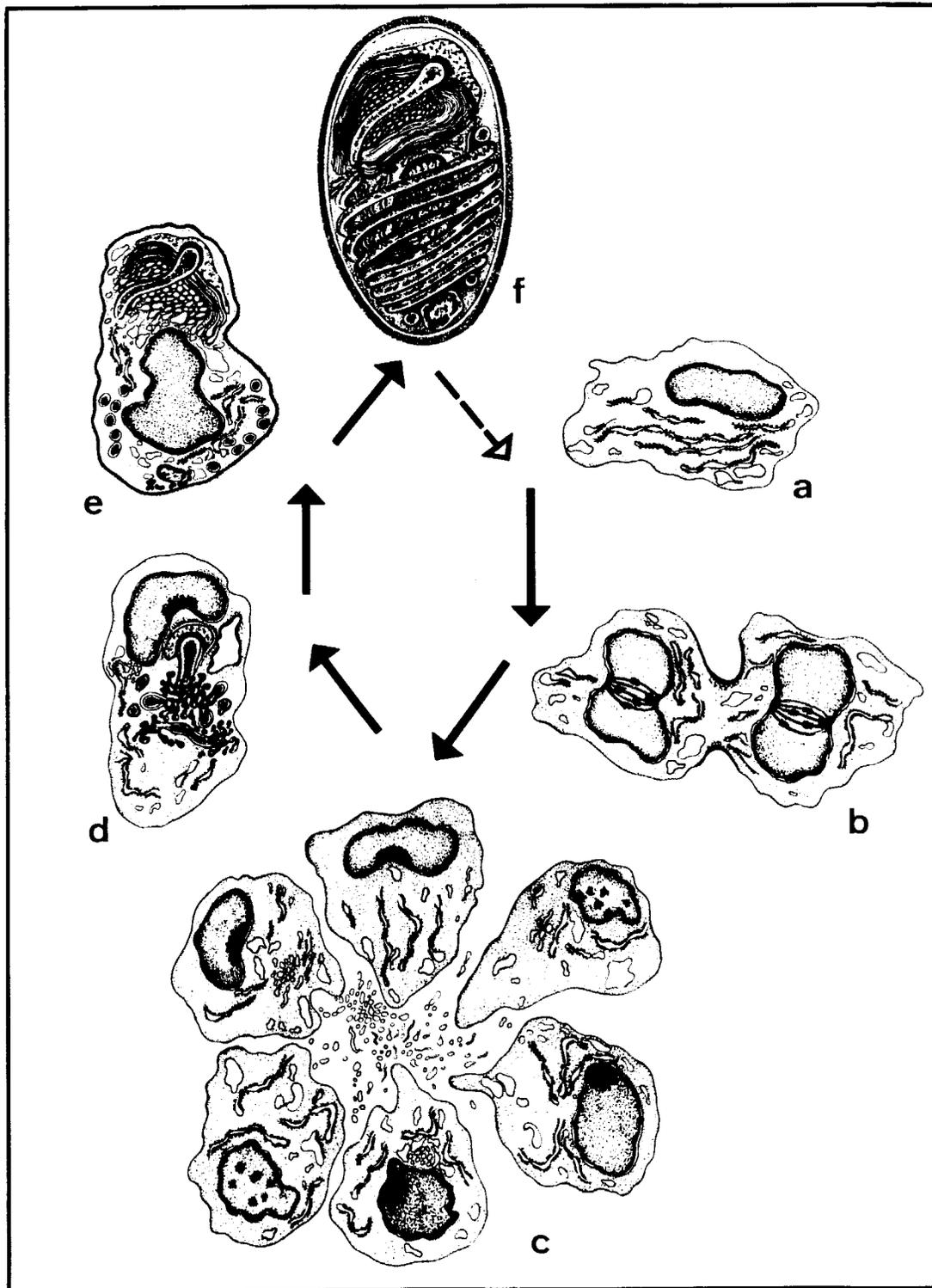


Fig A - Cycle de *Nosemoides vivieri* -

* Phase végétative : (a), schizonte uninucléé ; (b, c), phase de multiplication des schizontes (b) et formation des sporoblastes (c).

* Phase sporogonique : (d, e), transformation sporoblastique et genèse de la spore (f).

L'observation des coupes de grégarines parasitées montre un certain nombre de stades correspondant aux différentes étapes du développement de la microsporidie. Dans un même hôte on peut rencontrer tous les stades du cycle, quoique généralement il y ait une prédominance des différents stades de l'une des deux phases du cycle : la phase végétative ou la phase sporogonique.

Le cycle du parasite (Fig.A) débute avec l'entrée du germe infectieux ou sporoplasme dans la cellule-hôte et se termine par la formation des spores, formes de résistance permettant la dissémination du parasite et qui contiennent ce même sporoplasme. Entre les deux, le parasite subit plusieurs cycles cellulaires pendant lesquels il croît et se divise : c'est la phase végétative (ou schizogonie ou mérogonie). Le sporoplasme évolue en schizonte (ou méronte) qui va se diviser plusieurs fois : c'est la phase de multiplication permettant une augmentation considérable du nombre de parasites et l'extension de l'infection. Au cours de ces divisions, la caryocinèse précède souvent la cytodierèse, ce qui aboutit à la formation de stades plurinucléés, pouvant rappeler des figures plasmodiales, qui se sépareront d'ailleurs plus tard en cellules simples évoluant en sporoblastes.

L'évolution de la dernière génération de schizontes en sporoblastes marque le début de la phase sporogonique (ou sporogonie ou sporogénèse). Chaque sporoblaste va évoluer en une seule spore, et c'est à ce stade de sporoblaste que vont se différencier les différentes structures de la spore. Celle-ci est donc une forme de résistance abritant le germe infectieux (sporoplasme) et les structures (filament polaire, polaroplaste) permettant d'injecter celui-ci dans la cellule -hôte lors de l'infestation.

Le cycle des microsporidies est donc caractérisé par cette dualité des deux aspects opposés du cycle : en effet pendant la phase végétative les stades sont des cellules simples à structure cellulaire classique, alors que dans la phase sporogonique la spore est une cellule hautement différenciée parfaitement adaptée à sa fonction (VAVRA, 1976; VIVIER, 1979).

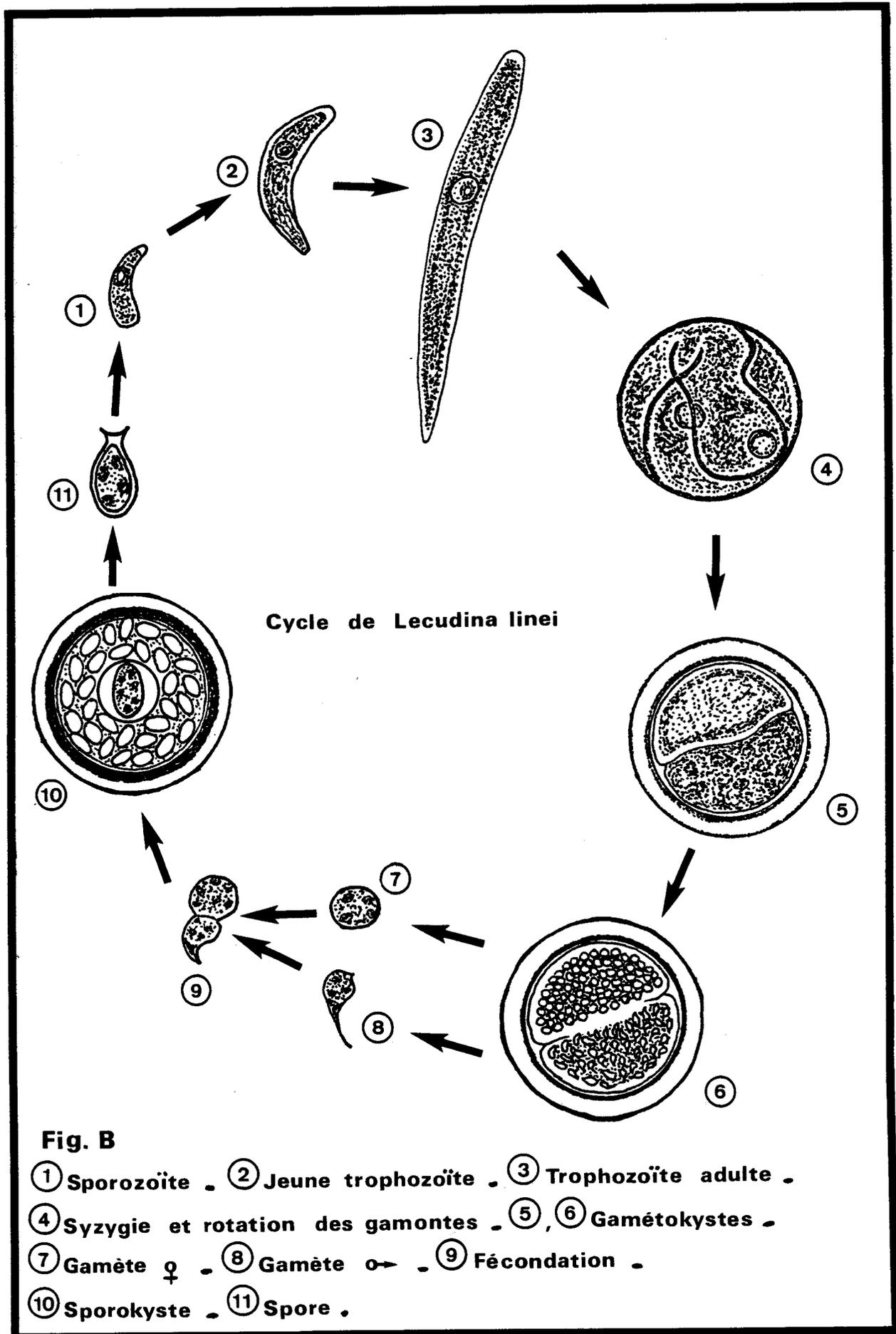


Fig. B

- ① Sporozoïte . ② Jeune trophozoïte . ③ Trophozoïte adulte .
 ④ Syzygie et rotation des gamontes . ⑤, ⑥ Gamétokystes .
 ⑦ Gamète ♀ . ⑧ Gamète ♂ . ⑨ Fécondation .
 ⑩ Sporokyste . ⑪ Spore .

A) - La grégarine-hôte

L'organisme hôte de la microsporidie *Nosemoides vivieri* est une grégarine non cloisonnée, *Lecudina linei* n.sp. (VINCKIER 1972), hébergée dans les deux tiers postérieurs de l'intestin et des diverticules intestinaux (fig.4) du néemerte *Lineus viridis* (Fabr.)Johnston.

Cette grégarine monocystidée, à région antérieure différenciée en mucron faisant ventouse à son sommet, appartient à la famille des Lecudinidae très bien étudiée par SCHREVEL (1969). Les différentes phases de son cycle (Fig.B) correspondent à celles du cycle type du genre *Lecudina* Mingazzini 1891 établi par SCHREVEL (1969). Ce sporozoaire est caractérisé par un trophozoïte de forme allongée, légèrement arquée, à extrémité postérieure plus effilée que la région antérieure (fig.5), atteignant 350 à 450 μm de long sur 30 à 45 μm de large. La syzygie est suivie de mouvements de rotation et l'anisogamie est très marquée, avec un gamète femelle sphérique sans flagelle et un gamète mâle plus ou moins conique possédant un prolongement flagelliforme. Les kystes sphériques d'environ 120 μm de diamètre comportent un nombre élevé de spores ovoïdes de 8 μm sur 4 μm possédant un genre de goulot à l'un des pôles.

Pendant la phase de croissance, la grégarine vit fixée aux cellules épithéliales intestinales de l'hôte (fig.3). L'appareil de fixation, situé à l'extrémité antérieure consiste en un mucron apparaissant comme une sphère à paroi lisse non différenciée en plis épicytaires qui caractérisent tout le reste de la surface du parasite (fig.1). Puis le trophozoïte va se détacher de la paroi intestinale et rester libre dans la lumière de l'intestin.

L'architecture de la surface de ce trophozoïte est définie par un épicyte différencié en plis épicytaires (fig.1). Ces nombreux plis longitudinaux parcourent la surface du protozoaire d'un pôle à l'autre de la grégarine, mucron non compris, et suivent un axe longitudinal légèrement spiralé dans les deux tiers antérieurs du trophozoïte, spirale qui

s'accentue vers la région postérieure effilée dont l'extrémité semble avoir subi une torsion de presque 180° (figs.1, 3). Ces plis, qui présentent des "ondulations" plus ou moins régulières suggérant l'existence de mouvements ondulatoires de l'épicyte, peuvent être étroitement accolés en certains endroits et nettement séparés en d'autres (fig.2), créant ainsi un réseau irrégulier d'une extrémité à l'autre de la grégarine.

D'un point de vue ultrastructural, l'organisation de la grégarine *Lecudina linei* (fig.6) rappelle celle d'autres Lecudinidae déjà étudiées (SCHREVEL et VIVIER, 1966; VIVIER, 1968; SCHREVEL, 1969; OUASSI, 1977; OUASSI et PORCHET-HENNERE, 1978). Les plis épicytaires, d'environ 0,7 à 0,9 μm de haut sont limités par une paroi de 500 μm d'épaisseur constituée par un complexe trimembranaire (une membrane plasmique externe et un système sous-jacent formé en fait par les parois de vésicules aplaties), structure considérée comme générale chez de nombreux sporozoaires (VIVIER et Coll., 1970). Le cytoplasme épicytaire, d'aspect clair, est généralement dépourvu de toute inclusion. Sous l'épicyte, l'ectoplasme limité extérieurement par une couche dense ou "basale", comprend une mince bande de cytoplasme d'environ 80 à 100 nm d'épaisseur riche en ribosomes et microtubules; on y rencontre également des mitochondries et parfois de rares granules denses. La limite ectoplasme - endoplasme est marquée par l'existence d'une strate de nombreuses vacuoles "sous-corticales" à contenu homogène souvent très clair. L'endoplasme est caractérisé par la présence de nombreux grains de réserves, paraglycogène surtout, mais aussi des inclusions de type mucopolysaccharidique, des inclusions lipidiques et des granules denses; on y observe également un appareil de Golgi constitué de dictyosomes épars dans le cytoplasme et quelques mitochondries.

C'est dans cet endoplasme que l'on peut rencontrer, chez les grégarines parasitées, les différents stades du cycle de la microsporidie *Nosemoides vivieri*.

B) - Etude du développement de la microsporidie *Nosemoides vivieri* : morphologie ultrastructurale des différents stades du cycle.

L'observation de coupes fines de la grégarine *Lecudina linei* a révélé l'existence d'une microsporidie dont on a pu étudier les différents stades de développement : formes uniclées et binuclées, sporoblastes et spores.

Cette étude a fait l'objet de l'article "Etude ultrastructurale du développement de la microsporidie *Nosema vivieri* (V.D. et P. 1970)", *Protistologica*, 1971, VII (2) : 273-287.

Les formes uninuclées appelées schizontes ou mérontes, plus ou moins isolées dans le cytoplasme de l'hôte, sont en contact direct avec celui-ci. Des formes en cours de division, correspondant à la phase de multiplication du parasite, sont souvent observées. Il peut ainsi y avoir plusieurs divisions successives aboutissant à la formation de plusieurs générations de schizontes, les stades issus de la dernière génération étant souvent appelés sporontes; ceux-ci évolueront en sporoblastes. Au cours de ces divisions, qui s'effectuent suivant le type pleuromitose acentriolaire, la caryocinèse précède toujours la cytodierèse. Ce phénomène aboutit à la formation de figures lobées binuclées ou même polynuclées d'où s'isolent progressivement, après un certain nombre de divisions successives, les sporoblastes formant des "rosettes" ou groupes d'individus uninuclés. Ceux-ci peuvent se disperser dans le cytoplasme de l'hôte ou rester groupés, et dans ce cas on remarque un certain synchronisme dans le développement des sporoblastes d'un même groupe. Chaque sporoblaste se transformera en une seule spore.

C'est donc au cours de cette phase sporoblastique que va s'effectuer, à partir de vésicules de type golgien, la genèse des différentes structures de la spore : sac polaire, filament polaire, polaroplaste et vacuole postérieure. En fin d'évolution, la paroi du sporoblaste

commence à s'épaissir pour constituer la paroi définitive de la spore. Ces spores sont en grande majorité de forme ovoïde, mais en de rares cas nous avons également observé, à côté de ces spores ovoïdes classiques, des spores très allongées, en forme de bâtonnet légèrement arqué. Toutes ces spores ont exactement la même structure. Ce phénomène, reste sans explication satisfaisante.

L'étude ultrastructurale du développement de cette microsporidie apporte donc des données intéressantes quant à la structure des différentes phases du cycle de ce parasite. Au travers de tous les travaux effectués jusqu'à présent, il est intéressant de souligner l'unité de structure que présente la spore, quelle que soit l'espèce considérée.

ÉTUDE ULTRASTRUCTURALE DU DÉVELOPPEMENT DE LA MICROSPORIDIE *NOSEMA VIVIERI* (V.D. et P. 1970)**

D. VINCKIER, G. DEVAUCHELLE et G. PRENSIER

Laboratoire de Protistologie et Microscopie électronique, Unité de Biologie,
Faculté des Sciences, 59-Lille,
et Laboratoire de Biologie animale,
Faculté des Sciences, 33, rue St-Leu, 80-Amiens (1)

RÉSUMÉ

L'étude ultrastructurale d'une Grégarine monocystidée, nous a permis d'observer le développement d'une Microsporodie hyperparasite : *Nosema vivieri* n. sp. Ainsi, les stades correspondant à la sporogonie ont pu être observés : formes uninucléées, sporoblastes et spores.

Les formes uninucléées, en contact direct avec le cytoplasme de l'hôte sont limitées par une paroi constituée d'une seule membrane unitaire. Le cytoplasme est riche en ribosomes, membranes et vésicules ergastoplasmiques. Parfois on peut rencontrer un amas de petites vésicules assimilable à un appareil de Golgi. Le noyau est souvent excentré.

On peut également trouver des formes en cours de division, celle-ci s'effectuant suivant un type pleuromitose acentriolaire. Ces divisions aboutissent à la formation de « rosettes » d'individus qui s'isolent progressivement pour former les sporoblastes. C'est à ce stade que s'élabore le filament polaire à partir de vésicules golgiennes; il est constitué de 3 zones concentriques.

Ces sporoblastes évoluent en spores qui sont de 2 types : macrospores et microspores. Seules la taille et la forme semblent les différencier, car elles ont la même structure. Elles sont entourées d'une paroi constituée de 3 zones. Le filament polaire, issu du sac polaire, traverse le « cavum » et le polaroplaste vésiculeux et s'enroule autour du noyau. Le cytoplasme est riche en ribosomes et membranes ergastoplasmiques. A la partie postérieure de la spore se trouve la vacuole postérieure.

Bien que présentant quelques caractères originaux, les aspects ultrastructuraux de cette microsporidie sont donc en accord avec les travaux précédents effectués sur d'autres Microsporidies.

SUMMARY

By studying the ultrastructure of a gregarine Monocystidae, the development of a hyperparasitic Microsporidian, *Nosema vivieri* n. sp. has been described. So, the stages of the sporogony were observed: uninucleate cells, sporoblasts and spores.

Vegetative growth of *Nosema vivieri* occurs within the cytoplasm of the host. The uninucleate cells are surrounded with only a "unit membrane". The cytoplasm structure is dominated by profiles of free ribosomes and ergastoplasmic membranes and vesicles. Sometimes an aggregate of small vesicles, classed as a Golgi complex, can be found. The nucleus is often excentric.

After repeated nuclear divisions, the sporoblast mother cell undergoes delayed cytokinesis and a series or a « rosette » of sporoblasts develops. The nuclear division is characterized by the presence of an intact nuclear envelope during the entire process and by the absence of centrioles. In the sporoblast, the polar filament is the first apparent system to develop from the Golgi-like vesicles; it is constituted by 3 concentric zones.

These sporoblasts develop in two types of spores: macrospores and microspores. They have the same structure and only the form and the size seem to distinguish them. They are surrounded with a wall constituted by 3 zones. The polar filament, descended from the polar sac, goes across the "cavum" and the vesicular polaroplast, and coils round the nucleus. In the cytoplasm there are numerous free ribosomes and ergastoplasmic membranes. The "posterior vacuole" is situated at the posterior end of the spore.

Although showing some original characters, the ultrastructural sights of this Microsporidian agree those of the previous studies which have been done on other Microsporidia.

* Manuscrit reçu le 7-2-71.

** Ce travail a bénéficié de l'aide matérielle du Centre de Recherche sur la cellule (Faculté des Sciences de Lille) et du C.N.R.S. (E.R.A., n° 184).

Les premières microsporidies parasites de grégariens ont été décrites par LÉGER et DUBOSCQ (1909) à propos de *Nosema frenzelinae* et de *Perezia lankesteriae*, hyperparasites de *Cephaloidophora conformis* et *Lankesteria ascidia*. Cependant, dès 1897, CAULLERY et MESNIL ont parlé d'un type nouveau d'organismes (*Metchnikovella n. g.*) parasites de grégariens, et ce n'est qu'en 1965 que VIVIER, étudiant l'ultrastructure de la spore de *Metchnikovella hovassei*, parasite de *Lecudina pellucida* établit l'appartenance des *Metchnikovellidae* aux Microsporidies. En 1967, CODREANU, chez une grégarine d'éphémère, CORBEL chez une grégarine de gryllide, puis HILDEBRAND et VIVIER (1970) chez *Lecudina tuzetae*, ont décrit des microsporidies hyperparasites. Déjà en 1908 et 1910, AWERINZEW, étudiant une grégarine parasite de Némertes, avait trouvé dans cette grégarine de curieuses inclusions dont on peut penser qu'il s'agissait d'une microsporidie; nous-mêmes, au cours de recherches sur la cytologie des Sporozoaires, parasites de Némertes, avons rencontré dans une grégarine monocystidée, une microsporidie, *Nosema vivieri* (V. D. et P., 1970) présentant un certain nombre de caractères originaux.

Les premières études ultrastructurales de microsporidies ont surtout porté sur la structure de la spore (HUGER, 1960; KUDO et DANIELS, 1963; LOM et VAVRA, 1963; VAVRA, 1965; ISHIHARA, 1968; SPRAGUE et VERNICK, 1968; SPRAGUE, VERNICK et LLOYD, 1968; STANIER, WOODHOUSE et GRIFFIN, 1968; SCHUBERT, 1969). Cependant quelques travaux portent aussi sur les derniers stades de la sporogénèse (De PUYTORAC, 1962; VAVRA, 1965; VIVIER, 1965; MANIER et MAURAND, 1966; LOM et CORLISS, 1967; SPRAGUE et VERNICK, 1968, 1969; COSTE-MARTHIEZ et MANIER, 1968; HILDEBRAND et VIVIER, 1970). SPRAGUE et VERNICK, 1968; SCHUBERT 1969, VAVRA et UNDEEN 1970, CODREANU et VAVRA 1970, ont fait une étude plus complète du développement des sporontes et des spores, et SPRAGUE, VERNICK et LLOYD, 1968, puis WEIDNER, 1970, ont observé la sporogonie presque complète d'une microsporidie. De même, dans ce travail nous nous proposons d'étudier le développement de la microsporidie *Nosema vivieri*, en insistant sur certains points particuliers du cycle.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel a été récolté à la Station de Biologie Maritime de Wimereux. Les Némertes parasités, ou les grégariens préalablement isolés puis rassemblés au fibrinogène, ont été préparés suivant les techniques classiques de microscopie électronique : fixation au glutaraldéhyde puis post-fixation osmique dans un tampon phosphate, déshydratation à l'acétone et inclusion à l'araldite. Les coupes effectuées à l'ultramicrotome Porter-Blum sont recueillies sur grilles parlodionnées ou non, contrastées à l'acétate d'urane alcoolique et au

citrate de Plomb (REYNOLDS), puis examinées aux microscopes « Siemens Elmiskop I A » et « Hitachi HU 11 E ».

OBSERVATIONS

L'observation des coupes de grégariens parasités montre surtout un certain nombre de stades correspondant à la sporogonie de la microsporidie : formes uninucléées, binucléées, sporoblastes et spores. Ces différents stades semblent d'ailleurs être plus ou moins répartis indifféremment dans la partie médiane de l'hôte; dans une grégarine on rencontre le plus souvent les différents stades, les spores étant généralement en plus grand nombre (fig. 1).

Les formes uninucléées

En contact direct avec le cytoplasme de l'hôte, elles sont limitées par une paroi constituée d'une seule membrane unitaire (fig. 2). De taille variable, allant de 2 à 3,5 μ de long sur 1,5 à 3 μ de large, elles sont de forme plus ou moins ovoïde, le contour étant cependant assez irrégulier. Le cytoplasme, pauvre en inclusions, est riche en ribosomes; souvent des membranes ergastoplasmiques sont disposées en lignes concentriques autour du noyau alors qu'un reticulum lisse, parfois dilaté, peut former des vacuoles (fig. 2). On peut parfois rencontrer dans le cytoplasme un amas de petites vésicules à contenu relativement dense et opaque aux électrons, assimilable à un appareil de Golgi très primitif; ce golgi est d'ailleurs bien visible dans les stades plus âgés (fig. 6).

Il ne semble pas y avoir de grains de réserves et nous n'avons jamais observé de mitochondries, ce qui paraît être typique chez les Microsporidies en général. Le noyau assez volumineux et toujours excentré montre une enveloppe nucléaire typique et un nucléoplasme homogène, sans nucléole ni chromatine nettement différenciée (fig. 2); il ne semble pas y avoir de centrosome typique. Les formes uninucléées semblent toujours plus ou moins isolées au sein du cytoplasme de l'hôte.

Phase de multiplication des sporontes

A côté des formes uninucléées, nous avons souvent rencontré des formes en cours de division, correspondant à une phase de multiplication des futurs sporoblastes. Ces divisions s'effectuent suivant un type pleuromitose acentriolaire : le fuseau, formé de microtubules de 150 Å de diamètre environ, traverse tout le noyau et vient s'insérer sur une zone épaissie de l'enveloppe nucléaire qui semble d'ailleurs s'estomper à cet endroit (fig. 3 et

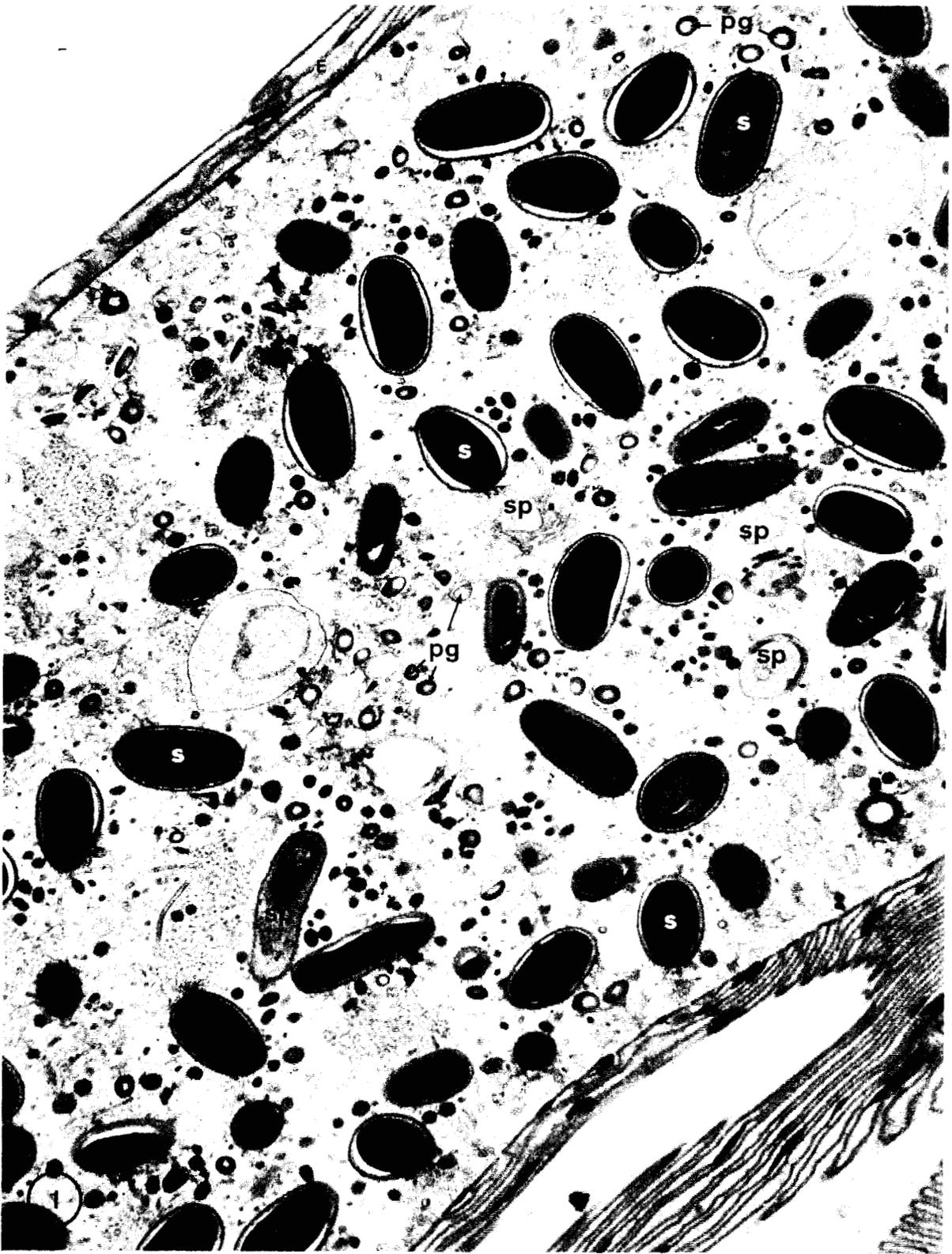


FIG. 1. — Coupe transversale de la Grégarine montrant l'épicyte (E) plissé et dans le cytoplasme les grains de paraglycogène (pg). On voit également la Microsporidie à différents stades : sporoblaste (SP) et spore (S) ($\times 8\ 700$).



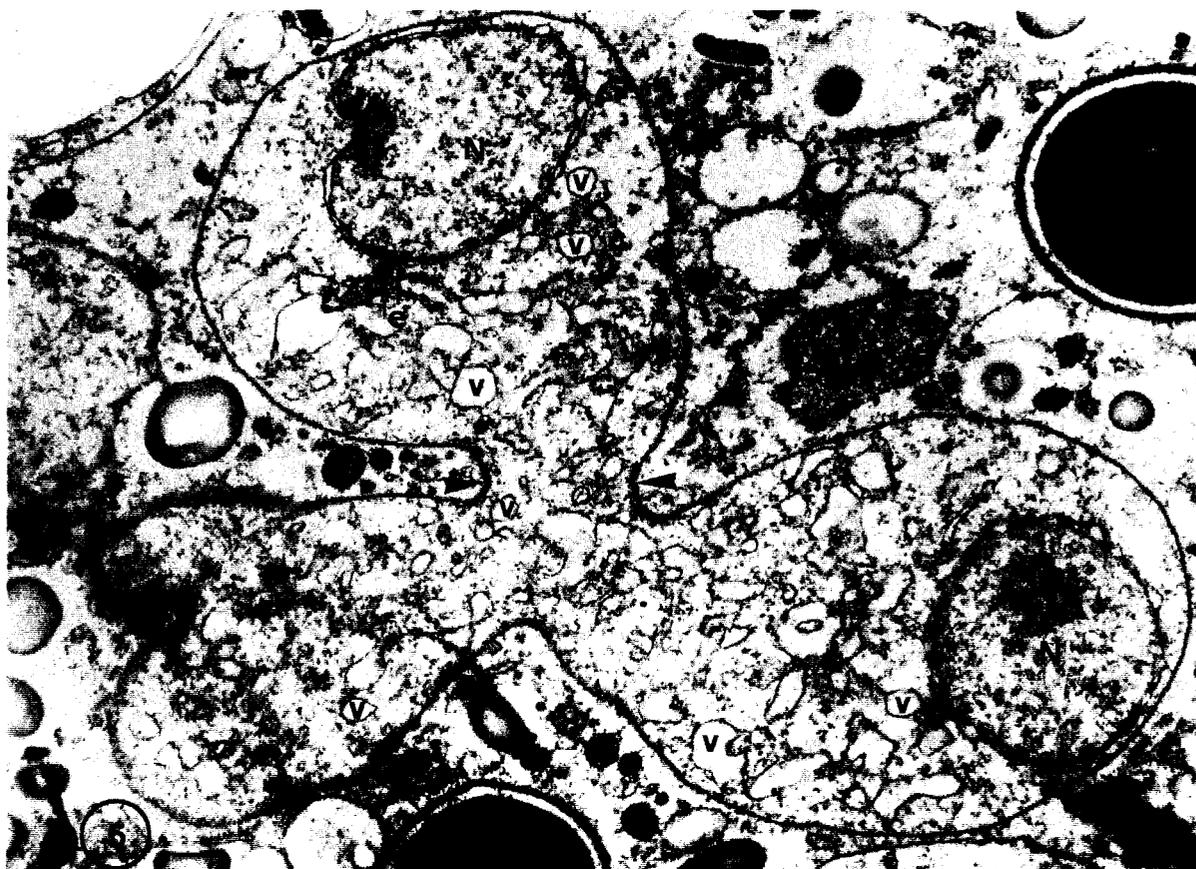


Fig. 5. — Forme multinucléée : le plan de coupe passe par au moins 3 futurs sporoblastes et par le noyau (N) de 2 d'entre eux. La cytotodiérèse semble se faire par «étranglement» (flèches). On notera la présence d'ergastoplasme (e) et de nombreuses vésicules (V) ($\times 25\ 700$).

4). A ce niveau, l'enveloppe du noyau s'invagine et les fibres fusoriales semblent entraîner vers le centre du noyau la paroi sur laquelle elles s'insèrent, paroi qui persiste pendant toute la durée de la division. Au sein du nucléoplasme, et disposés le long des fibres fusoriales on peut observer quelques amas vraisemblablement chromatiniens (fig. 3 et 4).

Ainsi pendant cette phase de multiplication, on peut rencontrer des formes binucléées, les deux noyaux pouvant être de nouveau et simultanément en cours de division (fig. 4). Cependant nous n'avons pas encore observé de sporonte possédant un diplocaryon, c'est-à-dire deux noyaux étroitement accolés, tel que l'ont décrit VAVRA (1965), COSTE-MATHIEZ et MANIER (1967), SPRAGUE, VERNICK et LLOYD (1968), SPRAGUE et VERNICK (1969), WEIDNER (1970), VAVRA et UNDEEN (1970).

Le sporonte se divise donc plusieurs fois avant de se transformer en sporoblaste, mais il n'est pas encore possible de préciser le nombre de divisions successives que subissent ces noyaux. Lors de ces divisions, il est intéressant de noter que la caryocinèse précède toujours la cytotodiérèse, ce qui aboutit à la formation de figures lobées polynucléées dans lesquelles on reconnaît déjà les futurs sporoblastes (fig. 5). La cytotodiérèse se fait par étranglement : la membrane cellulaire s'invagine et semble s'épaissir à ce niveau, les deux invaginations allant à la rencontre l'une de l'autre (fig. 4); ces divisions, qui se font dans n'importe quel plan de l'espace, avec décalage entre caryocinèse et cytotodiérèse, aboutissent à la formation de « rosettes » ou de groupes d'individus apparemment uninucléés (fig. 6, 7, 8). En s'isolant progressivement, ces sporoblastes laissent entre eux des

Fig. 2. — Une forme uninucléée avec son noyau (N) en début de division (les fibres fusoriales sont indiquées par des flèches) entourées de deux membranes unitaires et dans le cytoplasme quelques lames d'ergastoplasme (e) ($\times 26\ 000$).

Fig. 3. — Le fuseau de division d'un noyau (N) avec les fibres fusoriales (f) s'insèrent sur la membrane nucléaire (flèches) et les amas chromatiniens (c) ($\times 41\ 000$).

Fig. 4. — Une forme binucléée avec ses deux noyaux (N) en cours de division. Dans les noyaux on voit les fibres du fuseau (f) et des amas chromatiniens (c). Une flèche indique le point d'insertion des fibres fusoriales sur la membrane nucléaire ($\times 38\ 000$).

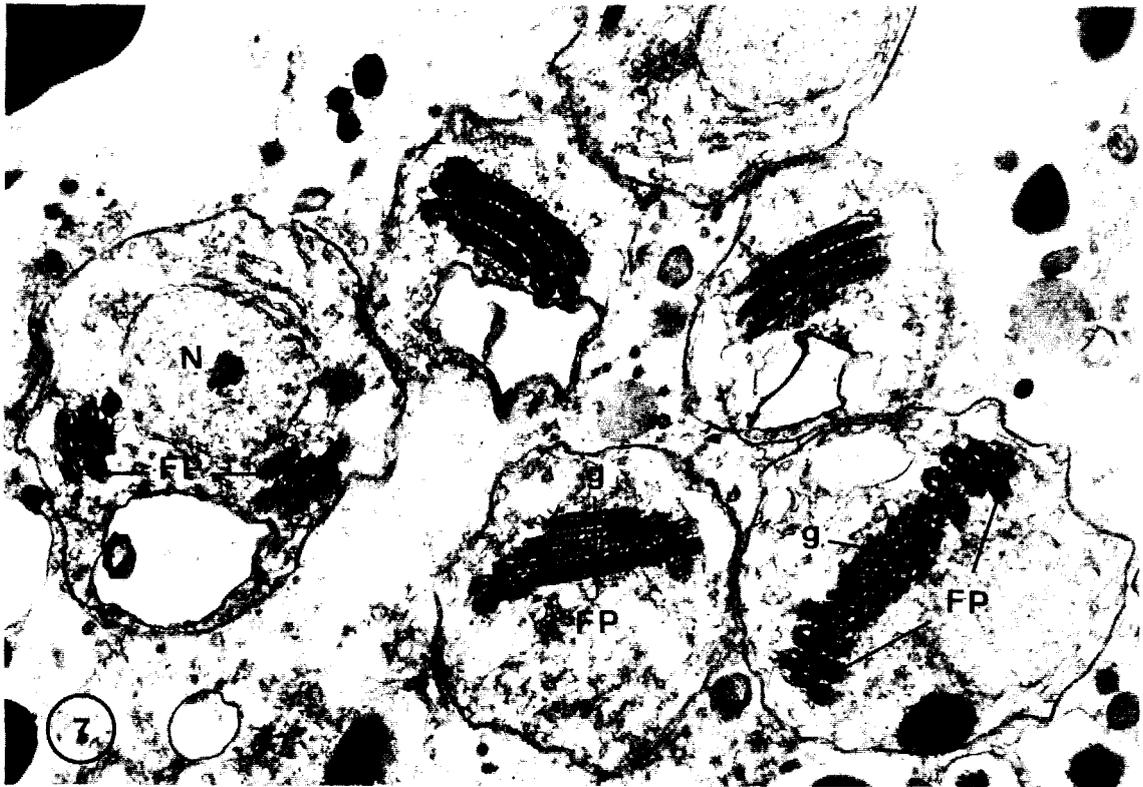
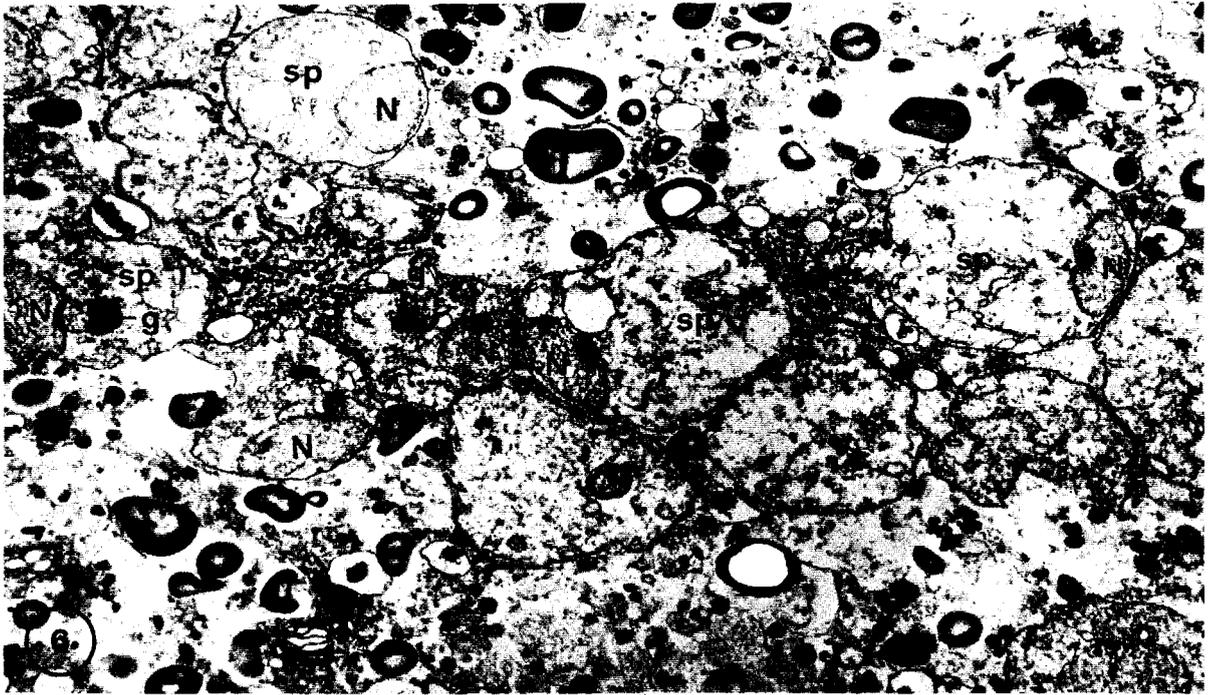


FIG. 6. — Jeunes sporoblastes (sp) disposés en file ou en « rosette » avec entre eux des formations vésiculaires (flèches); dans certains on voit le noyau (N) et les vésicules golgiennes (g) ($\times 30\,400$).

FIG. 7. — Sporoblastes plus âgés avec le noyau (N) et les vésicules golgiennes (g) élaborant le filament polaire (FP) ($\times 22\,000$).

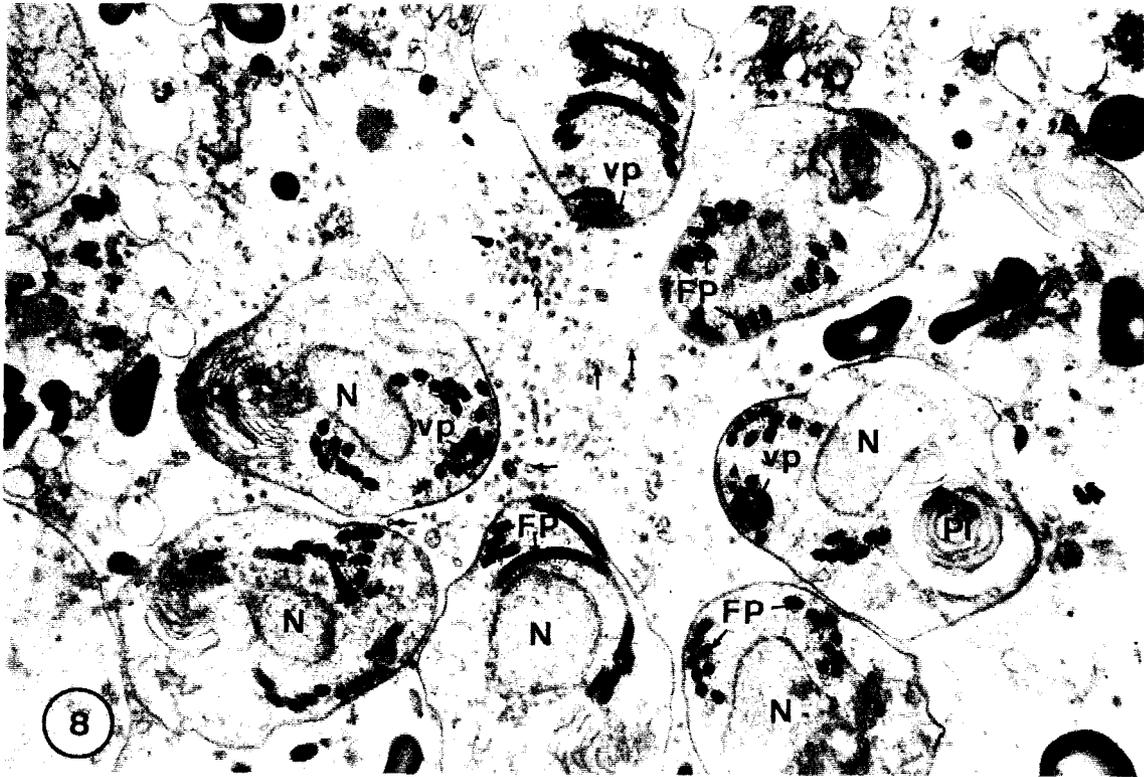


FIG. 8. — Sporoblastes où le filament polaire (FP) est élaboré et apparition du polaroplaste lamellaire (Pl) et de la vacuole postérieure (vp). Tous les sporoblastes de la « rosette » sont au même stade de développement, avec, entre eux, des formations vésiculaires (flèches) ($\times 16\ 000$).

formations plus ou moins vésiculaires à paroi mince (fig. 6 et 8). C'est à ce stade que commence à s'élaborer le filament polaire (fig. 6, 7 et 8).

Les Sporoblastes

Une fois bien individualisés, les sporoblastes peuvent se disperser dans le cytoplasme de l'hôte, ou rester groupés. Dans ce cas, il est intéressant de noter que tous les individus semblent être au même stade de développement (fig. 6, 7, 8); il y aurait donc un synchronisme dans le développement des sporoblastes d'un même groupe.

Dans les jeunes sporoblastes on rencontre, près du noyau le plus souvent, un groupe de vésicules à contenu légèrement opaque aux électrons et assimilable selon VAVRA (1965) à un appareil de Golgi (fig. 6). Ces vésicules paraissent être à l'origine du filament polaire (1).

Le filament polaire semble se former par coalescence des vésicules golgiennes (fig. 9, 10 et 11). Tout d'abord, au contact du golgi, apparaît une zone relativement dense limitée par une membrane et se trouvant toujours dans une légère dépression du noyau (fig. 9); cette zone est

à l'origine du sac polaire où viendra s'insérer le filament (fig. 10). Ce dernier, également d'origine golgienne semble se former par coalescence des petites vésicules qui se disposent en manchon cylindrique englobant la zone centrale dense du filament (fig. 7, 10 et 11); à ce stade, le filament polaire présente donc 3 zones concentriques : une zone externe opaque aux électrons, en-dessous une zone claire, et un centre dense (fig. 10 et 11). En ce qui concerne l'insertion du filament sur le sac polaire (fig. 10), nos observations ne nous permettent pas encore de préciser exactement la structure de cette jonction.

Le sac polaire va ensuite s'aplatir et prendre la forme d'une « ancre » tandis qu'une structure nouvelle, le polaroplaste se différencie (fig. 8 et 12); ce dernier semble constitué de 2 parties : le polaroplaste lamellaire et le polaroplaste vésiculeux. Le polaroplaste lamellaire est constitué par un « empilement » de membranes qui viennent se placer sous le sac polaire et englobent le départ du filament (fig. 12); cet empilement, qui est lâche au début, se resserre de plus en plus au fur et à mesure de l'évolution du sporoblaste (fig. 13) pour aboutir dans la spore à une structure lamellaire compacte correspondant au « cavum » décrit par SPRAGUE, VERNICK et LLOYD, 1968 (fig. 15, 16 et 17). Simultanément à cette différenciation, apparaît entre le noyau et le polaroplaste lamellaire, et plus ou moins englobé par ce dernier, un amas de petites vésicules constituant le polaroplaste vésiculeux (fig. 12, 13, 16).

(1) L'origine et la formation détaillée du filament polaire feront l'objet d'un prochain travail.

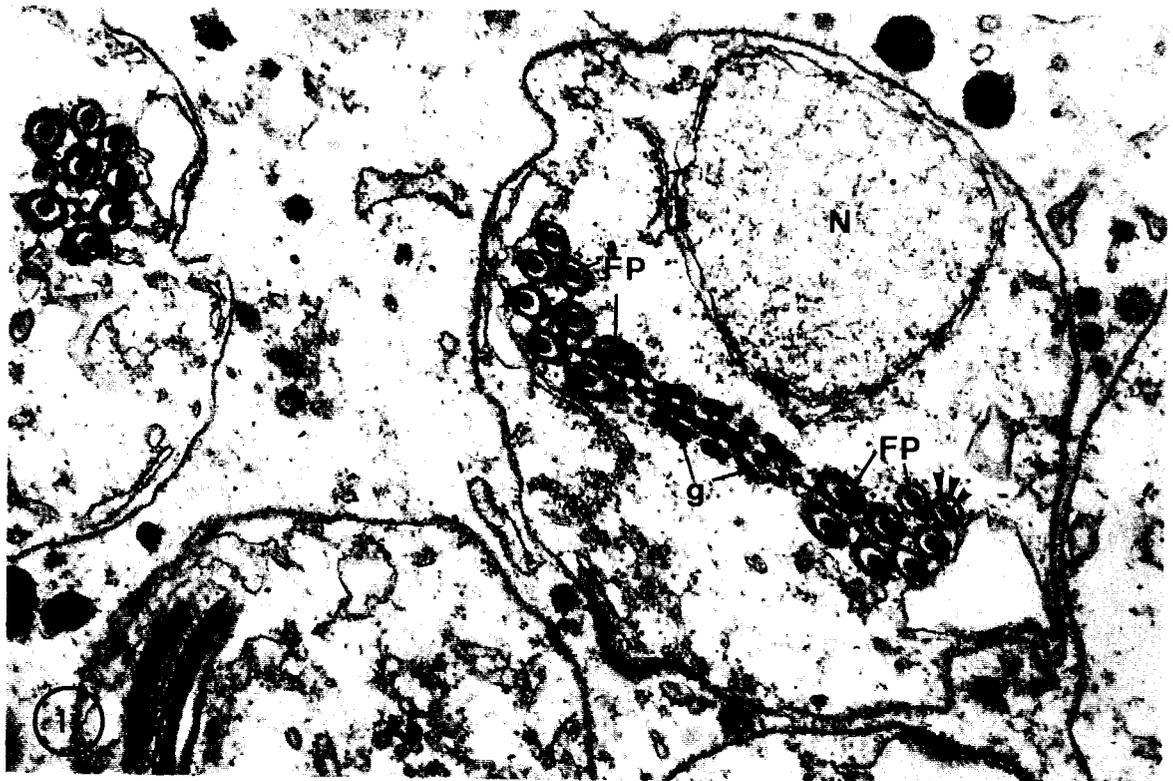




FIG. 12. — Formation, entre le sac polaire (spo) et le noyau (N) du polaroplaste lamellaire (PI) et du polaroplaste vésiculeux (Pv) ($\times 32\ 800$).



FIG. 13. — Sporoblaste à un stade avancé. La paroi (P) commence à s'épaissir. Le polaroplaste lamellaire (PI) devient plus compact et formera le « cavum »; ce dernier englobe le polaroplaste vésiculeux (Pv). Le filament polaire (FP) s'enroule autour du noyau (N) ($\times 35\ 800$).

En même temps que se différencie le polaroplaste, apparaît au pôle opposé du sporoblaste, la « vacuole postérieure » opaque aux électrons, décrite par SPRAGUE, VERNICK et LLOYD (1968), et retrouvée chez d'autres espèces (SPRAGUE et VERNICK, 1969 et SCHUBERT, 1969) (fig. 8, 15 et 16). Si elle semble morcelée dans le sporoblaste (fig. 8), elle devient unique dans la spore (fig. 15 et 16).

Les spores

En fin d'évolution, la paroi du sporoblaste commence à s'épaissir : une couche dense vient s'apposer sur la face externe de la membrane cytoplasmique (fig. 13). Puis lors de la transformation en spore, une zone plus claire vient s'insérer entre cette zone dense et la membrane du sporoblaste (fig. 15, 16, 17 et 18). Ainsi la

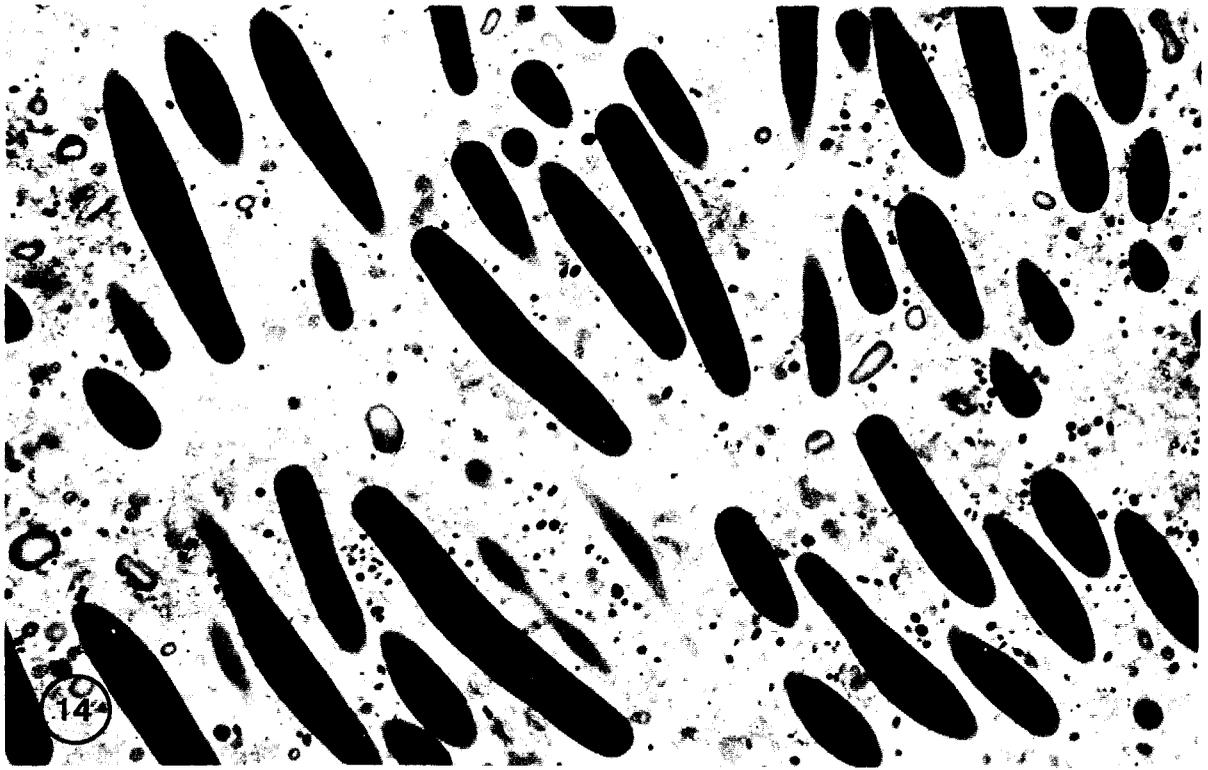
paroi de la spore est constituée de 3 parties : une zone externe sombre d'environ 450 Å d'épaisseur, puis une zone claire de 300 Å et la membrane cytoplasmique (fig. 15, 16, 17, 18). Comme cela a déjà été signalé chez les Microsporidies, pour une même espèce, nous avons trouvé ici des spores de taille très différente : des macrospores et des microspores. Les macrospores, très allongées mesurent environ 6 μ de long sur 0,7 μ de large (fig. 14 et 15). Les microspores, de forme ovoïde ont un grand et un petit diamètre atteignant respectivement 2,7 μ et 1,2 μ . Les macrospores et les microspores semblent avoir la même structure.

Le filament polaire qui mesure 850 à 900 Å de diamètre, s'insère à la partie supérieure au niveau du sac polaire, puis descend suivant le grand axe et vient s'enrouler, à la sortie de la zone délimitée par le polaroplaste lamellaire, autour du noyau situé dans la partie postérieure de la spore. Sous le sac polaire le polaroplaste lamellaire, devenu plus compact et ayant environ

FIG. 9. — Formation, sous le noyau (N), du sac polaire (spo) à partir des vésicules golgiennes (g) ($\times 25\ 000$).

FIG. 10. — Vue montrant le sac polaire (spo) avec le départ du filament polaire (FP); celui-ci est constitué de 3 zones (flèches) ($\times 60\ 000$).

FIG. 11. — Formation du filament polaire (FP) à partir des vésicules golgiennes (g). Le filament polaire est constitué de 3 zones concentriques (flèches) ($\times 40\ 200$).



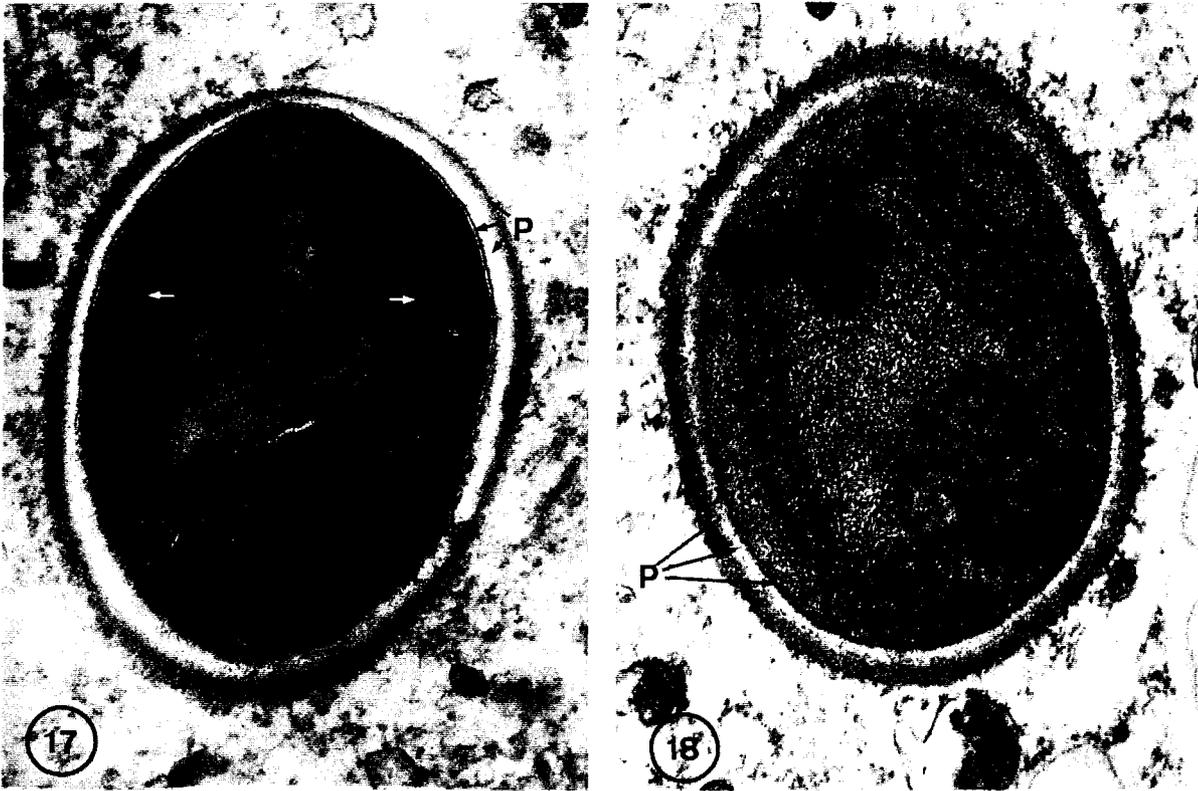


FIG. 17. — Coupe oblique dans une microspore montrant l'enroulement hélicoïdal du filament polaire (FP); celui-ci, issu du sac polaire (spo), avant de s'enrouler, traverse les polaroplastes lamellaires (Pl) et vésiculeux (Pv) ($\times 55\ 400$).

FIG. 18. — Coupe oblique dans la partie postérieure d'une microspore montrant le filament polaire (FP) et des membranes ergastoplasmiques (e) ($\times 66\ 800$).

0,1 μ d'épaisseur prend une forme de cloche entourant la moitié antérieure du cytoplasme y compris le polaroplaste vésiculeux (fig. 16 et 17). Presque la totalité du filament polaire se trouve donc dans la moitié postérieure de la microspore et dans la partie médiane de la macrospore; le cytoplasme y apparaît constitué exclusivement de membranes ergastoplasmiques et de ribosomes (fig. 15 et 18); on n'y distingue jamais ni appareil de Golgi ni mitochondries. A l'extrémité postérieure de la spore se trouve « la vacuole postérieure ».

DISCUSSION

D'après les différentes phases du cycle de cette microsporidie, celle-ci semble donc bien être une Nosematidae

du genre *Nosema* : il n'y a pas de pansporoblastes formant plusieurs spores, mais un seul sporoblaste qui donne toujours une seule spore; celle-ci, pouvant être de 2 types, microspore ovoïde ou macrospore très allongée, n'est pourvue que d'un seul filament polaire. Sa taille étant plus grande que chez *Nosema frenzelinae* et l'hôte étant ici une grégarine Monocystidée, il s'agit bien d'une espèce différente de celle-ci.

Dans l'ensemble, les aspects ultrastructuraux que nous avons envisagés ici sont en accord avec les travaux précédents effectués sur *Nosema spelotremae* par STANIER et coll. [54], sur *Nosema sp.* par SPRAGUE et coll. [52], sur *Nosema nelsoni* et *Glugea sp.*, par SPRAGUE et VERNICK [51, 49], sur plusieurs espèces du genre *Thelohania*, *Plistophora* ou *Mrazekia*, sur *Caudospora simulii* et sur *Nosema algerae* par VAVRA [56, 58, 59, 60], sur *Mrazekia lumbriculi* par de PUYTORAC [38, 39], sur *Metchnikovella hovassei* par VIVIER [63, 64], sur *Metchnikovella*

FIG. 14. — Les macrospores : vue d'ensemble ($\times 5\ 300$).

FIG. 15 et 16. — Coupe longitudinale d'une macrospore et d'une microspore. La paroi (P) est constituée de 3 zones. Le polaroplaste lamellaire (Pl) ou « cavum » devenu compact, a la forme d'une cloche, dans laquelle se trouve le polaroplaste vésiculeux (Pv) et où passe le filament polaire (FP). A l'extrémité postérieure se trouve la vacuole postérieure (vp). Dans le cytoplasme, des membranes ergastoplasmiques (e) ($\times 24\ 000$ et $\times 33\ 000$).

wohlfarthi par HILDEBRAND et VIVIER [18], sur *Plistophora simulii* par MAURAND [33] sur *Nosema orthodadii* par COSTE-MATHIEZ et MANIER [12], sur *Heterosporis finki* par SCHUBERT [43, 44], sur *Thelohania trichostegiae*, *Thelohania bicortex* et *Congourdella rhyacophilae* par BAUDOIN [3], sur *Nosema sp.* par WEIDNER [66] et sur *Telomyxa gluceiformis* par CODREANU et VAVRA [10]. Cependant quelques particularités méritent d'être soulignées : l'existence d'une paroi formée par une seule membrane unitaire en contact direct avec le cytoplasme de l'hôte, la structure du filament polaire qui, lors de sa formation, possède un diamètre plus grand que dans la spore, et l'existence de 2 types de spores.

En effet, chez *Nosema vivieri*, pendant une grande partie de la sporogonie, la cellule n'est limitée que par une paroi constituée de la seule membrane unitaire; celle-ci est en contact direct avec le cytoplasme de l'hôte et sans aucune relation avec lui contrairement à d'autres Nosematidae dont la cellule se trouve dans une vacuole (observations personnelles); cette paroi ne commence à s'épaissir que chez les sporoblastes âgés, en fin d'évolution. Chez *Nosema algerae* [60], dès les plus jeunes stades, une couche dense de matériel amorphe recouvre la membrane unitaire; il en est de même chez *Nosema sp.* [52] où le sporoblaste est recouvert d'une pellicule extramembranaire dense avec des microtubules disposés perpendiculairement à la surface du parasite; chez *Glugea sp.* [49], la membrane de la future « vacuole de sporogénèse » entoure tout le parasite, ceci étant caractéristique des stades de plasmodes; de même chez les *Metchnikovellidae* [18, 63, 64], les sporoblastes se trouvent dans une « vacuole parasitaire » considérée comme pansporoblaste.

Chez diverses Nosematidae, notamment chez *Nosema sp.* [52], *Nosema nelsoni* [51], et *Nosema algerae* [60], les auteurs ont observé après la forme uninucléée, un stade à « diplocaryon », c'est-à-dire à 2 noyaux accolés; chez *Nosema vivieri*, nous n'avons pas observé ce « diplocaryon », mais seule la technique des coupes sériées pourrait peut-être nous donner des précisions sur ce point.

Nous n'avons pas observé les tubules que VAVRA [56] et BAUDOIN [3] ont rencontré dans le pansporoblaste du genre *Thelohania*. Cependant il faut remarquer les petites vésicules se trouvant entre les sporoblastes issus des divisions, d'une même forme uninucléée; ces vésicules se formeraient lors de la cytodierèse précédant l'individualisation de ces sporoblastes. Il est également intéressant de noter que ces derniers ont un stade de développement identique pour les individus d'une même « rosette », c'est-à-dire issus d'un même sporonte et il y aura d'ailleurs synchronisme dans leur évolution ultérieure.

Un autre phénomène important est la diminution de diamètre du filament polaire; lors de sa formation, à partir des vésicules golgiennes, dans le jeune sporoblaste, il possède un diamètre d'environ 1 100 Å, diamètre qui, dans la spore ne fait plus que 900 Å. D'après nos observations, ce filament polaire acquiert son diamètre définitif, celui qu'il aura dans la spore, lorsque le polaroplaste lamellaire se forme. Cependant, il est probable que, comme VAVRA l'avait déjà supposé dès 1965 [56], le filament polaire et même les polaroplastes

lamellaire et vésiculeux tirent leur origine d'une structure identique à l'appareil de Golgi.

Dans les formes uninucléées, nous avons observé des lames d'ergastoplasme que nous avons retrouvées dans les spores. Il est intéressant de noter à ce propos, l'analogie qui existe entre la formation des sporoblastes et l'origine du Golgi, et la formation et l'évolution des spermatides d'Oligochètes, notamment d'*Eisenia foetida* [53]; par exemple la figure 5 rappelle le « bourgeonnement » d'une spermatide à partir du cytophore, et la disposition en « rosette » des sporoblastes ressemble à celle des spermatides autour du cytophore central.

Il semble que la structure de la spore, microspore ou macrospore, varie peu d'une espèce à une autre. La paroi comprend donc la membrane cytoplasmique et une zone dense externe séparées par une zone claire. Le cytoplasme de la spore semble divisé en 2 parties, une partie antérieure, comprenant le sac polaire et le polaroplaste lamellaire ou « cavum » qui englobe le polaroplaste vésiculeux, et une partie postérieure où le filament polaire s'enroule, en hélice autour du noyau; ce cytoplasme est riche en ribosomes et membranes ergastoplasmiques, surtout dans la macrospore. A l'extrémité de la spore, se trouve la vacuole postérieure, déjà décrite par divers auteurs, et dont le rôle est inconnu. Le rôle du « cavum » est également inconnu mais peut-être sert-il de charpente au filament polaire. Mais le point particulier intéressant est l'existence, dans cette même espèce, de spores de taille différente: les microspores et les macrospores. Il ne nous est pas encore possible de donner une explication à ce phénomène qui a déjà été signalé chez d'autres Microsporidies. Ainsi chez *Thelohania ovata* et *Plistophora chrenbaumi* [36], les auteurs pensent que le polymorphisme des spores est en rapport avec une différenciation plus ou moins précoce des sporoblastes dans le pansporoblaste : en effet les pansporoblastes tétrasporés donnent de plus grandes spores que les pansporoblastes octosporés ou polysporés; mais ici cette explication n'est plus valable, chaque pansporoblaste ne donnant qu'un seul sporoblaste, ce dernier ne donnant qu'une seule spore. Chez *Glugea danilewskyi* et *Plistophora bufonis*, il y aurait une double sporogénèse, l'une macronucléée, l'autre micronucléée; celle-ci serait de nature parthenogénétique. Mais chez *Nosema vivieri*, les microspores sont beaucoup plus nombreuses que les macrospores et ce sont celles que l'on trouve communément, tandis que nous n'avons trouvé les macrospores que dans quelques cas seulement; les microspores semblent donc être ici le résultat normal de la sporogénèse.

Il apparaît donc que l'étude ultrastructurale du développement des Microsporidies apporte des données intéressantes quant à la sporogonie de ces parasites. Au travers de tous les travaux faits jusqu'à présent, il est remarquable de constater l'unité de structure que présente la spore, quelle que soit l'espèce considérée. Et même s'il existe des différences quant à l'interprétation des différents stades, c'est que l'ultrastructure des Microsporidies est encore mal connue; et avec le développement des recherches en ce sens, il faudra probablement aussi reconsidérer la taxonomie de ces parasites qui jusqu'alors était uniquement basée sur ces données de la microscopie photonique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AWERINZEW (1908). — Über die Gregarinen aus dem Darne von *Amphiporus* sp. *Zool. Anz.*, 33, p. 685-687.
- [2] AWERINZEW (1909). — Studien über parasitische Protozoen. III. Beobachtungen über die Vorgänge der Schizogonie bei gregarinen aus dem Darne von *Amphiporus* sp. *Arch. f. Protistenk.*, 16, p. 71-80.
- [3] BAUDOIN J. (1969). — Nouvelles espèces de Microsporidies chez des larves de Trichoptères. *Protistologica*, 3, p. 441-446.
- [4] CALI A. (1970). — Morphogenesis in the genus *Nosema*. 3rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, College Park, Maryland, August 1970.
- [5] CAULLERY M. et MESNIL F. (1897). — Sur un type nouveau (*Metchnikovella* n. g.) d'organismes parasites des Grégarines. *C.R. Soc. Biol.*, 10^e sér., 4, p. 960-962.
- [6] CAULLERY M. et MESNIL F. (1919). — *Metchnikovellidae* et autres Protistes parasites des Grégarines d'Annélides. *Ann. Inst. Pasteur*, 33^e année, 4, p. 32.
- [7] CODREANU R. (1960). — Electron microscope study on the cytology of a microsporidian spore by means of ultrathin sectioning. *J. Insect. Pathol.*, 2, p. 84-105.
- [8] CODREANU R. (1967). — Sur une microsporidie nouvelle hyperparasite d'une grégarine du genre *Enterocystis* et le statut systématique de la famille des *Enterocystidae* *Margareta* Codreanu 1940, propres aux Ephémères. *Protistologica*, III, fasc. 3, p. 351.
- [9] CODREANU R., POPA A.I. et VOICULESCU R. (1965). — Données sur l'ultrastructure des spores de microsporidies. *Bull. Apicole*, 8, p. 5-16.
- [10] CODREANU R. and VAVRA J. (1970). — The structure and ultrastructure of the Microsporidian *Telomyxa glugeiformis* Leger and Hesse, 1910, parasite of *Ephemera danica* (Müll) nymphs. *J. Protozoology*, 17 (3), p. 374-384.
- [11] CORBEL J.C. (1967). — *Metchnikovella martojai* n. sp. (microsporidie, *metchnikovellidae*) parasite d'une grégarine de gryllide. *Protistologica*, III, fasc. 4, p. 365-68.
- [12] COSTE-MATHIEZ F. et MANIER J.F. (1968). — *Nosema orthodadii* n. sp. (Microsporidian - *Nosematidae*) parasite of *Orthocladus lignicola* larvae (*Diptera-Chironomidae*). *Bulletin de la Soc. Zool. de France*, 93, n° 1, p. 127-133.
- [13] DAVENPORT R. (1968). — A consideration of the chemical nature of the polaroplast of *Nosema* sp. in the musculature of *Callinectes sapidus*. *N.R.I. ref. No.* 68-57.
- [14] ERICKSON B. and SPRAGUE V. (1970). — Summary of the contributions of cytochemical reactions to our knowledge of Microsporidian spores. 3rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, College Park, Maryland.
- [15] ERICKSON B.W., J.R. VERNICK S.H. et SPRAGUE V. (1967). — Observations on spores of *Glugea* sp. using shadow casting and electron microscopy. *Amer. Zool.*, 7, p. 777-778.
- [16] ERICKSON B.W., J.R., VERNICK S.H. et SPRAGUE V. (1968). — Electron microscope study of the everted polar filament of *Glugea weissenbergi* (*Microsporida, Nosematidae*). *J. Protozool.*, 15 (4), p. 758-761.
- [17] HAZARD E.I. (1970). — Schizogony, Sporogony and Spores of *Thelohania* in Mosquitoes: the characteristic stages in the Male Larvae and the Stempellia-like development in the Adult Female. 3rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, College Park, Maryland, August 1970.
- [18] HILDEBRAND H. et VIVIER E. (1970). — Observations ultrastructurales sur le sporoblaste de *Metchnikovella wohlfarthi* n. sp. (Microsporidies) parasite de la grégarine *Lecudina tuzetae*. *Protistologica* 1971, t. VII, fasc. 1, p. 131-139.
- [19] HUGER A. (1960). — Electron microscope study on the cytology of a microsporidian spore by means of ultrathin sectioning. *J. Insect. Pathol.*, 2, p. 84-105.
- [20] HUGER A. (1960). — Elektronenmikroskopische analyse der innenstruktur von mikrosporidiensporen. *Naturwissenschaften*, 47, p. 68-70.
- [21] HUGER A. (1961). — Sporentierchen als insektenfeinde I. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über bau- und lebensweise der Mikrosporidien. *Umschau*, 9, p. 270-272.
- [22] ISHIHARA R. (1968). — Some observations on the fine structure of sporoplasm discharged from spores of a microsporidian, *Nosema bombycis*. *J. Invert. Pathol.*, 11, p. 377-385.
- [23] ISHIHARA R. et HAYASHI T. (1968). — Some properties of ribosomes from the sporoplasm of *Nosema bombycis*. *J. Invert. Pathol.*, 11, p. 377-385.
- [24] KUDO R. et DANIELS E. (1963). — An electron microscope study of the spore of a microsporidian, *Thelohania californica*. *J. Protozool.*, 10, p. 112-120.
- [25] LÉGER L. et DUBOSCQ D. (1909). — Sur une microsporidie parasite d'une grégarine. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 138, p. 733-734.
- [26] LÉGER L. et DUBOSCQ D. (1909). — *Perezia lankesteriae* n. g. n. sp., microsporidie parasite de *Lankesteria ascidia*, Ray Lank. *Arch. Zool. exp. gén.*, 5^e série, 1, N. et R. n° 3, p. 5.
- [27] LÉGER L. et HESSE E. (1916). — Sur la structure de la spore des microsporidies. *C.R. Soc. Biol.*, 79, p. 1049-1053.
- [28] LOM J. (1970). — Comments on sporoblast development in Microsporidia. 3rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, College Park, Maryland, August 1970.

- [29] LOM J. et CORLISS J.O. (1967). — Ultrastructural observations on the development of the microsporidian protozoon *Plistophora hypheobryconis* Schaperclaus. *J. Protézool.*, 14, p. 141-152.
- [30] LOM J. et VAVRA J. (1962). — Contribution to the knowledge of microsporidian spore. I. Electron microscopic observation. *Progress in Protozoology, Trans. of the 1st Int. Conf. of Protozool.*, Praha 1961.
- [31] LOM J. et VAVRA J. (1963). — Contributions to the knowledge of microsporidian spores. *Progress in Protozoology, Proc. I. Int. Conf. Protozool.*, Prague 1961, p. 487-489.
- [32] MANIER J.F. et MAURAND J. (1966). — Sporogonie de deux microsporidies de larves de *Simulium*: *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913) et *Plistophora simulii* (Lutz et Splendore, 1904). *J. Protozool.*, 13 (Suppl. 39).
- [33] MAURAND J. (1966). — *Plistophora simulii* (Lutz et Splendore, 1904), Microsporidie parasite des larves de *Simulium*: cycle, ultrastructure, ses rapports avec *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913). *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 91, n° 4, p. 621.
- [34] OHSHIMA K. (1970). — On the autogamy of nuclei and the spore formation of *Nosema bombycis*. *3rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology*, College Park, Maryland, August 1970.
- [35] PETRI M. et SCHIDT T. (1966). — On the ultrastructure of *Nosema cuniculi* in the cells of Yoshida rat ascites sarcoma. *Acta Pathol. Microbiol. Scandinav.*, 66, p. 437-446.
- [36] POISSON R. (1953). — Sous-Embranchement des Cnidosporidies, Ordre des Microsporidies. *Traité de Zoologie*, par P.P. Grassé, I, fasc. II, p. 1042-1070.
- [37] POPA A., CODREANU R., VOICULESCU R., JONESCU M., PETROVICI A., SERBAN M. et CRISAN J. (1967). Contribution à l'étude de l'ultrastructure des spores de *Nosema apis* Z. *Bull. Apicole*, 9, p. 5-8.
- [38] PUYTORAC P. De (1961). — L'ultrastructure du filament polaire invaginé de la Microsporidie *Mrazekia lumbriculi* Jirovec, 1936. *C.R. Acad. Sci.*, 253, p. 2600-2602.
- [39] PUYTORAC P. De (1962). — Observations sur l'ultrastructure de la microsporidie *Mrazekia lumbriculi* Jirovec. *J. Microscopie*, 1, p. 39-46.
- [40] PUYTORAC P. De et TOURET M. (1963). — Etude de kystes d'origine parasitaire (microsporidies ou grégarines) sur la paroi interne du corps des vers *Megascolecidae*. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 38, p. 861-874.
- [41] RICHARDS C.S. and SHEFFIELD H.G. (1970). — Unique host relations and ultrastructure of a new microsporidian of the genus *Coccospora* infecting *Biomphalaria glabrata*. *3rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology*, College Park, Maryland, August 1970.
- [42] SCHOLTYSECK E. et DANEEL R. (1962). — Über die Feinstruktur der Spore von *Nosema apis*. *Deutsch. Entomol. Zeitschrift*, 9, p. 471-476.
- [43] SCHUBERT G. (1969). — Ultracytologische Untersuchungen an der Spore der Mikrosporidienart, *Heterosporis finki*, gen. n., sp. n. *Z. Parasitenk.*, 32, p. 59-79.
- [44] SCHUBERT G. (1969). — Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Sporonten- und Sporenentwicklung der Mikrosporidienart *Heterosporis finki*. *Z. Parasitenk.*, 32, p. 80-92.
- [45] SPRAGUE V. (1964). — *Nosema dollfusi* n. sp. (*Microsporidia, Nosematidae*), a hyperparasite of *Bucephalus cuculus* in *Crassostrea virginica*. *J. Protozool.*, 11, p. 381-385.
- [46] SPRAGUE V. (1965). — *Nosema* sp. (*Microsporida, Nosematidae*) in the musculature of the crab *Callinectes sapidus*. *J. Protozool.*, 12, p. 66-70.
- [47] SPRAGUE V. (1970). — Taxonomy of *Microsporidia*. *2nd International Congress of Parasitology, The Journal of Parasitology*, 56, n° 4, p. 327.
- [48] SPRAGUE V. et VERNICK S.H. (1967). — Transformation of the sporoblast into the microsporidian spore. *J. Protozool.*, 14 (Suppl.), p. 29.
- [49] SPRAGUE V. et VERNICK S.H. (1968). — Light and electron microscope study of a new species of *Glugea* (*Microsporida Nosematidae*) in the 4 — Spined Stickle — back *Apeltes quadracus*. *J. Protozool.*, 15 (3), p. 547-571.
- [50] SPRAGUE V. et VERNICK S.H. (1968). — Observations on the spores of *Pleistophora gigantea* (Thélohan, 1895) Swellengrebel, 1911, A microsporidian parasite of the Fish *Crenilabrus melops*. *J. Protozool.*, 15 (4), p. 662-665.
- [51] SPRAGUE V. et VERNICK S.H. (1969). — Light and electron microscope observations on *Nosema nelsoni* Sprague, 1950 (*Microsporida Nosematidae*) with particular reference to its golgi complex. *J. Protozool.*, 16 (2), p. 264-271.
- [52] SPRAGUE V., VERNICK S.H. et LLOYD R.J., Jr (1968). — The fine structure of *Nosema* sp. Sprague, 1965 (*Microsporida, Nosematidae*) with particular reference to stages in sporogony. *J. Invert. Pathol.*, 12, p. 105-117.
- [53] STANG-VOSS C. (1970). — Zur Entstehung des Golgi. Apparates Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Spermatischen von *Eisenia foetida* (*Annelidae*). *Z. Zellforsch.*, 109, p. 287-296.
- [54] STANIER J.E., WOODHOUSE M.A. et GRIFFIN R.L. (1968). — The fine structure of the spore of *Nosema spelotremae*, a Microsporidian parasite of a *Spelotrema metacercaria* encysted in the crab *Carcinus maenas*. *J. Invertebrate Pathology*, 12, n° 1, p. 73-82.
- [55] VAVRA J. (1965). — Recent contributions to the morphology and development of some Microsporidia. *Progress in Protozoology. Intern. Congr.*, Ser. 91, Excerpta Medica Foundation, p. 66-67.

- [56] VAVRA J. (1965). — Etude au microscope électronique de la morphologie et du développement de quelques Microsporidies. *C.R. Acad. Sci.*, **261**, p. 3467-3470.
- [57] VAVRA J. (1967). — Hydrolyse enzymatique des spores de microsporidies. *J. Protozool.*, **14** (Suppl.) 49.
- [58] VAVRA J. (1968). — Ultrastructural features of *Caudospora simulii* Weiser (*Protozoa, Microsporidia*). *Folia Parasit.*, **15**, p. 1-9 (1970).
- [59] VAVRA J., JOYON L. et PUYTORAC P. De (1966). — Observation sur l'ultrastructure du filament polaire des Microsporidies. *Protistologica*, **II**, fasc. 2, p. 109-112.
- [60] VAVRA J. et UNDEEN A.H. (1970). — *Nosema algerae* n. sp. (*Cnidosporea, Microsporida*) a pathogen in a laboratory colony of *Anopheles stephensi* Liston (*Diptera culicidae*). *J. Protozool.*, **17** (2), p. 240-249.
- [61] VERNICK S.H., SPRAGUE V. et LLOYD B.J., Jr. (1969). — Further observations on the fine structure of the Spores of *Glugea weissenbergi* (*Microsporida, Nosematidae*). *J. Protozool.*, **16** (1), p. 50-53.
- [62] VINCKIER D., DEVAUCHELLE G. et PRENSIER G. (1970). — *Nosema vivieri* n. sp. (*Microsporidae, Nosematidae*) hyperparasite d'une grégarine vivant dans le coelome d'un Nemerte. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **270**, p. 821-823.
- [63] VIVIER E. (1965). — Présence de microtubules intranucléaires chez *Metchnikovella hovassei* Vivier. *J. Microscopie*, **4**, n° 4, p. 559-562.
- [64] VIVIER E. (1965). — Etude au microscope électronique de la spore de *Metchnikovella hovassei* n. sp.; appartenance des *Metchnikovellidae* aux Microsporidies. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **260**, p. 6982-6984.
- [65] VIVIER E. (1966). — Observations ultrastructurales sur la microsporidie *Metchnikovella hovassei* Vivier. *J. Protozool.*, **13**, suppl., p. 41.
- [66] WEIDNER E. (1970). — Ultrastructural study of microsporidian development. I. *Nosema* sp. Sprague, 1965 in *Callinectes sapidus* Rathbun. *Z. Zellforsch.*, **105**, p. 33-54.
- [67] WEIDNER E. (1970). — Ultrastructural study of microsporidian development. 2nd International Congress of Parasitology, *The Journal of Parasitology*, **56**, n° 4, p. 362.
- [68] WEISER J. (1959). — *Nosema laphygmae* n. sp. and the internal structure of the microsporidian spore. *J. Insect. Pathol.*, **1**, p. 52-59.
- [69] WEISER J. (1970). — Life cycle of *Nosema bombycis*. 3rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, College Park, Maryland, August 1970.
- [70] WEISSENBERG R. (1967). — Contributions to the study of the intracellular development of the microsporidian *Glugea anomala* in the fish *Gasterosteus aculeatus*. *J. Protozoology*, **14** (Suppl.), p. 28.
- [71] WEISSENBERG R. (1970). — Some remarks upon the taxonomy of the genera *Glugea* and *Nosema* (*Protozoa, Microsporida*). 2nd International Congress of Parasitology, *The Journal of Parasitology*, **56**, n° 4, p. 363.

C) - Un exemple de différenciation cellulaire. Etude de la différenciation sporoblastique et genèse des différentes structures de la spore chez la microsporidie *Nosemoides vivieri*.

Cette étude a fait l'objet de l'article : "*Nosemoides gen.n., N.vivieri (V.D. et P., 1970) comb.nov.(Microsporidie); Etude de la différenciation sporoblastique et genèse des différentes structures de la spore*", *The Journal of Protozoology*, 1975, 22 (2) : 170-184.

Chez les microsporidies du genre *Nosema*, chaque sporoblaste évolue en une seule spore dont les différents organites vont se différencier au cours de cette transformation sporoblastique.

Dans le jeune sporoblaste apparaît, près du noyau, un amas de petites vésicules, à contenu plus ou moins dense, assimilable à un appareil de Golgi primitif. Ces vésicules de type golgien sont à l'origine du filament polaire dont l'élaboration semble débiter par l'apparition dans le cytoplasme, d'une grande "vésicule" limitée par une membrane de type unitaire et située entre le noyau, dans une dépression de l'enveloppe nucléaire, et les vésicules golgiennes. Cette vésicule périnucléaire deviendra le sac polaire. Le filament polaire se forme par coalescence de ces vésicules golgiennes qui se disposent en un manchon cylindrique entourant la zone centrale dense du filament. D'environ 110 nm de diamètre il est constitué de trois zones concentriques : une zone externe limitée par une membrane unitaire, puis vers le centre une zone claire et au centre un axe opaque aux électrons. Pendant l'élaboration du filament polaire, le sac polaire dont le contenu s'opacifie de plus en plus, migre au pôle antérieur de la cellule tandis que le noyau est repoussé dans la moitié postérieure.

Le polaroplaste lamellaire se différencie alors, englobant de nombreuses petites vésicules qui vont constituer le polaroplaste vésiculaire. Dans le sporoblaste, au pôle opposé au sac polaire, se forme également par coalescence de vésicules golgiennes, la vacuole

postérieure. Le filament polaire, de 90 - 95 nm de diamètre, est limité par une seule membrane de type unitaire. En fin de sporogénèse, le sporoblaste prend une forme ovoïde et sa paroi s'épaissit : la spore a acquis sa structure définitive. Dans cette spore, qui constitue à la fois le germe infectieux et une forme de résistance, on observe donc deux types de structure : le sporoplasme avec le noyau et un cytoplasme riche en ribosomes et en réticulum endoplasmique, et les organites constituant le mécanisme d'infection qui permettra d'injecter ce sporoplasme dans la cellule-hôte : sac polaire, filament polaire, polaroplaste et vacuole postérieure. Il est remarquable de constater que ces organites semblent issus d'un système membranaire continu provenant des vésicules golgiennes. Il semblerait que la vacuole postérieure soit en relation avec le filament polaire et pourrait même constituer l'extrémité distale renflée de celui-ci. Ce système membranaire continu pourrait constituer une explication au mécanisme d'évagination du filament polaire lors de l'infestation.

Nosemoides gen. n., *N. vivieri* (Vinckier, Devauchelle & Prensier, 1970)
comb. nov. (Microsporidie); Etude de la Différenciation Sporoblastique et
Genèse des Différentes Structures de la Spore*

D. VINCKIER

Laboratoire de Protistologie et Microscopie Electronique, Université des Sciences et Techniques de Lille I, B. P. 36,
59 650-Villeneuve d'Ascq, France

RESUME. Nous proposons le genre nouveau *Nosemoides* gen. n. pour l'espèce microsporidienne auparavant classée dans le genre *Nosema*, comme *N. vivieri* Vinckier, Devauchelle & Prensier, 1970. Ainsi, nous proposons *Nosemoides vivieri* (Vinckier, Devauchelle & Prensier) comb. nov. pour cette espèce, hyperparasite d'une grégarine monocystidée intestinale du némerite *Lineus viridis* (Fabricius) Johnston. L'étude ultrastructurale de *N. vivieri* nous a permis de préciser l'organitogenèse de la spore de ce protozoaire. Nous avons pu suivre en particulier, l'évolution de vésicules de type "golgien" et voir ainsi leur rôle dans la genèse du filament polaire.

Les stades végétatifs uninucléés (schizontes) se divisent plusieurs fois pour donner naissance aux sporoblastes. Puis chaque sporoblaste évolue en une seule spore.

Dans le jeune sporoblaste apparaît, près du noyau, un amas de petites vésicules à contenu plus ou moins dense assimilable à un appareil de Golgi primitif. Ces vésicules de type "golgien" sont à l'origine du filament polaire dont l'élaboration semble débiter par l'apparition dans le cytoplasme, d'une grande "vésicule" limitée par une membrane de type unitaire, et située entre le noyau, dans une dépression de l'enveloppe nucléaire, et les vésicules "golgiennes." Cette vésicule périnucléaire deviendra le sac polaire. Le filament polaire se forme par coalescence de ces vésicules "golgiennes" qui se disposent en manchon cylindrique entourant la zone centrale dense du filament. D'environ 110 nm de diamètre, il est constitué de 3 zones concentriques: une zone externe limitée de part et d'autre par une membrane unitaire, puis vers le centre une zone claire et au milieu un axe opaque aux électrons. Lorsque le filament polaire est ainsi élaboré, le sac polaire dont le contenu s'opacifie de plus en plus, migre au pôle antérieur de la cellule tandis que le noyau est repoussé dans la moitié postérieure. Le polaroplaste lamellaire se différencie alors, englobant de nombreuses petites vésicules constituant le polaroplaste vésiculaire. Au pôle du sporoblaste opposé au sac polaire se forme, également par coalescence de vésicules d'allure golgienne, la vacuole postérieure. Le filament polaire de 90-95 nm de diamètre n'est plus limité que par une seule membrane de type unitaire. En fin de sporogénèse, la paroi du sporoblaste, qui a pris une forme ovoïde, s'épaissit: la spore a acquis sa structure définitive.

Dans la discussion, après avoir rappelé les caractéristiques essentielles de la cytologie du sporoblaste et de l'organitogenèse de la spore de *N. vivieri* et souligné les points encore obscurs, la position systématique du *Nosemoides* gen. n. est examinée.

SYNOPSIS. A new genus, *Nosemoides* gen. nov. is proposed for the microsporidan species previously placed in the genus *Nosema*, as *N. vivieri* Vinckier, Devauchelle & Prensier, 1970. Thus *Nosemoides vivieri* (Vinckier, Devauchelle & Prensier) comb. nov. is established for this species, hyperparasitic in an intestinal monocystid gregarine of the nemertean *Lineus viridis* (Fabricius) Johnston. An ultrastructural study of *N. vivieri* allowed us to describe in detail its sporogony. In particular, we were able to follow the development of Golgi-type vesicles and to observe their role in the formation of the polar filament.

The uninucleate vegetative stages (schizonts) divide several times before giving rise to sporoblasts, each of which develops into a single spore.

In the young sporoblasts there appears near the nucleus an accumulation of small vesicles, with more or less dense contents, comparable to a primitive Golgi apparatus. These Golgi-type vesicles are the source of the polar filament, whose formation appears to commence with the appearance in the cytoplasm of a large "vesicle" delimited by a unit-type membrane. This vesicle, lodged in a depression of the nuclear envelope, is situated between the nucleus and the Golgi-like vesicles. The perinuclear vesicle becomes the polar sac. The polar filament is formed by coalescence of the Golgi-like vesicles which arrange themselves into a cylindrical sleeve surrounding the central dense zone of the filament. The sleeve, ~ 110 nm in diameter, consists of 3 concentric zones: an external zone, limited on both sides by unit membranes; an intermediate clear zone; and a central electron-dense core. When the polar filament is thus elaborated, the polar sac, whose contents become progressively more opaque, migrates to the anterior pole of the cell, while the nucleus is pushed into the posterior part. The lamellar polaroplast becomes differentiated, encircling numerous small vesicles that constitute the vesicular polaroplast. At the pole of the sporoblast opposite to the sac there forms a posterior vacuole, also by coalescence of the Golgi-type vesicles. The polar filament, 90-95 nm in diameter, is limited by a single unit-type membrane. At the end of sporogenesis, the sporoblast wall, which has assumed an ovoid shape, thickens—the spore has acquired its definitive structure.

The essential characteristics of sporoblast cytology and the development of the spore are recapitulated in the discussion which is concerned also with the still obscure points of this development. Finally the systematic position of *Nosemoides* gen. n. is examined.

Index Key Words: *Nosemoides* gen. n.; *Nosemoides vivieri* (Vinckier, Devauchelle & Prensier, 1970) comb. nov.; microsporidan; hyperparasite in intestinal gregarine of *Lineus viridis*; sporoblast sporogony; spore; electron microscopy; taxonomy.

LES grégaires, protozoaires parasites obligatoires peuvent à leur tour être parasitées par d'autres protozoaires. De tels cas d'hyperparasitisme sont connus au moins depuis 1897, date à laquelle Caullery & Mesnil (5) ont décrit le genre *Metchnikovella* comme type nouveau de microorganismes parasites de

grégaires; or on sait depuis les travaux de Vivier (55) que les Metchnikovellidae sont en fait des microsporidies. Cependant les premières microsporidies parasites de grégaires, appartenant aux genres *Nosema* et *Perezia* ont été décrites en 1909 par Léger & Duboscq (19, 20). Puis de 1909 à 1955, de nombreuses autres microsporidies des genres *Metchnikovella*, *Amphiamblis*, *Amphicantha*, ont été observées essentiellement chez des grégaires de polychètes. Plus récemment Codreanu (6) et Corbel (8) ont

* Travail effectué avec l'aide matérielle du C. N. R. S. (E. R. A. n° 184).

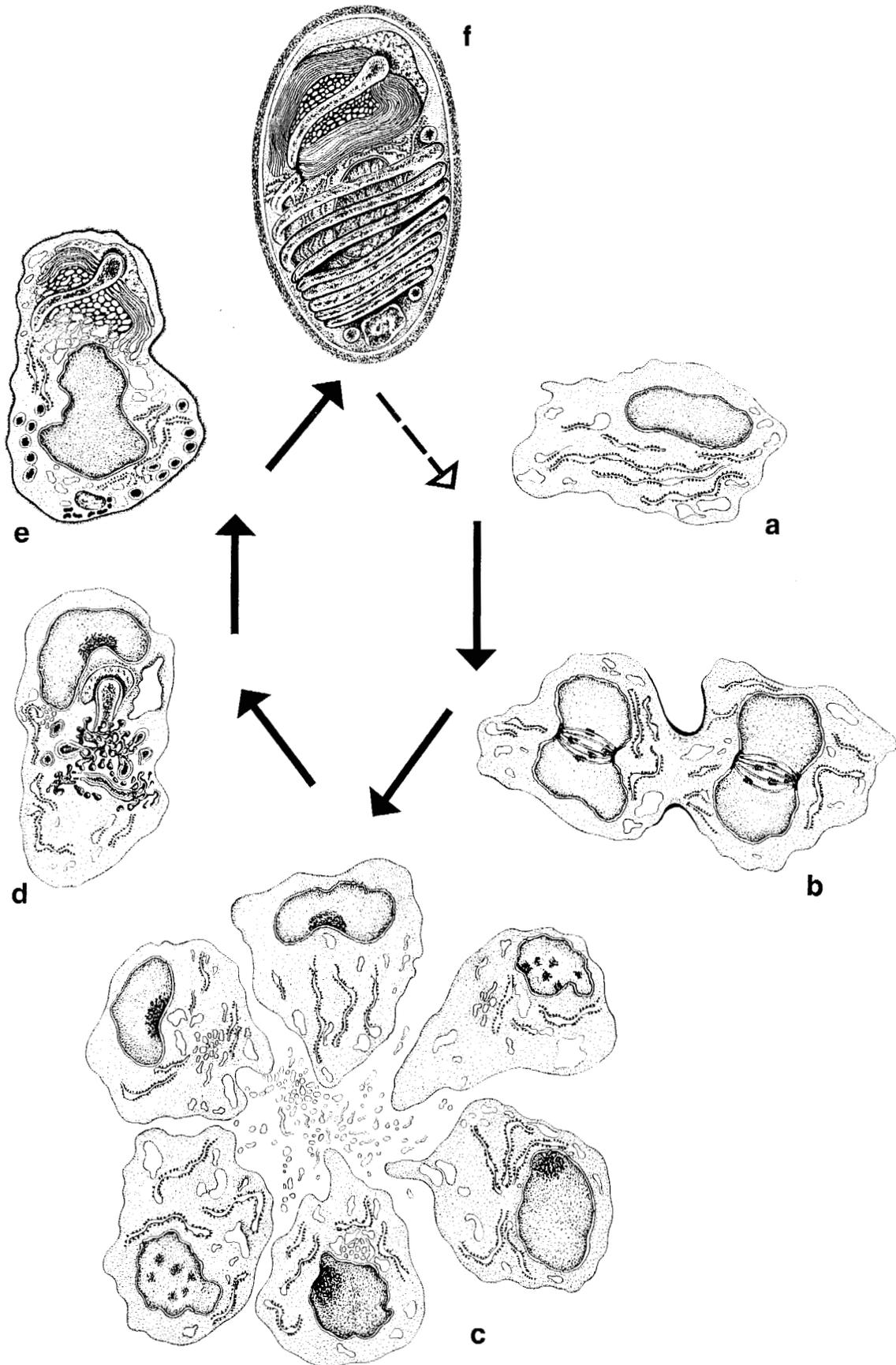


Fig. 1. Cycle de *Nosemoides vivieri*. a. Forme uninucléée (schizonte). b, c. Phase de multiplication des schizontes (b), aboutissant à la formation des sporoblastes (c). d-f. Phase sporogonique, au cours de la transformation sporoblastique (d, e), chaque sporoblaste évolue en une seule spore (f).

signalé des microsporidies appartenant respectivement aux genres *Pleistophora* et *Metchnikovella* chez des grégaires d'insectes. Vivier (57), dans une revue sur "Les Microsporidies des Protozoaires" en dresse la liste complète. En microscopie électronique, Hildebrand & Vivier (11) et Vivier & Schrevel (59) ont étudié, chez des grégaires du genre *Leucodina*, les différents stades du cycle de 2 espèces du genre *Metchnikovella*. Chez les némerthes, Montgomery (29) chez une grégare de *Lincolia gessnerensis* et Awerinzew (2, 3) chez une grégare d'*Amphiporus sp.*, avaient déjà observé des formes rappelant fortement des spores de microsporidies. Chez *Lincolia viridis*, l'étude d'une grégare intestinale a révélé l'existence d'une nouvelle microsporidie, *Nosemoides vivieri* nomen novum (= *Nosema vivieri* Vinckier, Devauchelle & Prensier) dont nous avons pu établir le cycle en ultrastructure (53, 54). Le développement de cet hyperparasite présente quelques caractères originaux, principalement l'évolution et le rôle de vésicules de type "golgien" dans la genèse du filament polaire. Il nous a donc paru particulièrement intéressant d'examiner en détail la cytologie des sporoblastes au cours de la transformation sporoblastique. Ainsi la présente étude va tenter de mieux préciser l'organitogenèse de la spore et la position systématique de cette microsporidie.

MATERIEL ET METHODES

Les observations ont été effectuées sur *Nosemoides vivieri* nomen novum (= *Nosema vivieri* Vinckier, Devauchelle & Prensier, 1970), parasite de la grégare *Leucodina linci* Vinckier (52) elle-même parasite intestinal du némerthe *Lincolia viridis* (Fabricius) Johnston. Le cycle de cette grégare fera l'objet d'une étude séparée (Vinckier, en préparation).

Les vers ont été récoltés sur le littoral boulonnais, à la Station de Biologie maritime de Wimereux. Ils ont été ensuite conservés au Laboratoire, en eau de mer renouvelée, dans des cristallisoirs, à l'obscurité et à une température d'environ 4-8 C.

L'étude ultrastructurale a été faite selon les techniques classiques: double fixation glutaraldéhyde-osmium dans un tampon phosphate, déshydratation dans l'acétone puis inclusion en Epon ou Araldite.

Les pièces sont coupées à l'ultramicrotome Porter-Blum sur couteau de verre ou de diamant. Les coupes, recueillies sur grilles parlodionnées, sont contrastées par l'acétate d'uranyle en solution aqueuse ou alcoolique et par le citrate de Plomb.

Les préparations sont examinées aux Microscopes Siemens Elmiskop I a et Hitachi HU 11 E.

Etude d'Ensemble du Cycle de *N. vivieri*

Dans une grégare parasitée on rencontre généralement les différents stades de développement de la microsporidie. Ceux-ci semblent d'ailleurs être répartis plus ou moins indifféremment dans la région moyenne de l'hôte. On peut ainsi observer des formes uninucléées, binucléées, des sporoblastes et des spores (54). Nous résumerons donc ici les principaux caractères cytologiques des différents stades du cycle de cette microsporidie (Fig. 1).

Phase Végétative

Les Formes Uninucléées.—En contact direct avec le cytoplasme de la grégare-hôte, les formes uninucléées (= schizontes) (Fig. 1a) sont limitées par une paroi simple constituée d'une seule membrane unitaire. Leur cytoplasme totalement dépourvu de mitochondries et de grains de réserves, est riche en ribosomes et membranes de type granulaire (ergastoplasme) et agranulaire (reticulum endoplasmique), celles-ci souvent sous forme de petites vacuoles. Le noyau, de position toujours excentrée, montre

une enveloppe nucléaire typique et un nucléoplasme homogène sans nucléole ni chromatine nettement différenciée. Il ne semble pas y avoir de centriole.

Phase de Multiplication des Schizontes.—Ces schizontes vont se diviser plusieurs fois: c'est la schizogonie (Fig. 1b). Les noyaux plus ou moins sphériques subissent des mitoses du type "cryptomitose" (12), sans disparition de l'enveloppe nucléaire, acentriolaires avec fuseau intranucléaire entre 2 centres cinétiques placés au fond de dépressions de l'enveloppe nucléaire. Ces divisions aboutissent à la formation des sporoblastes sans qu'il n'y ait jamais apparition de stade plasmodial, ni de pansporoblaste.

Phase Sporogonique

Les Sporoblastes.—Au cours de la transformation sporoblastique, chaque sporoblaste évolue en une seule spore (Figs. 1c,d,e). L'étude de l'organitogenèse de la spore est envisagée en détail plus loin.

Les spores.—La spore montre: une paroi épaisse constituée de 3 couches; dans le tiers antérieur, le polaroplasme lamellaire coiffé du sac polaire d'où part le filament polaire; dans les 2 tiers postérieurs, le filament polaire qui, ayant traversé le polaroplasme, s'enroule en spirale, sous la paroi, autour d'une masse cytoplasmique renfermant un noyau unique, riche en ribosomes et membranes ergastoplasmiques mais dépourvue de mitochondries et de réserves. A l'extrémité de la spore se trouve la "vacuole postérieure" (Fig. 1f).

Etude de la Transformation Sporoblastique et Organitogenèse de la Spore

Après la phase de multiplication des schizontes qui aboutit à la formation des sporoblastes, ceux-ci, pouvant se disperser dans le cytoplasme-hôte ou rester groupés, vont se différencier chacun en une seule spore. Au cours de cette différenciation se formeront les organites définitifs de la spore.

Origine et Formation du Filament Polaire

Dans les jeunes sporoblastes (Fig. 3) et parfois même dans les schizontes (Fig. 2), on trouve souvent soit près du noyau, soit dans le cytoplasme environnant, un groupe de petites vésicules, à contenu plus ou moins dense, assimilable selon Vávra (47) à un appareil de Golgi primitif. Nous n'avons pu observer l'origine exacte de ces vésicules, mais leur position parfois périnucléaire suggère qu'elles pourraient dériver de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire; une origine semblable du Golgi a été observée chez divers Sporozoaires (58, 60) et aussi dans des cellules embryonnaires de sauterelle (16). Ces "vésicules" pourraient également dériver du reticulum endoplasmique, ou même avoir une double origine. En tous cas, elles paraissent être à l'origine du filament polaire.

L'élaboration du filament polaire débute par l'apparition dans le cytoplasme, d'une "cavité" à contenu peu dense, limitée par une seule membrane unitaire (Fig. 4). Elle est toujours située entre le noyau, dans une dépression de celui-ci, et un amas de vésicules golgiennes à contenu relativement dense (Figs. 4, 6). Il est intéressant de remarquer qu'à ce stade l'aspect du contenu de cette "cavité" ressemble étrangement à celui du nucléoplasme tout proche, le noyau occupant toujours, dans le sporoblaste, une position excentrée. Il est également curieux d'observer que l'étroite zone située entre le noyau et cette "cavité" semble occupée par du matériel plus dense que le cytoplasme environnant (Figs. 4-7, 9, 10, 12). Ce premier organite en voie de différenciation est en relation avec une grande vacuole à contenu très clair et séparé de ce dernier par un petit étranglement (Figs. 5, 7). Cette vacuole paraît être disposée latéralement par rapport

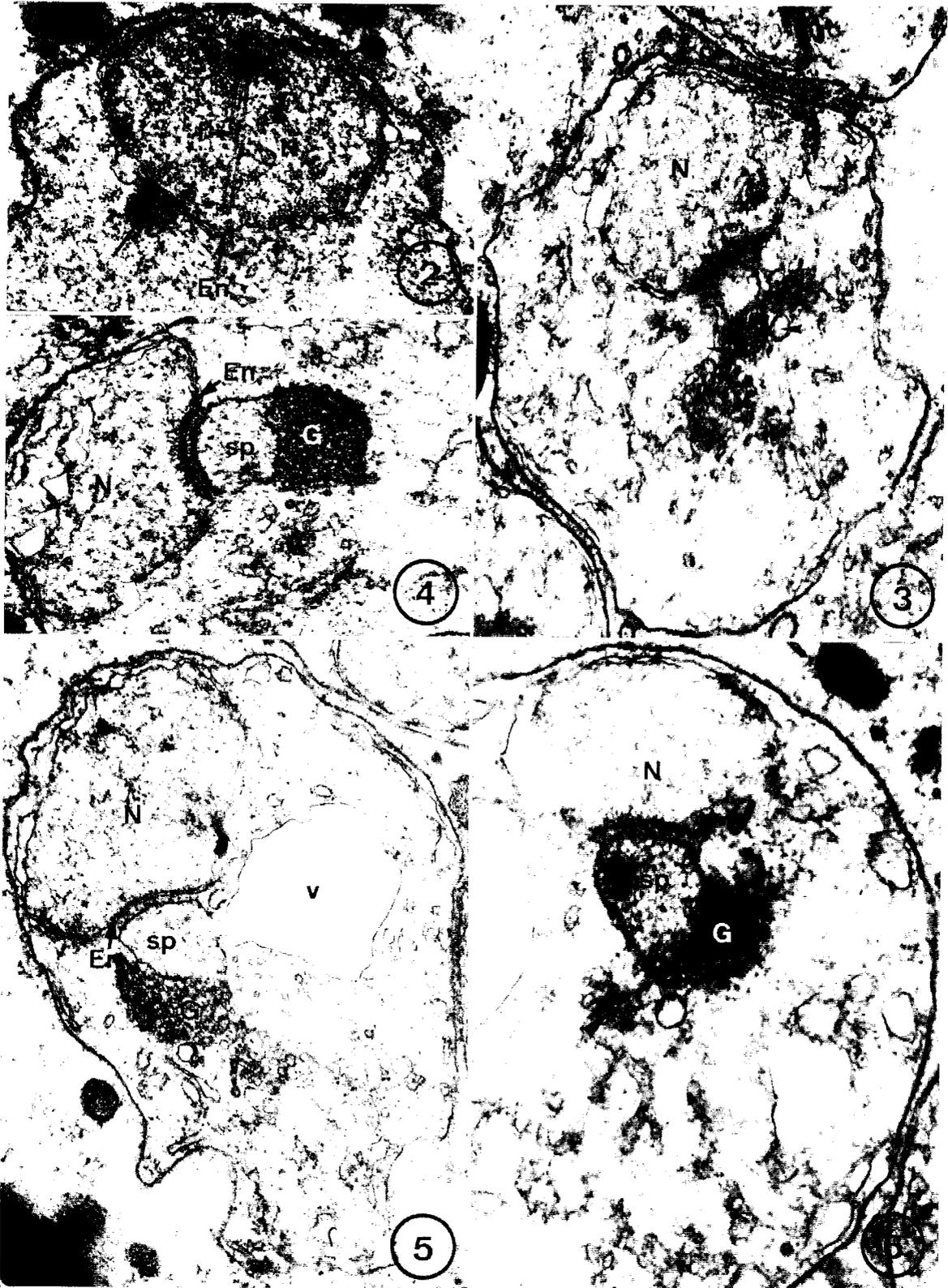
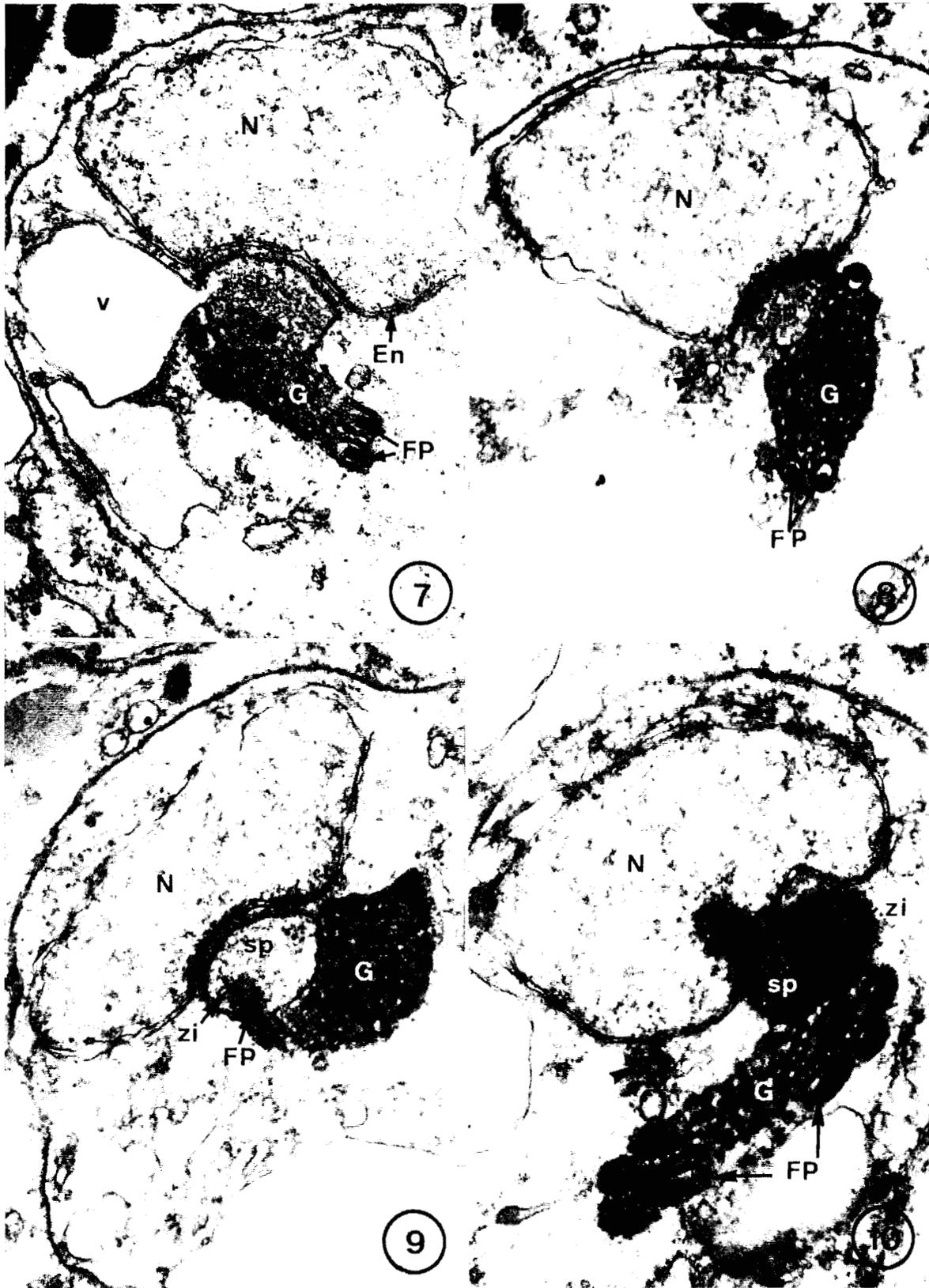
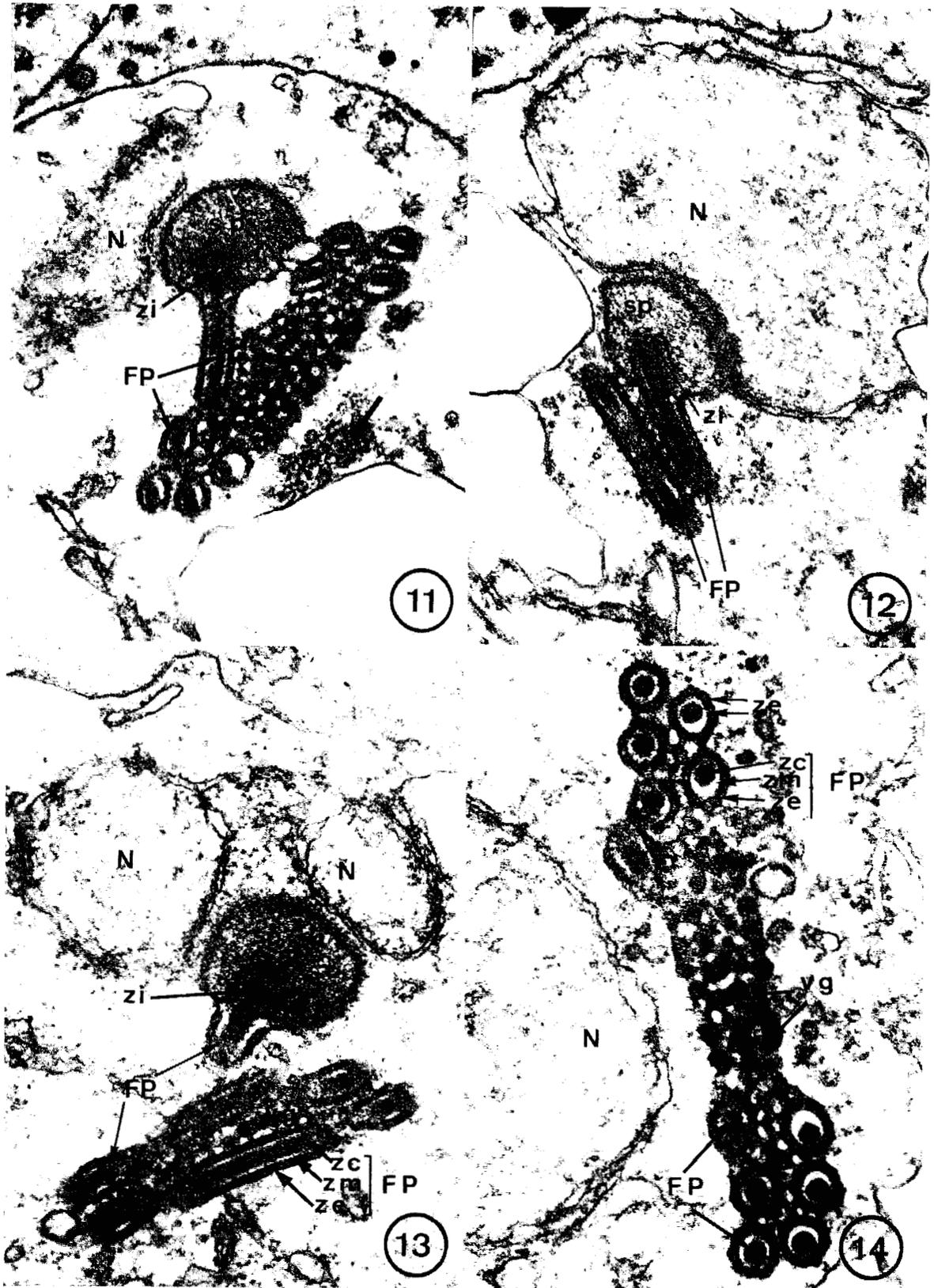


Fig. 2. Forme uninucléée (schizonte) dont le noyau (N) en voie de division présente des fibres fusoriales (f). Près de l'enveloppe nucléaire (En), on remarque un amas de petites vésicules (flèche). $\times 25\ 400$.

Figs. 3-6. [Organitogenèse de la spore.] 3. Jeune sporoblaste. Dans le cytoplasme, près du noyau (N), on note un amas de vésicules plus ou moins grandes (flèches). $\times 35\ 700$. 4. Jeune sporoblaste. L'élaboration du filament polaire semble commencer par l'apparition dans le cytoplasme, d'une grande "vésicule" (sp) située entre le noyau (N), dans une dépression de l'enveloppe nucléaire (En) et un amas de petites vésicules golgiennes (G) à contenu très dense. Cette grande "vésicules" (sp) est à l'origine du sac polaire. $\times 36\ 000$. 5. Ce futur sac polaire (sp) est en relation, d'une part avec une grande vacuole (v) à contenu clair, et d'autre part avec les petites vésicules golgiennes à contenu dense (G). $\times 35\ 500$. 6. Le contenu du futur sac polaire (sp) devient plus dense. On remarque également près des vésicules golgiennes (G) un autre amas de petites vésicules (flèche). $\times 42\ 200$.



Figs. 7-10. [Organitogenèse de la spore: formation du filament polaire.] 7, 8. Au niveau des vésicules golgiennes (G) se forme le filament polaire (FP), tandis que le sac polaire reste en relation avec une grande vacuole (v) et les vésicules golgiennes (G), près desquelles on trouve souvent un autre amas de petites vésicules (flèche, Fig. 8). Fig. 7, $\times 48\ 000$; Fig. 8, $\times 41\ 000$. 9, 10. Le filament polaire (FP), au début de sa formation, pénètre dans le sac polaire (sp) où il s'insérera (zi). Fig. 9, $\times 46\ 000$; Fig. 10, $\times 54\ 000$.



Figs. 11-14. [Organitogenèse de la spore: le filament et le sac polaire.] 11-13. Le contenu du sac polaire (sp) devient de plus en plus dense. La membrane externe du filament est en continuité avec celle du sac polaire (sp) où pénètre la zone centrale (zi) plus dense du filament (FP) qui s'élargit à ce niveau. Le filament polaire (FP) est constitué de 3 zones (ze, zm, zc). Fig. 11, $\times 48\ 000$; Fig. 12, $\times 54\ 000$; Fig. 13, $\times 40\ 600$. 14. Le filament polaire (FP) se forme par juxtaposition et coalescence des vésicules golgiennes (vg). Ce filament est formé de 3 zones: une zone centrale dense (zc), une zone moyenne claire (zm) et une zone externe (ze) constituée de 2 membranes unitaires. $\times 44\ 300$.



Figs. 15-19. [Organitogenèse de la spore: le filament et le sac polaire.] 15, 16. Formation du filament polaire (FP) par coalescence des vésicules golgiennes (vg). Le filament est toujours formé de 3 zones (ze, zm, zc). On remarque (Fig. 16) près de l'enveloppe nucléaire (En), un autre amas de petites vésicules (flèche). Fig. 15, $\times 56\,700$; Fig. 16, $\times 60\,400$. 17. Zone d'insertion (zi) du filament (FP) sur le sac polaire (sp) avec renforcement basal à ce niveau. $\times 83\,700$. 18, 19. A un stade plus avancé, le sac polaire (sp) qui a migré à un pôle du sporoblaste (opposé au noyau) s'aplatit et prend la forme d'une "ancre." Entre celui-ci et le noyau (N) est apparu le polaroplaste lamellaire (PL) entourant la base du filament (FP), le polaroplaste vésiculaire (Pv), et parfois une partie du noyau (N). Noter le léger épaissement de la paroi (P) du sporoblaste. Fig. 18, $\times 40\,500$; Fig. 19, $\times 38\,400$.

à l'axe noyau-"cavité"-Golgi. Si les relations de cette structure, qui sera à l'origine du sac polaire, avec l'enveloppe nucléaire et le noyau ne sont pas prouvées, celles avec les vésicules golgiennes sont nettes (Figs. 4-8). Nos observations ne nous permettent pas jusqu'alors de préciser l'origine exacte de ce futur sac polaire. Le point d'insertion du filament polaire sur le sac polaire se forme à l'endroit où les vésicules "golgiennes" sont en relation avec ce sac (Fig. 9) dont le contenu deviendra de plus en plus opaque au fur et à mesure que se différenciera le filament (Fig. 19). La région de ce filament élaborée en premier est sa partie proximale avec la zone d'insertion sur le sac polaire dont le contenu n'est encore que peu dense (Figs. 9, 11, 12). Puis le filament polaire se forme par coalescence de ces petites vésicules "golgiennes" (Figs. 10, 11, 13, 14). Celles-ci se disposent côte-à-côte en un manchon cylindrique englobant une zone centrale dense (Figs. 10, 13-16). A ce stade, le filament polaire, d'environ 115 nm de diamètre est constitué de 2 cylindres emboîtés séparés par une zone claire de 17 nm d'épaisseur: l'externe, épais de 25 nm est constitué de 2 membranes unitaires séparées par une zone opaque aux électrons, et l'interne de 50 nm de diamètre est plein et constitué d'une matière très dense qui pourrait être élaborée à partir du contenu des vésicules "golgiennes" participant à la formation de la zone externe du filament (Figs. 13, 14).

Ce diamètre du filament polaire en formation semble être variable d'un sporoblaste à l'autre; nous avons ainsi constaté qu'il est généralement compris entre 100 et 160 nm, selon les individus, la dimension moyenne et la plus courante se situant entre 110 et 120 nm. Pendant son élaboration, le filament semble donc limité par 2 membranes unitaires classiques de 8 nm d'épaisseur, elles-mêmes séparées par un espace devenu plus clair d'environ 9 nm de large. En ce qui concerne l'insertion du filament sur le sac polaire, nos observations ne nous permettent pas encore d'en préciser la structure exacte. La zone centrale dense du filament pénètre, en se renflant en massue, à l'intérieur du sac polaire dont la membrane limitante semble en continuité avec la membrane externe du filament polaire (Figs. 11-13). La membrane interne paraît se prolonger dans le sac polaire et limiter la zone centrale dense renflée à ce niveau où il y aurait également disparition de la zone claire (Figs. 10, 12, 13). Au point d'insertion, il y aurait donc un renforcement basal du filament au niveau de sa membrane interne (Fig. 17). A un stade plus avancé, lorsque le polaroplaste lamellaire est différencié, il semble qu'à la limite sac polaire-filament, dans la zone claire de ce dernier, du matériel dense rayonné de la zone centrale vers la membrane limitante du filament (Fig. 23).

Puis, une fois ce filament élaboré, le sac polaire, qui jusque là était toujours situé dans une dépression de l'enveloppe nucléaire, va s'éloigner du noyau pour gagner le pôle opposé du sporoblaste (Fig. 17). Cette migration doit être très rapide car il ne nous a pas encore été possible de l'observer.

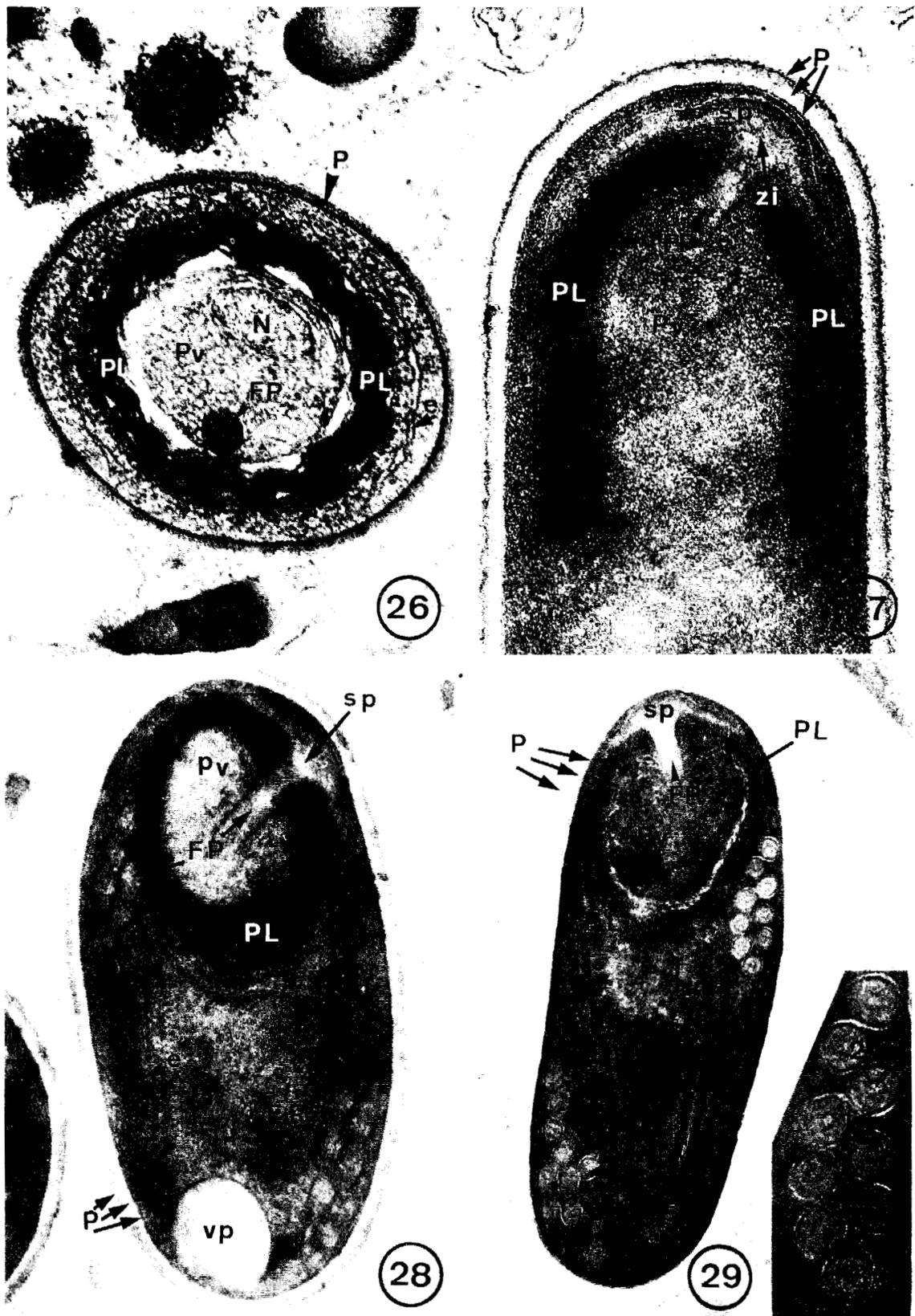
Le Polaroplaste

Le sac polaire, jusqu'alors de forme globuleuse, va ensuite s'aplatir pour prendre la forme d'une "ancree" tandis que son contenu deviendra très dense (Figs. 18-25). En même temps, une structure nouvelle apparaît: le polaroplaste. Comme chez *Heterosporis finki* (35, 36), cet organite paraît constitué de 2 parties probablement d'origine différente: le polaroplaste lamellaire et le polaroplaste vésiculaire (Figs. 18, 19). En ce qui concerne le polaroplaste lamellaire, sa différenciation doit également être extrêmement rapide car nous n'avons pas pu observer les différentes phases de son élaboration, et le problème de son origine resté posé. Ainsi lorsque le filament est entièrement élaboré et que le sac polaire a "migré" à un pôle du sporoblaste,



Figs. 20-25. [Organitogenèse de la spore.] 20-22. Le sac polaire (sp) avec la base du filament (FP) qui est entourée du polaroplaste lamellaire (PL) dont l'empilement exact des membranes est difficile à préciser. Fig. 20, $\times 39\,400$; Fig. 21, $\times 31\,200$; Fig. 22, $\times 30\,800$. 23. Zone d'insertion du filament (zi) sur le sac polaire (sp). Du matériel disposé d'une manière plus ou moins rayonnante, se trouve dans la zone moyenne, entre la zone centrale dense et la zone externe du filament. Noter "l'empilement" encore lâche des membranes du polaroplaste lamellaire (PL). $\times 35\,600$. 24. Le sporoblaste prend une forme ovoïde avec à un pôle le sac polaire (sp) d'où part le filament (FP) et le polaroplaste lamellaire (PL) et au pôle opposé, la vacuole postérieure (vp). Dans le cytoplasme, on observe autour du noyau (N) des membranes ergastoplasmiques (e). Noter le léger épaissement de la paroi (P). $\times 26\,300$. 25. Le sporoblaste va évoluer en spore. La paroi (P) s'épaissit par apposition d'une couche dense sur la membrane plasmique. Le polaroplaste lamellaire (PL) dont les membranes "se resserrent" prend la forme d'une cloche entourant la base du filament (FP) et le polaroplaste vésiculaire (Pv). $\times 23\,800$.

un système de membranes, empilées les unes sur les autres, apparaît sous le sac polaire, englobant la base du filament (Figs. 18-22, 24). Il est difficile de préciser le mode d'empilement de ces membranes, mais, très lâche au début, il se resserre de plus en plus au fur et à mesure de l'évolution du sporoblaste (Figs. 25, 26), pour aboutir dans la spore à une structure lamellaire



Figs. 26-29. [Ultrastructure des spores.] 26. Coupe transversale au niveau du polaroplaste lamellaire (PL). Celui-ci entoure le filament (FP), le polaroplaste vésiculaire (Pv) et un lobe du noyau (N). Entre le polaroplaste lamellaire (PL) et la paroi (P), le cytoplasme est riche en ribosomes et lamelles ergastoplasmiques (e). $\times 72\ 000$. 27. Région antérieure d'une spore dont la paroi (P) est constituée de 3 zones. Du sac polaire (sp), limité par une membrane unitaire (flèches), et "coiffant" le polaroplaste lamellaire (PL)

compacte en forme de cloche (Figs. 27-29); celle-ci est percée, au centre de sa partie convexe d'un orifice par où passe le filament polaire (Figs. 27-29). Cette structure semble être l'homologue du "cavum" décrit chez *Nosema sp.* (42). Le sac polaire se trouve ainsi placé entre la paroi du sporoblaste ou de la spore et ce "cavum" sur lequel il semble "s'appuyer." L'origine de ces membranes n'est pas connue et il n'est pas possible de dire si elles dérivent de membranes ergastoplasmiques, ou de saccules empilés les uns sur les autres, ou même si cette origine est tout autre. Il faut cependant noter que, dès qu'apparaît le polaroplaste lamellaire, la grande vacuole observée lors du début de la formation du filament polaire n'est plus visible, et ce filament n'a plus qu'un diamètre d'environ 100 nm, sauf à sa base, près du sac polaire où il est légèrement plus grand. Ce diamètre peut d'ailleurs varier selon les individus entre 95-105 nm. D'autre part, à partir de ce stade, le filament polaire ne semble plus limité que par une seule membrane unitaire, comme dans la spore (Figs. 28, 29). Si l'on considère que cette unique membrane correspond à la plus interne des 2 membranes existantes lors de la formation du filament, ceci pourrait expliquer alors sa diminution de diamètre.

Simultanément à la différenciation du polaroplaste lamellaire, apparaît entre le noyau et le futur "cavum," et plus ou moins englobé par celui-ci, un amas relativement important de petites vésicules constituant le polaroplaste vésiculaire (Figs. 18, 19, 25, 26). L'origine de ces vésicules est également énigmatique, mais peut-être dérivent-elles des vésicules golgiennes restantes, après la formation du filament polaire, ou du reticulum endoplasmique. D'ailleurs la structure vésiculaire de ce polaroplaste semble plus ou moins s'estomper pour devenir plus granuleuse (Figs. 27-29) au fur et à mesure de la transformation sporoblastique, et souvent, dans la spore, il n'est plus possible de la reconnaître.

Le noyau du sporoblaste est souvent repoussé dans la moitié postérieure de la cellule, opposée au sac polaire (Figs. 18, 19, 25). Il ne semble pas avoir une forme bien définie; ce noyau est généralement lobé et l'un des lobes peut se trouver dans le "cavum" avec le polaroplaste vésiculaire (Figs. 19, 26).

La Vacuole Postérieure

Au pôle opposé au sac polaire, va se différencier un nouvel organite, la vacuole postérieure (Figs. 24, 28), déjà décrite par Lom & Corliss chez *Plistophora hypheobryconis* (22) puis par Schubert chez *Heterosporis finki* (35, 36). Elle pourrait également correspondre à la structure nommée "inclusion body" observée chez *Nosema sp.* (42). Au pôle postérieur du sporoblaste, se groupent des petites vésicules à contenu dense, parfois à côté d'une vacuole (Figs. 31, 32); ces vésicules rappellent les vésicules "golgiennes" à l'origine du filament polaire. Elles semblent fusionner pour former des masses denses plus importantes (Figs. 33-35) qui finalement formeront dans la spore, un seul organite, la vacuole postérieure (Fig. 36). Celle-ci est limitée par une seule membrane de type unitaire comme le filament, et il est curieux de constater l'aspect souvent identique que présentent le filament polaire et la vacuole postérieure. C'est pourquoi il serait intéressant de savoir si ces 2 organites sont ou non en relation. Nos observations ne nous permettent pas pour l'instant de répondre à cette question.

La Paroi

Comme nous l'avons déjà signalé, et à quel stade que ce soit, le parasite est toujours en contact direct avec le cytoplasme de l'hôte. Pendant une grande partie du cycle, ce parasite est limité par une paroi constituée de la seule membrane unitaire. Et ce n'est qu'en fin d'évolution, que la paroi du sporoblaste commence à s'épaissir: une couche dense vient s'apposer sur la face externe de la membrane cytoplasmique (Figs. 25, 26). Puis une zone plus claire vient s'insérer entre cette zone dense et la membrane du sporoblaste. Ainsi la paroi définitive de la spore, de 70-80 nm d'épaisseur montre 3 composantes (Figs. 27, 28): la membrane cytoplasmique proprement dite de 8 nm, une zone claire de 20-25 nm d'épaisseur et une zone externe sombre d'environ 35-45 nm de large. L'épaisseur de cette paroi semble plus ou moins uniforme autour de la spore; parfois elle peut cependant être légèrement amincie au niveau du sac polaire.

Donc, après toutes ces transformations sporoblastiques, la spore mûre acquiert sa structure définitive (Figs. 27-29). Le tiers antérieur de la spore est occupé par le polaroplaste lamellaire, d'environ 110-120 nm d'épaisseur, en forme de cloche à ouverture basale rétrécie permettant le passage du filament polaire, et renfermant le polaroplaste vésiculaire dont la texture est devenue plus granuleuse. Ce polaroplaste lamellaire est coiffé, dans sa partie supérieure, du sac polaire en forme d'ancre dont le contenu paraît uniformément dense; cependant on peut parfois y observer des "structures linéaires" rappelant celles observées chez *Glugea stephani* (15) et pouvant correspondre à la zone d'insertion du filament sur ce sac polaire. De celui-ci part le filament qui, après avoir traversé obliquement les polaroplastes lamellaire et vésiculaire, s'enroule en spirale, sous la membrane plasmique, entourant le cytoplasme renfermant exclusivement des membranes ergastoplasmiques et des ribosomes, et le noyau unique situé dans la partie postérieure de la spore; il peut ainsi effectuer jusqu'à 12 tours de spires. En coupe transversale, la structure de ce filament rappelle celle décrite chez une microsporidie parasite d'un hippocampe (21), c'est-à-dire 3 couches osmiophiles concentriques de densité différente sont entourées de la membrane limitante du filament (Figs. 29, 30). Au pôle postérieur de la spore, diamétralement opposé au sac polaire se trouve la "vacuole postérieure."

DISCUSSION

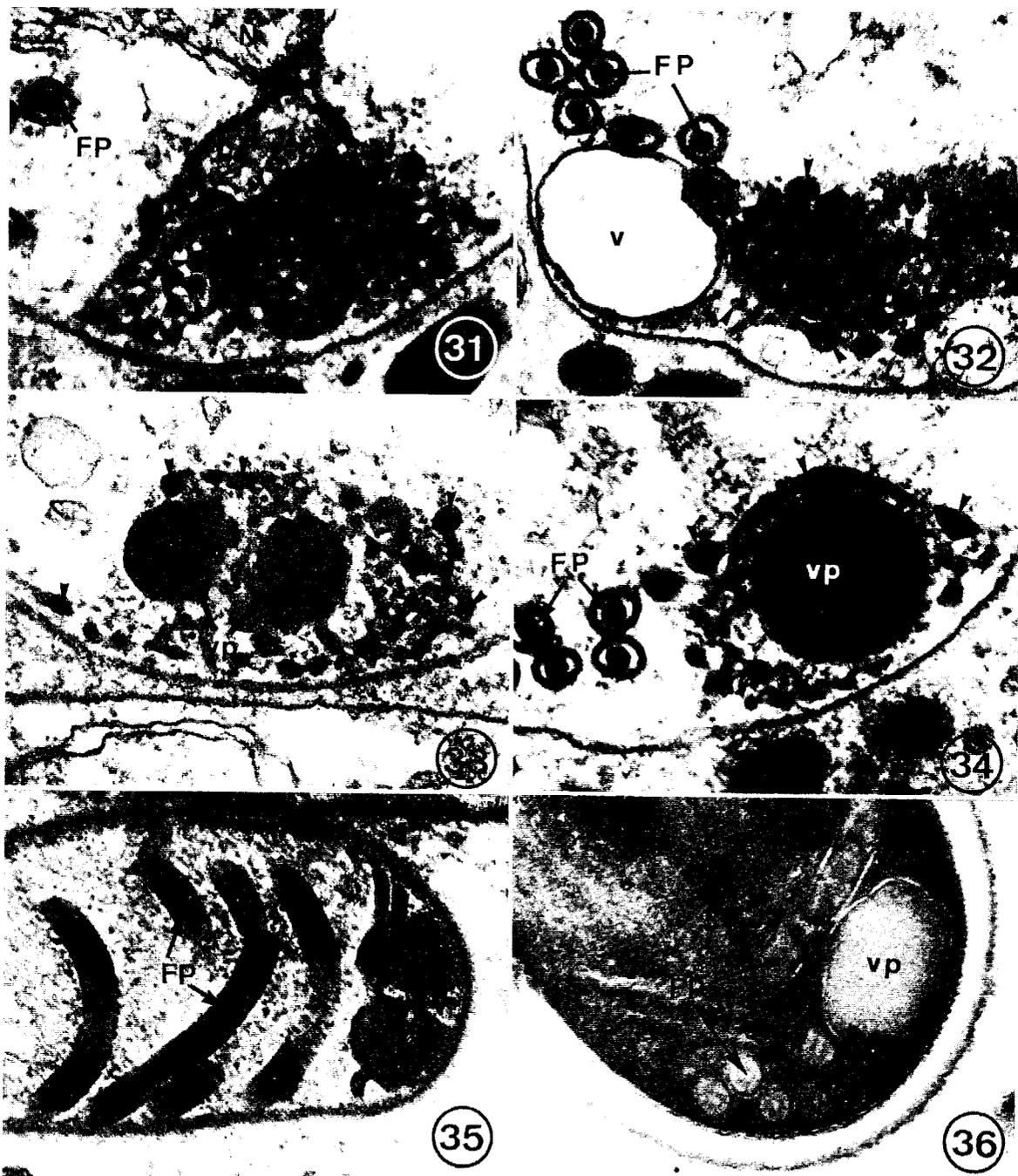
Organitogenèse

Si dans l'ensemble les aspects ultrastructuraux envisagés ici sont en accord avec les travaux précédents effectués sur d'autres Microsporidies (1, 7, 9, 11, 13-15, 18, 21, 22, 24-28, 30, 31, 33-36, 39-45, 47-51, 55, 56, 58, 61-64), cette étude montre bien nettement la formation du filament polaire et des ses annexes (polaroplaste et vacuole postérieure).

Le Filament Polaire.—Dans le jeune sporoblaste, se différencie un organite important, le filament polaire. Celui-ci tire vraisemblablement son origine d'une structure assimilable à un appareil de Golgi primitif, comme l'avaient signalé Vávra (47) puis Sprague (37). En effet très tôt (parfois même chez le schizonte), nous voyons apparaître, très près du noyau, un amas de petites vésicules à contenu plus ou moins dense qui seraient à l'origine

←
de structure compacte, part le filament (FP) qui traversera le polaroplaste vésiculaire (Pv). × 80 000. 28, 29. Coupes longitudinales de spores. Le tiers antérieur est occupé par le sac polaire (sp) et les polaroplastes lamellaire (PL) et vésiculaire (Pv) entourant la base du filament (FP). Dans les 2 tiers postérieurs se trouvent le filament (FP), le cytoplasme riche en ergastoplasme (c) et la vacuole postérieure (vp). La paroi (P) est constituée de 3 zones. Fig. 28, × 54 000; Fig. 29, × 38 500.

Fig. 30. Structure du filament polaire: on observe 3 couches osmiophiles concentriques (1, 2 et 3) entourées de la membrane limitante du filament (M). × 90 000.



Figs. 31-36. La vacuole postérieure (vp) située au pôle opposé au sac polaire semble se former par coalescence de vésicules à contenu dense (flèches). Figs. 31, 32: $\times 66\ 000$; Fig. 33, $\times 66\ 800$; Fig. 34, $\times 66\ 500$; Fig. 35, $\times 57\ 800$; Fig. 36, $\times 69\ 500$.

des "vésicules golgiennes" à partir desquelles se formera le filament polaire. La première manifestation de l'élaboration du filament polaire, est l'apparition dans le cytoplasme du jeune sporoblaste et près du noyau, d'une "cavité" de diamètre variable et inégal à contenu mal défini. Cette "cavité" qui pourrait résulter de la fusion de ces "vésicules" et de cisternes du reticulum endoplasmique évoluera par la suite en sac polaire. Elle semble l'équivalent du canal intraprotoplasmique décrit chez *Plistophora debaiesi* (50) et elle est en relation avec une grande vacuole provenant également du reticulum endoplasmique. Cette "cavité"

toujours située dans une dépression de l'enveloppe nucléaire est en relation, par sa face opposée au noyau, avec des petites vésicules anastomosées et à contenu dense, constituant un reticulum vésiculeux golgien. Celui-ci à l'origine du filament polaire proprement dit, pourrait provenir du reticulum endoplasmique. Il est donc possible que la zone centrale dense du filament provienne de la condensation du contenu de ces "vésicules." D'après Weidner (61), chez *Nosema* sp. le filament polaire aurait une double origine: condensation de matériel dense dans des saccules golgiens et enveloppement de celui-ci par du reticulum

endoplasmique. Le contenu central du filament apparaît dans des saccules cytoplasmiques du jeune sporoblaste, ce qui peut rappeler ce qu'ont décrit Vávra (47), Manier & Maurand (24) et Lom & Corliss (22); puis une membrane interne encercle ce matériel et une membrane externe élaborée à partir du reticulum endoplasmique enveloppe le tout. Lom & Corliss (22) pensent également que le filament polaire tire vraisemblablement son origine de la fusion et de la condensation du reticulum endoplasmique. Dans le cas envisagé ici, nous n'avons jamais pu observer de relation entre la membrane externe du filament et le reticulum endoplasmique, et le complexe golgien présente un tout autre aspect. Youssef & Hammond (64) pensent également que le filament polaire de *Nosema apis* a une double origine: golgienne et ergastoplasmique. Szollosi (44), chez *Pleistophora sp.* décrit le filament polaire comme dérivant d'un complexe golgien archaïque provenant du reticulum endoplasmique hypertrophié dont les membranes parallèles "s'interconnectent," tandis que du matériel dense apparaît dans leur lumière. D'après les observations de Jensen & Wellings (15) le filament polaire de *G. stephani* serait formé à partir de matériel nucléaire et de produits de sécrétion des cisternes périmoléaires, du reticulum endoplasmique et du complexe golgien. Selon ces auteurs, le filament polaire se différencie en 3 séquences: la base du filament (qui se raccordera au sac polaire), apparaît en premier, issu d'un corps dense d'origine nucléaire. Puis la partie antérieure du filament se forme à partir de matériel dense localisé dans des cisternes périmoléaires et dans du reticulum endoplasmique. Ces 2 parties du filament progressent l'une vers l'autre et fusionnent, et finalement la partie postérieure du filament polaire s'élabore à partir de la région postérieure du complexe golgien, dont la région antérieure serait à l'origine du sac polaire. L'intervention de matériel nucléaire dans la formation du filament polaire avait déjà été signalée, en microscopie photonique, par Gibbs chez *Gurleya sp.* (10) où le filament se formerait à partir d'un granule chromatique d'origine nucléaire. Le problème du rôle du noyau dans la différenciation du filament polaire est donc posé. Chez *N. vivieri*, la différenciation de cet organite ne semble pas s'effectuer en étapes aussi bien définies que chez *G. stephani* (15). Tout le filament polaire proprement dit se forme à partir du complexe vésiculeux golgien même sa partie basale située près du sac polaire. Il faut cependant constater que, d'une part ce sac polaire apparaît vraisemblablement en premier mais il ne nous est pas possible d'en préciser l'origine exacte, et d'autre part il est toujours situé près du noyau, mais nous n'avons jamais observé de figures pouvant laisser supposer que le sac polaire dérive de matériel nucléaire; d'ailleurs celui-ci n'est limité que par une seule membrane unitaire alors que l'enveloppe nucléaire en comporte deux. Ici le noyau joue peut-être un rôle dans la genèse du filament, en particulier du sac polaire, mais si rôle il y a, celui-ci est probablement indirect et actuellement il ne nous est pas possible de le définir clairement.

A sa formation, le filament polaire a un diamètre d'environ 110-120 nm, alors que dans la spore ce diamètre n'est plus que de 100 nm. De même dans la spore, ce filament n'est limité que par une seule membrane unitaire comme chez d'autres microsporidies. Du point de vue structural nous n'avons pas observé de filament dévaginé et nous ne pouvons supposer comme Lom (21) que les 3 couches osmiophiles sont en fait des membranes. Nous avons également vu qu'en se différenciant, la zone externe du filament était constituée de 2 membranes. Il semble donc qu'une membrane de ce filament (la plus externe) disparaisse lors de la transformation du sporoblaste en spore. Ceci pourrait expliquer la diminution de diamètre du filament dans la spore.

Le Polaroplaste Lamellaire.—Le polaroplaste, décrit pour la

ière fois par Huger (13), apparaît dans le sporoblaste lorsque le filament polaire est entièrement élaboré et que le sac polaire a migré au pôle antérieur du sporoblaste. Il faut remarquer que dès que le polaroplaste est formé, le filament polaire a acquis sa structure définitive c'est-à-dire qu'il n'est plus limité que par une seule membrane unitaire. De même la grande vacuole initiale semble avoir disparu ou s'être résorbée. Cependant le problème de la formation exacte de ce polaroplaste lamellaire n'est pas encore résolu. D'après Szollosi (44), ce polaroplaste représente les restes "réorganisés" du complexe membranaire golgien; de même pour Jensen & Wellings (15), il se formerait à partir de la région antérieure du complexe golgien. Vávra (48) et Sprague & Vernick (40) pensent que l'arrangement du polaroplaste serait associé à la synthèse du filament polaire. D'après Weidner (61), il serait élaboré par le reticulum endoplasmique; les travaux de Maurand (25), Lom & Corliss (22), Sprague et coll. (42), Coste-Mathiez & Manier (9) vont également dans ce sens. En ce qui nous concerne, la rapidité de la mise en place du polaroplaste lamellaire ne permet pas de voir la relation entre le reticulum endoplasmique et le polaroplaste; cependant elle ne l'exclut pas. Il n'est également pas impossible que le système membranaire du polaroplaste lamellaire soit en relation avec le système membranaire externe du filament et de cette grande vacuole. Ce système membranaire pourrait alors se placer en "plis d'accordéon" autour de la base du filament sous le sac polaire; cette disposition peut d'ailleurs rappeler ce qu'a décrit Weidner chez *Nosema sp.* (61) et *Nosema lophii* (62). Ceci n'est cependant qu'une simple hypothèse et nos observations actuelles ne nous permettent pas de le démontrer. Le problème de l'origine exacte de ce polaroplaste lamellaire reste donc posé.

Le rôle de ce polaroplaste n'est pas défini; peut-être sert-il de charpente au filament polaire, ou plus vraisemblablement comme l'ont déjà suggéré Lom & Vávra (23), joue-t-il un rôle plus actif dans l'évagination du filament: en effet ces auteurs ont observé un gonflement du polaroplaste avant l'extrusion du filament. Ce gonflement pourrait provoquer une augmentation de pression dans la spore et amorcer ainsi la sortie du filament polaire.

La vacuole postérieure.—Cette "vacuole," située au pôle du sporoblaste puis de la spore, opposé au sac polaire, a déjà été observée chez d'autres microsporidies. Cependant tous les auteurs ne l'ont pas mentionnée dans leurs observations. Elle serait l'équivalent de ce que Sprague et coll. (42) ont dénommé "inclusion body" chez *Nosema sp.*, ou de la "posterior vesicle" décrite par Ishihara (14) chez *Nosema bombycis*. Schubert (35, 36) chez *H. finki* parle également d'une vacuole postérieure, peu dense, non délimitée par une membrane et contenant du matériel dégénéré. Dans notre cas, cette vacuole est limitée dans la spore, comme le filament, par une membrane unitaire. Comme elle se forme également à partir de vésicules golgiennes, il est possible que son contenu soit très proche de celui du filament (ils paraissent d'ailleurs être aussi "osmiophiles" l'un que l'autre), et on peut alors se demander si elle n'est pas en relation avec l'extrémité du filament (extrémité dont la structure n'a encore jamais été observée jusqu'ici) mais si cela était, elle pourrait également jouer un rôle dans l'extrusion du filament polaire. D'ailleurs selon Weidner chez *N. lophii* (62) le filament polaire passe dans la vacuole postérieure.

La Paroi et la Limite Hôte-Parasite.—Chez *Nosemoides vivieri*, pendant une grande partie du cycle, la cellule n'est limitée que par une seule membrane unitaire; celle-ci est en contact direct avec le cytoplasme de l'hôte et sans aucune relation avec lui, contrairement à d'autres Nosematidae qui sont isolées dans une vacuole; cette paroi ne commence à s'épaissir que chez les

sporoblastes âgés, en fin d'évolution. Chez *Nosema apis* (64), il en est de même, mais autour de la cellule-parasite, il y a toujours, en certains endroits, concentration d'organites de la cellule-hôte, et principalement des mitochondries. Chez *Nosema algerae* (49), dès les plus jeunes stades, une couche dense de matériel amorphe recouvre la membrane unitaire comme chez la *Nosema* sp. du crabe *Callinectes sapidus* (42, 61), où le sporoblaste est recouvert d'une pellicule extramembranaire dense avec des microtubules disposés perpendiculairement à la surface du parasite; chez *Telomyxa glugeiformis* (7), une couche, constituée de petites vésicules ou de cisternes irrégulières aplaties, qui peuvent même être en contact avec la membrane du schizonte, entoure ce dernier. Chez les *Metchnikovellidae* (11, 55, 59), les sporoblastes se trouvent dans une "vacuole parasitaire" considérée comme un pansporoblaste. Le développement d'*Encephalitozoon cuniculi* (1, 41) se fait dans une vacuole de la cellule-hôte. Chez *Glugea* sp. (39), la membrane de la future "vacuole de sporogenèse" entoure tout le parasite, ceci étant caractéristique des stades de plasmodes. Chez *Nosemoides vivieri*, il n'y a pas de stade plasmodial comme chez les *Metchnikovella* (11, 55, 59) ou autres microsporidies du genre *Glugea* (39), *Pleistophora* (44) ou *Plistophora* (22, 25), *Tuzetia* (26), *Mrazekia* (34), *Caudospora* (48), *Thelohania* (24, 47), *Heterosporus* (36); cependant si nous avons observé des stades à 2 ou plusieurs noyaux, il est vraisemblable que cela est dû à un décalage entre caryodièrese plutôt qu'à l'existence d'un véritable stade plasmodial; les stades à plusieurs noyaux sont éphémères puisqu'à chaque fois que nous les avons observés les sporoblastes étaient presque individualisés.

Nous n'avons pas vu les tubules que Vávra a décrits dans le pansporoblaste du genre *Thelohania* (47), ni les microtubules pelliculaires observés sur la couche externe de la paroi des spores de *Nosema nelsoni* par Sprague & Vernick (40), de *Nosema* sp. par Weidner (61), de *P. debaisieuxi* (47) par Vávra. Chez *Nosemoides vivieri*, nous avons trouvé entre les sporoblastes issus des divisions d'un même schizonte uninucléé, des formations plus ou moins vésiculaires et peut-être même tubulaires rappelant celles décrites par Vávra chez *Pleistophora simulii* et *Thelohania corethrae* (47). L'origine de ces formations qui apparaissent principalement lors de l'individualisation des sporoblastes est inconnue. Les sporoblastes issus d'une même forme uninucléée sont souvent disposés en "rosettes" ou en "chaînes" et sont tous au même stade de développement (il y aura d'ailleurs synchronisme dans leur évolution ultérieure). Ce phénomène a également été constaté par Jensen & Wellings chez *G. stephani* (15).

En fin d'évolution, la paroi du sporoblaste s'épaissit par apposition d'une couche de matériel dense sur la face externe de la membrane cytoplasmique, en contact direct avec le cytoplasme de l'hôte. La provenance de ce matériel dense est inconnue; est-il directement synthétisé par le parasite, ou bien dérive-t-il de substances métabolisées par la cellule-hôte; la question reste posée.

D'autre part, un caractère cytologique important des microsporidies est l'absence de réserves et surtout de mitochondries; ceci certainement est en rapport avec le mode de vie anaérobie de ces parasites. On peut donc supposer que le parasite tire son énergie d'une autre façon et aux dépens de l'hôte.

Les formes végétatives de *Nosemoides vivieri*, limitées par une simple membrane cellulaire classique sont en contact direct avec le cytoplasme de l'hôte; nous n'avons pas observé, au niveau de la membrane du parasite, de structures pouvant témoigner de l'existence d'échanges hôte-parasite. Vivier & Schrével (59) ont décrit, chez *Metchnikovella hovassei* des digitations de la paroi du parasite accolées à certaines structures du cytoplasme de l'hôte,

suggérant une absorption directe d'éléments nutritifs de l'hôte par le parasite. Weidner (61) constate que les formes végétatives de *Nosema* sp. sont souvent entourées de cisternes du reticulum endoplasmique des hémocytes dans lesquels elles se trouvent. Youssef & Hammond (64) observent une accumulation des mitochondries de la cellule-hôte à la surface des jeunes schizontes de *Nosema apis*. Sprague & Vernick ont observé une continuité entre la membrane cellulaire des jeunes stades de *Glugea weissenbergi* (39) et le reticulum endoplasmique de la cellule-hôte. Lom & Corliss (22) suggèrent que chez *P. hyphesobryconis* les réactions enzymatiques se situeraient au niveau de "petits assemblages de lamelles ergastoplasmiques et de vésicules à surface lisse." Vivier & Schrével (59) pensent que *M. hovassei* "tire son énergie d'un phénomène de glycolyse anaérobie à partir du glucose puisé chez l'hôte."

Observations sur la Position Systématique de la Microsporidie *Nosemoides vivieri* nomen novum

Un problème important qui apparaît au sujet de cet hyperparasite concerne la détermination générique car il touche à la fois le cycle et la cytologie. En effet la détermination des microsporidies était basée sur des critères établis à partir de la microscopie photonique, lesquels ont été complètement bouleversés par les apports de la microscopie électronique, si bien qu'aujourd'hui, les critères relatifs au cycle et ceux relatifs à la structure des différents stades ne sont pas toujours concordants. Par ailleurs, les observations ultrastructurales sur les microsporidies sont encore très insuffisamment avancées pour permettre d'avoir une vue nette et claire des éléments à prendre en considération.

Dans un premier temps, nous avons proposé pour cette microsporidie nouvelle, parasite de la grégarine *Lecudina linei* n. sp. (de l'intestin du Nemerte *Lineus viridis*), le nom de *Nosema vivieri* (53, 54). En se référant au chapitre sur les microsporidies d'après Poisson (32), et suivant les essais de classification de Kudo (17), Tuzet et coll. (46), Sprague (38), il semblait que ce parasite soit une Nosematidae du genre *Nosema*.

Le genre *Nosema* est en effet caractérisé par l'existence d'un seul filament polaire dans la spore plus ou moins ovoïde ou piriforme, et le fait qu'un seul sporoblaste forme toujours une seule spore. La famille des Nosematidae est "apansporoblastique" et la sporogonie de cette espèce s'effectue également sans pansporoblaste, et nous n'avons jamais observé de stade plasmodial.

Cependant en microscopie électronique, chez diverses *Nosema* comme *N. bombycis* (14, 45), *N. apis* (64), *N. sp.* (61), *N. nelsoni* (40), *N. orthocladii* (9), *N. locustae* (13), *N. cuniculi* (31), *N. algerae* (49), *N. whitei* (28), les auteurs ont décrit, après la forme uninucléée, un stade à "diplocaryon" (c'est-à-dire 2 noyaux accolés) qui peut subsister pendant le reste du cycle. Selon Cali (4), ce diplocaryon serait caractéristique du genre *Nosema*, bien qu'une telle structure ait été aussi observée chez *Pleistophora* sp. (*Pleistophoridae*) (44) et chez *Hessea squamosa* (30). Dans notre cas nous n'avons jamais observé de diplocaryon. Il apparaît donc que, de ce point de vue, cette microsporidie ne puisse être une *Nosema*. D'autre part les sporoblastes sont toujours uninucléés ce qui pourrait rapprocher cette espèce du genre *Encephalitozoon* mais chez celui-ci le parasite se trouve toujours dans une vacuole de la cellule-hôte. Selon Sprague (38) les microsporidies du genre *Nosema* forment des sporoblastes par paires et il faut alors les considérer comme des espèces disporées (et non plus monosporées), ceci suivant le fait que 2 sporoblastes fils proviennent de la division d'une même cellule-mère. En ce qui concerne l'espèce étudiée ici, il est difficile de

dire s'il en est de même, car si nous observons des groupes de jeunes sporoblastes (qui sont au même stade de développement), il n'est pas possible de dire s'ils proviennent d'une même cellule-mère ou de plusieurs cellules s'étant divisées en même temps. Dans le 1er cas, on aurait alors une espèce "plurisporée" et dans le 2e, une espèce "disporée." D'autre part, une espèce "plurisporée" laisse suggérer l'existence d'un stade plasmodial. Or ce stade ne paraît pas exister dans le cas envisagé ici, à moins qu'il soit très fugace. Il est certain que nous avons observé des stades à plusieurs noyaux, mais ceux-ci ne ressemblaient pas à des plasmodies, et nous pensions qu'ils étaient dû à un retard de la cytotidière par rapport à la caryotidière.

C'est pourquoi cette espèce ne peut être rapprochée du genre *Perezia* qui présente selon Léger & Duboscq (20) des "schizontes plasmodiaux;" de plus, ce dernier genre n'a encore fait l'objet d'aucune étude ultrastructurale et on ne sait pas s'il possède 1 ou 2 noyaux (diplocaryon).

Par conséquent, il apparaît fort probable de par son originalité, que le parasite dénommé initialement *Nosema vivieri* ne puisse plus faire partie du genre *Nosema*, la raison essentielle étant l'absence, à quel stade que ce soit, de diplocaryon. Cela justifie donc la substitution du genre nouveau *Nosemoides* au genre *Nosema*. Actuellement, les critères de la systématique ne sont pas suffisamment bien définis et évoluent sans cesse avec les données nouvelles apportées par les études ultrastructurales. C'est pourquoi, en absence de données comparatives étendues et valables, il nous semble prudent de conserver, au moins à titre provisoire, ce nouveau genre dans la famille des Nosematidae, ceci dans l'attente de données équivalentes sur les autres genres et espèces de microsporidies.

Nosemoides gen. n.

Diagnose.—Parasite uninucléé toujours en contact direct avec le cytoplasme de l'hôte (à quel stade que ce soit); absence de stade plasmodial; schizogonie aboutissant à la formation de sporoblastes souvent disposés en "rosettes" ou en "groupes," chaque sporoblaste évoluant en une seule spore.

Nosemoides vivieri

Diagnose.—Microsporidie à spores ovoïdes (2,5-3 µm sur 1-1,5 µm) munies d'un filament polaire; absence de stade plasmodial et de pansporoblaste.

Hôte.—La grégarine *Lecudina linei* Vinckier, parasite intestinal du Nemerte *Lineus viridis* (Fabricius) Johnston.

REFERENCES

- Akao S. 1969. Studies on the ultrastructure of *Nosema cuniculi*, a microsporidian parasite of rodents. *Jpn. J. Parasitol.* 18, 8-20.
- Awerinzew S. 1908. Ueber die Gregarinen aus dem Darne von *Amphiporus* sp. *Zool. Anz.* 33, 685-7.
- 1909. Studien über parasitische Protozoan. III—Beobachtungen über die Vorgänge der Schizogonie bei Gregarinen aus dem Darne von *Amphiporus* sp. *Arch. Protistenk.* 16, 71-80.
- Cali A. 1970. Morphogenesis in the genus *Nosema*. *Proc. 4th Internat. Colloq. Insect. Path., Maryland*, pp. 431-8.
- Caulley M, Mesnil F. 1897. Sur un type nouveau (*Metchnikovella* n. g.) d'organismes parasites des grégaires. *C. R. Soc. Biol.*, 10e série, 4, 960-2.
- Codreanu R. 1967. Sur une microsporidie nouvelle hyperparasite d'une grégarine du genre *Enterocystis* et le statut systématique de la famille des Enterocystidae Margareta Codreanu 1940, propres aux Ephémères. *Protistologica* 3, 351-2.
- , Vávra J. 1970. The structure and ultrastructure of the microsporidian *Telomyxa glugeiformis* Leger and Hesse 1910, parasite of *Ephemera danica* (Müll.) nymphs. *J. Protozool.* 17, 374-84.
- Corbel JC. 1967. *Metchnikovella martojai* n. sp. (microsporidie Metchnikovellidae), parasite d'une grégarine de gryllide. *Protistologica* 3, 365-8.
- Coste-Mathiez F, Manier JF. 1968. *Nosema orthocladii* n. sp. (*Microsporidia-Nosematidae*) parasite of *Orthocladus lignicola* larvae (Diptera—Chironomidae). *Bull. Soc. Zool. Fr.* 93, 127-33.
- Gibbs AJ. 1953. *Gurleya* species (*Microsporidia* found in the gut tissue of *Trachea secalis*) (Lepidoptera). *Parasitology* 43, 143-7.
- Hildebrand H, Vivier E. 1971. Observations ultrastructurales sur le sporoblaste de *Metchnikovella wohlfarthi* n. sp. (Microsporidies), parasite de la grégarine *Lecudina tuzetae*. *Protistologica* 7, 131-9.
- Hollande A. 1972. Le déroulement de la cryptomitose et les modalités de la ségrégation des chromatides dans quelques groupes de protozoaires. *Année Biol.* 11, 427-66.
- Huger A. 1960. Electron microscope study on the cytology of a microsporidian spore by means of ultrathin sectioning. *J. Insect Pathol.* 2, 84-105.
- Ishihara R. 1970. Fine structure of *Nosema bombycis* (Microsporidia, Nosematidae), developing in the silkworm *Bombyx mori* L. *Bull. Coll. Agr. Vet. Med., Nihon Univ.* 27, 84-91.
- Jensen HM, Wellings SR. 1972. Development of the polar filament-polaroplast complex in a microsporidian parasite. *J. Protozool.* 19, 297-305.
- Kessel RG. 1971. Origin of the Golgi apparatus in embryonic cells of the grasshopper. *J. Ultrastruct. Res.* 34, 260-75.
- Kudo RR. 1924. A biologic and taxonomic study of Microsporidia. *Ill. Biol. Monogr.* 9, 1-268.
- , Daniels EW. 1963. An electron microscope study of the spore of a microsporidian *Thelohania californica*. *J. Protozool.* 10, 112-20.
- Léger L, Duboscq O. 1909. Sur une microsporidie parasite d'une grégarine. *C. R. Acad. Sci. Paris* 138, 733-4.
- 1909. *Perezia lankesteriae* n. g. n. sp. microsporidie parasite de *Lankesteria ascidia* (Ray Lank). *Arch. Zool. Exp. Gen.*, 5e série 1, Notes et Revue 3, LXXXIX-XCIII.
- Lom J. 1972. On the structure of the extruded microsporidian polar filament. *Z. Parasitenk.* 33, 200-13.
- , Corliss JO. 1967. Ultrastructural observations on the development of the microsporidian protozoon *Plistophora hypheosobryconis* Schaperclaus. *J. Protozool.* 14, 141-52.
- , Vávra J. 1963. The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores. *Acta Protozool.* 1, 81-90.
- Manier JF, Maurand J. 1966. Sporogonie de deux microsporidies de larves de *Simulium*: *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913) et *Plistophora simulii* (Lutz et Splendore, 1904). *J. Protozool.* 13 (Suppl.), 39.
- Maurand J. 1966. *Plistophora simulii* (Lutz et Splendore, 1904), microsporidie parasite des larves de *Simulium*: cycle, ultrastructure, ses rapports avec *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913). *Bull. Soc. Zool. Fr.* 91, 621-30.
- , Fize A, Fenwick B, Michel R. 1971. Etude au microscope électronique de *Nosema infirmum* Kudo 1921, microsporidie parasite d'un copépode cyclopoïde: création du genre nouveau *Tuzetia* à propos de cette espèce. *Protistologica* 7, 221-5.
- , Fize A, Michel R, Fenwick B. 1972. Quelques données sur les microsporidies parasites de copépodes cyclopoïdes des eaux continentales de la région de Montpellier. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 97, 707-17.
- Milner RJ. 1972. *Nosema whitei*, a microsporidian pathogen of some species of *Tribolium*. II. Ultrastructure. *J. Invert. Pathol.* 19, 239-47.
- Montgomery TH. 1898. Comparative cytological studies with especial regard to the morphology of the nucleolus. *J. Morphol.* 15, 265-582.
- Ormières R, Sprague J. 1973. A new family, new genus and new species allied to the Microsporida. *J. Invert. Pathol.* 21, 224-40.
- Petri M, Schidt T. 1966. On the ultrastructure of *Nosema cuniculi* in the cells of Yoshida rat ascites sarcoma. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 66, 437-46.
- Poisson R. 1953. Ordre des Microsporidies, in Grassé PP, ed., *Traité de Zoologie*, Masson et Cie Paris, 1, fasc. 2, 1042-70.
- DePuytorac P. 1961. L'ultrastructure du filament polaire invaginé de la microsporidie *Mrazekia lumbriculi* Jirovec, 1936. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 253, 2600-2.
- 1962. Observations sur l'ultrastructure de la microsporidie *Mrazekia lumbriculi* Jirovec. *J. Microsc.* 1, 39-46.

35. Schubert G. 1969. Ultracytologische Untersuchungen an der Spore der Mikrosporidienart *Heterosporis finki*, gen. n., sp. n. *Z. Parasitenk.* **32**, 59-79.
36. ——— 1969. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Sporoten und Sporentwicklung der Mikrosporidienart *Heterosporis finki*. *Z. Parasitenk.* **32**, 80-92.
37. Sprague V. 1968. The Golgi complex of Microsporidia and its role in spore morphogenesis. *Am. Zool.* **8**, 823-4.
38. ——— 1972. Classification of the Microsporidia. *469th Meeting of the Helminthological Society of Washington at College Park.*
39. ———, Vernick SH. 1968. Light and electron microscope study of a new species of *Glugea* (Microsporida, Nosematidae) in the 4-spined Stickleback *Apeltes quadracus*. *J. Protozool.* **15**, 547-71.
40. ———, ——— 1969. Light and electron microscope observations on *Nosema nelsoni* Sprague, 1950 (Microsporida, Nosematidae) with particular reference to its golgi complex. *J. Protozool.* **16**, 264-71.
41. ———, ——— 1971. The ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporida, Nosematidae) and its taxonomic significance. *J. Protozool.* **18**, 560-9.
42. ———, ———, Lloyd BJ. 1968. The fine structure of *Nosema* sp. Sprague 1965 (Microsporida, Nosematidae) with particular reference to stages in sporogony. *J. Invert. Pathol.* **12**, 105-17.
43. Stanier JE, Woodhouse MA, Griffin RL. 1968. The fine structure of the spore of *Nosema spelotremae*, a microsporidian parasite of a *Spelotrema metacercaria* encysted in the crab *Carcinus maenas*. *J. Invert. Pathol.* **12**, 73-82.
44. Szollosi D. 1971. Development of *Pleistophora* sp. (Microsporidian) in eggs of the polychaete *Armandia brevis*. *J. Invert. Pathol.* **18**, 1-15.
45. Takizawa H, Vivier E, Petitprez A. 1973. Développement intranucléaire de la microsporidie *Nosema bombycis* dans les cellules de vers à soie après infestation expérimentale. *C. R. Acad. Sci. Paris* **277**, 1769-72.
46. Tuzet O, Maurand J, Fize A, Michel R, Fenwick B. 1971. Proposition d'un nouveau cadre systématique pour les genres des microsporidies. *C. R. Acad. Sci. Paris, ser. D*, **272**, 1268-71.
47. Vávra J. 1965. Etude au microscope électronique de la morphologie et du développement de quelques microsporidies. *C. R. Acad. Sci. Paris* **261**, 3467-70.
48. ——— 1968. Ultrastructural features of *Caudospora simulii* Weiser (Protozoa: Microsporidia). *Folia Parasitol.* **15**, 1-9.
49. ———, Undeen AH. 1970. *Nosema algerae* n. sp. (Cnidospora, Microsporida) a pathogen in a laboratory colony of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera, Culicidae). *J. Protozool.* **17**, 240-9.
50. ———, Joyon L, DePuytorac P. 1966. Observations sur l'ultrastructure du filament polaire des microsporidies. *Protistologica* **2**, 109-12.
51. Vernick SH, Sprague V, Lloyd BJ Jr. 1969. Further observations on the fine structure of the spores of *Glugea weissenbergi* (Microsporida, Nosematidae). *J. Protozool.* **16**, 50-3.
52. Vinckier D. 1973. Etude des cycles et de l'ultrastructure de *Lecudina linei* n. sp. (grégarine parasite de némerite) et de son parasite, la microsporidie *Nosema vivieri* (Vinckier, Devauchelle et Prensier). *Thèse Doctorat 3e cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille.*
53. ———, Devauchelle G, Prensier G. 1970. *Nosema vivieri* n. sp. (Microsporidae, Nosematidae) hyperparasite d'une grégarine vivant dans l'intestin d'un Némerte. *C. R. Acad. Sci. Paris* **270**, 821-3.
54. ———, ———, ——— 1971. Etude ultrastructurale du développement de la microsporidie *Nosema vivieri* (Vinckier, Devauchelle et Prensier, 1970). *Protistologica* **7**, 273-87.
55. Vivier E. 1965. Etude, au microscope électronique, de la spore de *Metchnikovella hovassei* n. sp.; appartenance des Metchnikovellidae aux microsporidies. *C. R. Acad. Sci. Paris* **260**, 6982-4.
56. ——— 1966. Observations ultrastructurales sur la microsporidie *Metchnikovella hovassei* Vivier. *J. Protozool.* **13** (Suppl.), 41.
57. ——— 1974. Les microsporidies des protozoaires, in Sprague V, Vávra J, eds., *Biology and Systematics of the Microsporidia*, Academic Press, New York, in press.
58. ———, Petitprez A. 1972. Données ultrastructurales complémentaires, morphologiques et cytochimiques, sur *Toxoplasma gondii*. *Protistologica* **8**, 199-221.
59. ———, Schrével J. 1973. Etude, en microscopie photonique et électronique, de différents stades du cycle de *Metchnikovella hovassei* et observations sur la position systématique des Metchnikovellidae. *Protistologica* **9**, 95-118.
60. ———, Petitprez A, Landau I. 1972. Observations ultrastructurales sur la sporoblastogenèse de l'hémogrégarine *Hepatozoon domerquei*, Coccidie Adeleidea. *Protistologica* **8**, 315-33.
61. Weidner E. 1970. Ultrastructural study of microsporidian development. I. *Nosema* sp. Sprague 1965 in *Callinectes sapidus* Rathbun. *Z. Zellforsch.* **105**, 33-54.
62. ——— 1972. Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. *Z. Parasitenk.* **40**, 227-42.
63. Weiser J. 1959. *Nosema laphygamae* n. sp. and the internal structure of the microsporidian spore. *J. Insect. Pathol.* **1**, 52-9.
64. Youssef NN, Hammond DM. 1971. The fine structure of the developmental stages of the microsporidian *Nosema apis* Zander. *Tissue & Cell* **3**, 283-94.

D - Remarques sur la position systématique de la microsporidie

Nosemoides vivieri

Le cycle de la microsporidie *Nosemoides vivieri*, hyperparasite de la grégarine *Lecudina linei* (VINCKIER, 1972) se déroule en totalité au contact direct du cytoplasme-hôte. Il s'agit donc bien d'une microsporidie apansporoblastique. Les différents stades de développement sont toujours uninucléés et ne présentent jamais de diplocaryon. Cependant si les formes multinucléés observées font penser à des formes plasmodiales, elles sont plutôt dues au décalage entre caryocinèse et cytodierèse ou au fait que plusieurs caryocinèses peuvent se produire avant qu'il n'y ait cytodierèse. Mais la présence de sporoblastes au même stade d'évolution, disposés en rosette ou en groupe, peut laisser supposer le caractère polysporé de cette microsporidie. Chaque sporoblaste évolue directement en spore.

Le genre *Nosemoides* VINCKIER 1975 a donc été créé pour cette microsporidie initialement placée dans le genre *Nosema* Nägeli 1857 (VINCKIER et Coll., 1970, 1971) sous le nom de *Nosema vivieri*, et placé, au moins à titre provisoire, dans la famille des *Nosematidae* (VINCKIER 1975). Mais l'absence de diplocaryon tout au long du cycle et son caractère polysporé écarte définitivement le genre *Nosemoides* du genre *Nosema* Nägeli 1857 dont les deux principales caractéristiques sont selon CALI (1971) et SPRAGUE (1978), la présence d'un diplocaryon et le caractère disporé. De même, il semble difficile de maintenir ce genre dans la famille des *Nosematidae* Labbé 1899 caractérisée, selon SPRAGUE (1977) par la présence, au moins au stade sporoblaste, d'un diplocaryon. D'après cet auteur, cette famille ne comprendrait que les genres *Nosema*, *Ameson* et *Ichthyosporidium*.

La création de ce nouveau genre *Nosemoides* a été justifiée et confirmée par l'étude ultrastructurale de *Nosemoides simocephali* (LOUBES et AKBARIEH 1977), puis de *Nosemoides tilapiae* (SAKITI et BOUIX 1987), ces auteurs basant leur détermination sur le

développement au contact direct du cytoplasme-hôte, l'absence de diplocaryon et le caractère polysporé du parasite. Dans leur discussion, LOUBES et AKBARIEH (1977) ont été amenés à rapprocher le genre *Nosemoides* du genre *Unikaryon* créé par CANNING, LAI et LIE (1974) à propos d'une microsporidie, *Unikaryon piriformis*, parasite de larves d'un trématode de Malaisie et alors également classée parmi les *Nosematidae*. LOUBES et AKBARIEH (1977) proposent donc de regrouper les genres *Unikaryon* et *Nosemoides*, qui sont apansporoblastiques et dépourvus de diplocaryons, dans une <<nouvelle unité taxonomique>> qui n'existe ni dans le <<cadre systématique>> de TUZET et Coll. (1971), ni dans la classification de SPRAGUE (1970, 1972). Cependant cet auteur (SPRAGUE, 1977) dans sa <<Classification and Phylogeny of the Microsporida>>, créé la famille des *Unikaryonidae* regroupant les genres *Unikaryon*, *Nosemoides* et *Perezia*. Il définit cette nouvelle famille qui comporte des parasites à caractère polysporé ou disporé, comme sporulant en contact direct avec le cytoplasme de la cellule-hôte et dont les sporoblastes sont uninucléés et les spores de forme ovoïde. CANNING et Coll. (1974) ont créé et défini le genre *Unikaryon* à partir d'observations faites en microscopie photonique, genre confirmé aussitôt après par CANNING et NICHOLAS (1974), aussi bien en microscopie photonique qu'électronique, à propos de *Unikaryon legeri* (DOLLFUS, 1912) initialement nommée *Nosema legeri*, microsporidie à caractère disporé. Ces auteurs signalent cependant la présence fréquente de spores mûres dans des vacuoles parasitophores. Quant au genre *Perezia*, validé définitivement par ORMIERES et Coll. (1977) à propos de l'espèce type *Perezia lankesteriae* LEGER et DUBOSCQ 1909, microsporidie apansporoblastique et de caractère polysporé, il est caractérisé par la présence de diplocaryons pendant la phase schizogonique, alors que les sporoblastes sont uninucléés. Si ces trois genres *Unikaryon*, *Nosemoides* et *Perezia* peuvent être rapprochés notamment par leur ressemblance ultrastructurale, l'absence de pansporoblaste, l'existence de sporoblastes uninucléés et de spores de forme ovoïde, ils paraissent également très différents les uns des autres. VAVRA et Coll. (1981), en analysant les

caractères susceptibles de définir les genres chez les microsporidies, signalent la difficulté à fixer correctement le niveau d'importance de ceux utilisés pour la définition de chaque genre. Si les grandes lignes de la classification (SPRAGUE, 1977; WEISER, 1977) n'évoluent que relativement peu, dans le détail il est probable que la définition des différentes familles et surtout des différents genres continuera d'évoluer au fur et à mesure que des données nouvelles apparaîtront.

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA MICROSPORIDIE *NOSEMA APIS*

INTRODUCTION

La nosérose des abeilles connue depuis longtemps reste néanmoins d'actualité, ne serait-ce que pour son impact économique vis à vis des apiculteurs. Si beaucoup d'auteurs se sont intéressés au cycle et à la cytologie du parasite proprement dit *Nosema apis*, l'épidémiologie de la maladie a également suscité de nombreux travaux, de même que les recherches en vue d'optimiser les conditions de production du miel vont de pair avec une meilleure connaissance des interactions entre l'abeille et son environnement écologique.

Si tous les travaux publiés jusqu'ici concernant la cyto-physiologie ont apporté énormément de données intéressantes quant à la biologie des Microsporidies en général et de *Nosema apis* en particulier, tous les aspects n'en sont pas pour autant épuisés et de nombreux points demandent à être précisés. C'est pourquoi nous avons repris l'étude des différents stades du cycle de *Nosema apis* à la lumière des renseignements apportés par la technique de la cryofracture et comparés à ceux fournis par l'étude ultrastructurale classique.

RESULTATS

Si certaines microsporidies, chez leurs hôtes respectifs, peuvent infester différents tissus et organes, *Nosema apis* par contre, ne semble parasiter que les cellules de l'intestin moyen de l'abeille *Apis mellifica* L. (WEISER, 1978).

Le cycle de toute microsporidie débute avec la pénétration, dans une cellule-hôte, du sporoplasme représentant le stade infestant, et se termine avec la différenciation des spores permettant la dissémination de la maladie mais pouvant également être considérées comme des formes de résistance abritant le sporoplasme. Ce cycle comprend deux phases distinctes : la phase végétative ou mérogonie (ou schizogonie) avec sporoplasmes et mérontes (ou schizontes) et la phase sporogonique avec sporontes, sporoblastes et spores.

L'observation de coupes ultrafines et de répliques obtenues par cryofracture de cellules épithéliales infestées du mésentéron, montre les principaux stades de développement du cycle du parasite (figs.7 et 8) : mérontes, sporoblastes et spores situés au contact direct du cytoplasme de la cellule-hôte. S'il est possible de rencontrer ces différents stades répartis dans toute la cellule, il arrive souvent que les stades de l'une des deux phases prédominent sur ceux de l'autre phase. Il faut aussi remarquer qu'il est très difficile d'observer le sporoplasme et de distinguer le méronte âgé (ou de dernière génération) du jeune sporonte.

A) La phase végétative ou mérogonie

Après pénétration dans la cellule-hôte, le parasite se multiplie rapidement, et va occuper un volume de plus en plus important de la cellule parasitée . Cette phase végétative est caractérisée par deux stades : le sporoplasme ou stade infestant et surtout les mérontes (ou schizontes) représentant le stade principal de la mérogonie.

1) Le sporoplasme

Ce sporoplasme qui constitue le germe infectieux est injecté, par le filament polaire évaginé de la spore, dans la cellule-hôte. Nous n'avons jamais observé ce stade de durée très brève. Selon ISHIHARA (1968) chez *Nosema bombycis*, WEIDNER (1972) puis WEIDNER et TRAGER (1973) chez *Nosema michaelis*, le sporoplasme ressemble à une cellule très simple contenant l'appareil nucléaire et un peu de cytoplasme, le tout entouré de quelques structures membranaires. WEIDNER (1972) signale un remaniement nucléaire et cytoplasmique dans le sporoplasme après 15 à 20 minutes de séjour dans la cellule-hôte alors que débute la synthèse du réticulum endoplasmique : le sporoplasme se transforme ainsi en méronte et les organites

cytoplasmiques se différencient. WEIDNER et Coll.. (1984) pensent que, chez *Glugea hertwigi* et *Spraguea lophii*, lors de l'évagination du filament polaire, la membrane plasmique limitant le cytoplasme de la spore reste dans celle-ci et le sporoplasme ainsi expulsé doit donc acquérir une nouvelle membrane plasmique qui pourrait alors provenir du polaroplaste. Puis SCARBOROUGH-BULL et WEIDNER (1985) confirment que la surface du sporoplasme expulsé hors de la spore de *Glugea hertwigi* possède bien certaines des propriétés d'une membrane plasmique. Cependant TOGUEBAYE et MARCHAND (1987), chez *Nosema couilloudi*, montrent que le sporoplasme, en quittant la spore, reste limité par une grande partie de la membrane plasmique sporale qui s'est écartée de l'endospore.

2) Les mérontes

a) Structure générale

Les mérontes, répartis dans les cellules épithéliales intestinales, sont en contact étroit avec le cytoplasme-hôte. De forme approximativement sphérique ou ovale, de 4 à 5 μm de diamètre, ils sont limités par une simple membrane plasmique (figs.9 et 10). Les tout jeunes mérontes, comme l'ont remarqué YOUSSEF et HAMMOND (1971), ont une forme moins bien définie et quelque peu amoéboïde et plus le méronte est âgé, plus son contour devient régulier. Le cytoplasme peu dense et pauvre en inclusions, est riche en ribosomes. Chez les jeunes mérontes, le réticulum endoplasmique, encore peu abondant et réparti plus ou moins régulièrement dans la cellule, est parfois dilaté en petites vésicules (fig.9); par la suite ce réticulum se dispose souvent en lignes plus ou moins concentriques autour de l'appareil nucléaire; il peut alors être en relation avec un ou deux amas de petites vésicules à contenu relativement dense, assimilables à un appareil de Golgi primitif : les figs.13, 14, 15 montrent d'ailleurs bien les relations existant entre ce réticulum endoplasmique parfois dilaté et la

membrane externe de l'enveloppe nucléaire d'une part, et avec les vésicules golgiennes d'autre part. Au centre de la cellule se trouve l'appareil nucléaire représenté, comme chez toutes les microsporidies du genre *Nosema*, par un diplocaryon constitué de deux noyaux étroitement accolés. Ce diplocaryon sera d'ailleurs présent dans tous les stades du cycle de *Nosema apis*. Il n'y a ni grains de réserves ni mitochondries, ce qui est typique chez les microsporidies. Le méronte paraît également régulièrement encerclé par du réticulum endoplasmique-hôte (figs.9, 10).

En cryofracture, sur les répliques où la fracture a traversé la cellule suivant n'importe quel plan (fig.11), toutes les structures observées sur coupes ultrafines (figs.9, 10) sont facilement identifiables (figs.11 et 17) : cytoplasme peu dense avec ribosomes, diplocaryon, réticulum endoplasmique, amas de petites vésicules golgiennes, membrane plasmique bordée de réticulum endoplasmique -hôte.

b) La membrane plasmique

La membrane cellulaire est la seule membrane qui sépare le parasite du cytoplasme de la cellule-hôte. Elle est constituée par une membrane plasmique typique, bordée extérieurement, de façon plus ou moins discontinue, par du réticulum endoplasmique-hôte (figs.9, 10).

Sur les répliques obtenues en cryofracture, lorsque la fracture suit le milieu de la membrane plasmique, la surface de l'une ou de l'autre des deux hémimembranes peut alors être observée : la fig.12 montre la face P de la membrane plasmique avec de nombreuses particules intramembranaires de diamètre assez uniforme (7,5 - 10 nm) et assez régulièrement réparties sur toute l'hémimembrane (environ 1440 PIM/ μm^2). La cellule paraît bordée par une "ligne" de granules de diamètre légèrement plus grand (9-11 nm) de signification inconnue (peut-être du réticulum endoplasmique-hôte ?)

c) Le diplocaryon

Chez *Noseana apis*, l'appareil nucléaire est représenté par deux noyaux étroitement accolés constituant le diplocaryon, présent à tous les stades du cycle de développement, comme chez toutes les microsporidies du genre *Nosema* (CALI, 1971; SPRAGUE, 1978). Ces deux noyaux du diplocaryon ont une structure identique (figs. 9, 10, 16) et se comportent de façon totalement synchrone au cours du cycle cellulaire. Chacun d'eux paraît avoir la structure typique du noyau de la cellule eucaryote. Leur forme est plus ou moins ronde, parfois légèrement ovale, avec un diamètre d'environ 1,6 μm . Ils sont cependant plus ou moins aplatis au niveau de la zone d'accolement (figs.9, 10, 16). Chaque noyau possède sa propre enveloppe nucléaire, comme l'avait déjà signalé VAVRA (1965, 1968), constituée de deux membranes, externe et interne, et percée de pores nucléaires, excepté semble-t-il au niveau de la zone de contact entre les deux noyaux. A ce niveau, il apparaît que les rapports entre les deux noyaux sont uniquement des rapports de contiguïté car il ne semble pas y avoir de fusion entre les deux enveloppes nucléaires. En effet au niveau de la zone d'accolement (fig.18), ces deux enveloppes nucléaires forment une zone dense dont l'épaisseur totale peut varier de 30 à 37 nm. A cet endroit les deux enveloppes d'environ 14 à 17 nm d'épaisseur chacune, sont séparées par un espace de 6,5 à 9 nm de large. Il semble que celui-ci soit vide et clair et ne constitue pas comme chez *Ameson michaelis* (WEIDNER, 1970) un étroit pont cytoplasmique. Il apparaît cependant qu'au niveau de l'aire de contact, les enveloppes nucléaires sont moins épaisses (14-17 nm), probablement par réduction de l'espace périnucléaire, que sur le reste du pourtour du noyau où leur épaisseur peut varier de 24 à 30 nm. Le fait que les membranes nucléaires externe et interne, dans cette zone, soient plus rapprochées l'une de l'autre, les fait apparaître plus denses aux électrons comme le soulignent SPRAGUE et Coll. 1968, ORMIERES et SPRAGUE 1973, à la différence près que ces auteurs décrivent les membranes nucléaires comme étant plus épaisses au niveau de la zone d'accolement. YOUSSEF et HAMMOND (1971)

parlent également, chez *Nosema apis*, d'une couche dense au niveau de la zone de contact des deux noyaux, due à la réunion ou à la fusion des enveloppes nucléaires, mais le grossissement de la microphotographie ne semble pas suffisant pour permettre de dire s'il s'agit d'un simple accollement ou d'une véritable fusion des deux enveloppes nucléaires. Cependant tout dernièrement, DARWISH, WEIDNER et FUXA (1989) ont observé, au niveau de la zone d'accellement des deux noyaux du diplocaryon chez *Vairimorpha necatrix*, des pores nucléaires apparemment disposés face à face, laissant supposer l'existence d'un système de "canaux internucléaires" au niveau de ces pores.

La membrane nucléaire externe, parsemée de ribosomes côté cytoplasmique, est en continuité, en certains endroits, avec le réticulum endoplasmique parfois dilaté en une sorte d'ampoule (fig.13). Celui-ci est souvent en relation avec un ou deux amas de petites vésicules à contenu plus ou moins opaque aux électrons, et baignant dans une matrice relativement homogène d'aspect plus dense que le cytoplasme environnant (figs.10, 13, 14, 15), comme l'avaient remarqué YOUSSEF et HAMMOND (1971). Ces amas vésiculaires, souvent situés près des noyaux, sont considérés comme étant un appareil de Golgi de type primitif (VAVRA, 1965).

Le nucléoplasme présente un aspect homogène, surtout chez les jeunes mérontes, avec la chromatine finement dispersée, la lamina n'étant pas visible (figs. 10, 16). Chez des mérontes plus âgés, on peut déjà voir quelques agrégats d'hétérochromatine (figs.9, 25).

Sur les répliques obtenues par cryofracture, le diplocaryon peut être observé suivant différents plans de fracture (figs.11, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24). La fracture peut, soit traverser en toute direction les deux noyaux du diplocaryon et mettre ainsi en évidence le nucléoplasme, soit être tangentielle et fracturer en leur milieu les deux membranes de l'enveloppe nucléaire, soit associer ces deux possibilités. Les différents cas rencontrés sur nos

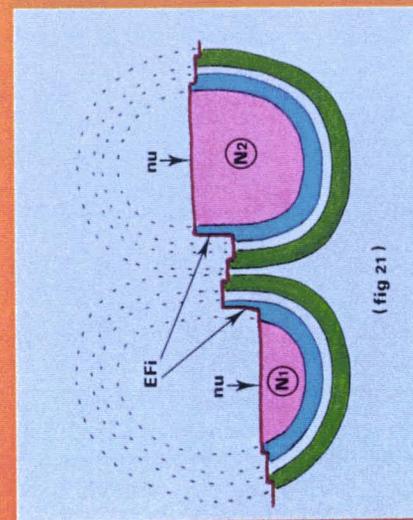
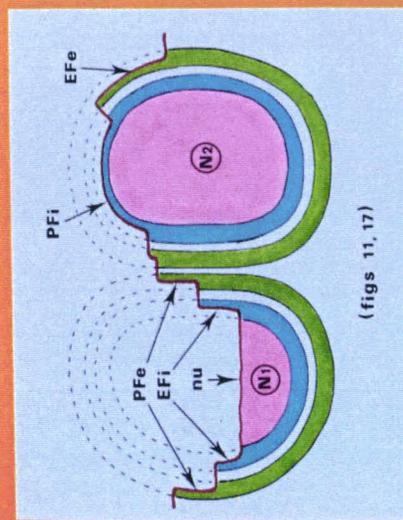
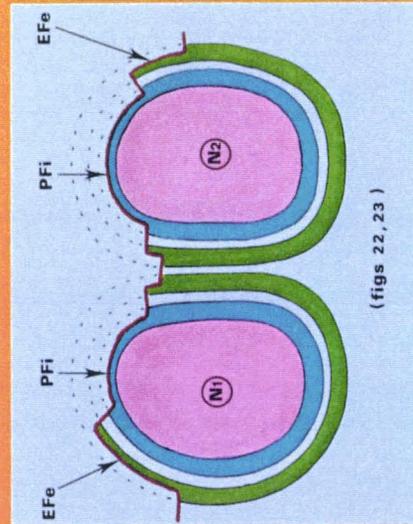
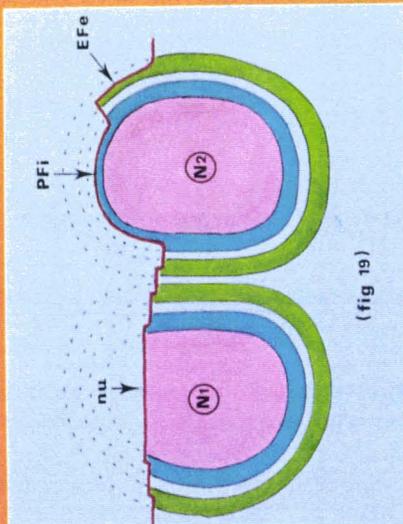
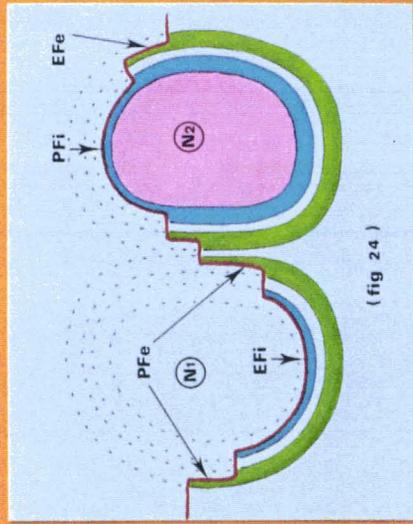
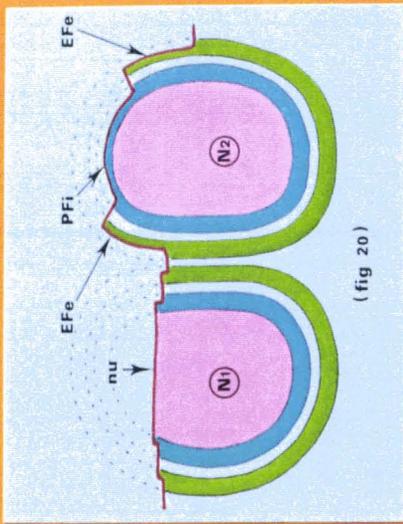


Fig C : Les différents plans de fracture observés au niveau du diplocaryon.

répliques sont illustrés par les schémas ci-joints (Fig. C).

Les principaux constituants du noyau eucaryote typique sont retrouvés chez les noyaux de *Nosema apis* : enveloppe nucléaire et nucléoplasme avec la chromatine et les ribonucléoprotéines. L'enveloppe nucléaire de chaque noyau est constituée de deux membranes nucléaires percées de pores nucléaires plus ou moins nombreux. Les faces fracturées de celles-ci présentent des particules intramembranaires (PIM) d'environ 7-8 nm de diamètre et dont la densité et la répartition varient suivant les faces observées. D'une façon générale les faces E des deux membranes nucléaires paraissent toujours plus lisses que les faces P où les PIM sont beaucoup plus nombreuses (figs.17, 19, 20, 21, 22, 23, 24). LIU (1972) avait remarqué le même phénomène chez la microsporidie *Thelohania bracteata*. Les faces membranaires le plus souvent observées sont la face E de la membrane nucléaire externe (EFe) et la face P de la membrane nucléaire interne (PFi). La figure 23 montre une densité des particules d'environ 368 PIM/ μm^2 sur la face EFe et 1098 PIM/ μm^2 sur la face PFi. Sur la figure 22 la densité des particules est approximativement semblable : 236 PIM/ μm^2 sur EFe et 1178 PIM/ μm^2 sur PFi. Cependant sur cette dernière figure il paraît y avoir une certaine hétérogénéité dans la répartition de ces PIM : en effet vers la zone d'accolement des deux noyaux, les particules sont plus denses (environ 2315 PIM/ μm^2 sur PFi) et régulièrement réparties tandis qu'en s'éloignant de cette zone elles deviennent moins denses (environ 1178 PIM/ μm^2 sur PFi) et sont plus ou moins groupées en paquets alternant avec des zones lisses, dessinant ainsi une sorte de réseau pouvant rappeler les mailles d'un filet. Ceci semble confirmé par la fig.17 où vers la zone d'accolement, toujours sur PFi, les particules sont très denses (environ 2410 PIM/ μm^2) et distribuées de façon homogène, tandis qu'en s'éloignant vers le pôle opposé, on retrouve la répartition en réseau. Ceci paraît constituer un fait intéressant pouvant indiquer que la zone d'accolement des deux noyaux, au niveau de laquelle les pores nucléaires paraissent absents, pourrait constituer un endroit particulièrement actif, et

plusieurs questions peuvent se poser : y aurait-il des échanges entre les deux noyaux au niveau de cette zone ? Comment se fait-il que ces deux noyaux, bien qu'il ne semble pas y avoir de fusion des enveloppes nucléaires, soient indissociables en toute circonstance et durant tout le cycle ? STREETT et HENRY (1987) ont montré que les caryocinèses étaient synchronisées, alors ne peut-on pas penser que toutes les activités de ces deux noyaux le soient aussi; et le fait que les PIM soient beaucoup plus nombreuses au niveau de la zone d'accolement ne serait-il pas dû ou ne favoriserait-il pas cette synchronisation ? Nos observations ne permettent pas de résoudre ces problèmes.

Si les faces EFe et PFi des membranes nucléaires sont relativement faciles à observer, les faces PFe et EFi sont par contre plus difficiles à mettre en évidence et en général, uniquement sur de petites surfaces : les figs. 17, 21, 22 et 24 suggèrent cependant que le nombre de particules intramembranaires serait plus important sur la face PFe que sur la face EFi. La fig.22 semble montrer que la densité des PIM sur EFi, bien que faible, paraît plus importante vers la zone d'accolement que sur le reste du noyau. Sur PFe les particules intramembranaires, en dehors de cette zone, seraient également réparties en paquets disposés en réseau. La figure 17 donne également l'impression que sur la surface très restreinte de PFe les PIM sont plus denses vers la zone d'accolement. LIU (1972), chez *Thelohania bracteata*, suggère que d'un point de vue enzymatique, la variation de densité des particules dans les membranes nucléaires pourrait traduire une variation de l'activité biosynthétique dans les noyaux; il remarque également qu'une augmentation de la densité de ces particules va de pair avec un accroissement du nombre des pores nucléaires. Cependant chez *Nosema apis*, les pores nucléaires semblent absents au niveau de la zone d'accolement. En dehors de celle-ci, l'enveloppe nucléaire de chacun des deux noyaux du diplocaryon comporte des pores nucléaires : figs.9, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24. Ceux-ci peuvent être observés sur toutes les faces fracturées des membranes nucléaires : leur diamètre est d'environ 74-76 nm et leur

répartition est le plus souvent assez irrégulière (figs.11, 17, 19, 20, 22, 23, 24). Chez les mérontes observés, la densité de ces pores varie de 35 à 48 pores/ μm^2 . LIU (1972) a également montré que celle-ci pouvait varier au cours des différents stades du cycle, et que son maximum se situait au stade sporoblaste pendant lequel s'effectue toute l'organogenèse de la spore, et donc stade où les échanges nucléocytoplasmiques seraient les plus importants. Au niveau de ces pores on retrouve un certain nombre de granules ou sous-unités du complexe nucléaire, mais un granule central est rarement observé (figs. 17, 19, 20, 22, 23, 24, 27). Ce granule central, suivant l'opinion couramment admise représenterait des matériaux informationnels (DU PRAW, 1970; SCHEER, 1970); il semble donc, comme l'a suggéré LIU (1972), que l'activité nucléaire des mérontes soit peu importante.

Le nucléoplasme, de structure finement granuleuse et plus ou moins homogène, présente des particules chromatiniennes, d'environ 8-8,5 nm de diamètre, relativement peu denses (environ 750 particules / μm^2) et discrètement groupées en amas dessinant un réseau plus ou moins net (figs. 11, 17, 19, 20, 21, 27). Il n'est pas possible de distinguer dans ce nucléoplasme ni lamina, ni agrégats chromatiniens.

Le diplocaryon, composant nucléaire constitué par "l'association" de deux noyaux étroitement accolés, est présent dans tous les stades du cycle. Cependant il nous est arrivé d'observer des figures différentes de ce diplocaryon classique : par exemple, la figure 25 montre un méronte dont l'appareil nucléaire apparaît constitué par trois noyaux étroitement accolés, sans fusion apparente des enveloppes nucléaires; toutefois le noyau médian (fig.26) présente des sections de microtubules d'environ 15 à 20 nm de diamètre. La présence de ceux-ci, de même que celle d'agrégats chromatiniens rappelant des chromosomes dans les deux noyaux adjacents, peuvent suggérer une figure de caryocinèse.

Le même type de figure a pu être observé en cryofracture (fig.27) mais aucun agrégat chromatiniens n'est différencié dans le nucléoplasme. Un autre type de figure

diplocaryotique, pour autant qu'il s'agisse d'un véritable diplocaryon, apparaît sur les microphotographies 28 et 29 où il semble y avoir un simple noyau replié en U dont les deux branches verticales, pratiquement accolées, réduisent à son minimum la cavité de ce U. Cette figure, exceptionnelle chez *Nosema apis*, a été observée chez *Thelohania contejeani* par COSSINS et BOWLER (1974), et MAURAND et VEY (1973) pensent que dans les sporoblastes de cette même microsporidie, il n'existe qu'un simple noyau, la forme en U n'apparaissant seulement que dans les spores. Un troisième cas de figure atypique a également été observé, mais très rarement, chez *Nosema apis* : en effet il peut parfois y avoir, aussi bien chez le méronte (figs.30, 31) que chez le sporoblaste (figs.32, 33), une fusion au niveau des membranes nucléaires externes des deux noyaux du diplocaryon : ceux-ci paraissent accolés uniquement par les membranes nucléaires internes, séparées par un espace de 22 à 30 nm de large, la membrane nucléaire externe étant continue d'un noyau à l'autre. Seules donc les membranes nucléaires externes auraient fusionné, et seraient donc absentes au niveau de la zone d'accolement où les deux noyaux ne se juxtaposent que par leurs seules membranes nucléaires internes. La signification de ce phénomène est énigmatique, bien qu'il aurait pu s'agir d'un début de caryogamie, mais si caryogamie il existe, celle-ci intervient généralement à un moment précis du cycle, or ici ce phénomène de "fusion" a été observé aussi bien au stade méronte qu'au stade sporoblaste.

3) La phase de multiplication des mérontes

a) La caryocinèse

Le fait que la caryocinèse précède toujours la cytodierèse, amène la formation de plasmodes temporaires plurinucléés (généralement tétranucléés).

Chez *Nosema apis*, comme chez les autres microsporidies, la division nucléaire s'effectue sans disparition de l'enveloppe nucléaire et procède comme une cryptomitose acentriolaire (figs.34, 35, 36, 37, 38) selon la terminologie de HOLLANDE (1972). Ce type de division a été très bien décrit par DESPORTES (1976) chez la microsporidie *Stempellia mutabilis*. Le fuseau mitotique est intranucléaire et il n'y a pas de centriole (figs.34, 35) : les microtubules fusoriaux divergent à partir de deux formations appelées plaques polaires (DESPORTES, 1976) ou plaques fusoriales (VAVRA, 1976) par analogie avec ce qui se passe chez les levures (MOENS et RAPPORT, 1971). Chacune d'elles, placée sur l'enveloppe nucléaire (VIVIER 1979) au niveau d'une petite dépression (figs.35, 36, 37, 38), paraît constituée par une zone dense d'environ 36 nm d'épaisseur comprenant deux épaissements membranaires. De part et d'autre de chaque plaque on observe du matériel dense sur lequel, du côté interne (intranucléaire), prend racine le fuseau mitotique (figs.36, 37); du côté externe (extranucléaire), il existe toujours, au niveau de la plaque, des petites vésicules à contenu plus ou moins dense (figs.36, 37), généralement au nombre de trois comme l'ont signalé YOUSSEF et HAMMOND (1971). BERREBI (1978) a observé le même phénomène chez *Glugea atherinae*. Selon DESPORTES (1976), la formation de ces plaques polaires serait induite par les formations polaires extranucléaires représentant le centre cinétique (HOLLANDE, 1972). Celui-ci subirait une autoduplication entraînant la formation de deux plaques polaires d'abord jointives, et induisant chacune la formation d'un hemifuseau dont les microtubules se mettent en relation avec l'un des deux lots de chromatides (HOLLANDE, 1972). Puis les deux plaques polaires vont s'écarter l'une de l'autre et gagner progressivement (fig.35) les pôles opposés du noyau, entraînant ainsi les chromatides qui leur sont rattachées par l'intermédiaire des microtubules kinétochoriens; l'image de division obtenue est alors une pseudo-métaphase (DESPORTES, 1976). La fig.34 représente déjà un début d'anaphase avec la séparation des chromatides. Le fuseau mitotique est constitué de microtubules continus et de microtubules

chromosomiques ou kinétochoriens d'environ 25 nm de diamètre, rattachés aux chromatides (fig.38) au niveau des kinétochores; ceux-ci semblent avoir une structure trilamellaire dont la couche dense externe paraît plus ou moins conique (fig.38). Nos observations ne nous ont jamais permis de montrer la division simultanée des deux noyaux du diplocaryon, car selon SPRAGUE et VERNICK (1969), CANNING et SINDEN (1973), STREETT et HENRY (1987), les microtubules fusoriaux sont parallèles à la ligne d'accolement des deux noyaux.

b) La cytodièrese

La cytodièrese (fig.39) qui semble intervenir peu de temps après la caryocinèse, est marquée par l'allongement du plasmode et se fait par étranglement médian du cytoplasme. Vers le milieu de ce plasmode (fig.39), la membrane cellulaire s'invagine et paraît s'épaissir légèrement à ce niveau, les deux invaginations allant à la rencontre l'une de l'autre. Au cours de notre étude nous n'avons rencontré que très rarement des stades plasmodiaux pendant la phase schizogonique et ceux-ci ne contenaient jamais plus de deux diplocaryons. CALI (1971) signale également chez *Nosema apis*, des cellules parasites pouvant contenir jusqu'à six diplocaryons.

B) La phase de sporulation ou sporogonie

Cette phase, essentiellement caractérisée par une différenciation cellulaire très importante, comprend trois stades : le stade initial ou sporonte, le sporoblaste et la spore.

1) Les sporontes

a) Le sporonte proprement dit

Selon VAVRA (1965, 1973, 1976) le début de la phase de sporulation est marqué par l'épaississement, côté externe, de la membrane cellulaire du parasite et CALI

(1971) utilise ce phénomène comme critère distinctif entre méronte et sporonte. En effet, d'un point de vue cytoplasmique, il ne semble y avoir que très peu de différence entre le dernier stade de la schizogonie et le premier stade (ou sporonte) de la sporogonie. VAVRA et SPRAGUE (1976) définissent le sporonte comme une cellule dont les résultats de la division immédiate sont les sporoblastes, c'est à dire une cellule qui se divise directement en sporoblastes. Le genre *Nosema* (CALI, 1971; SPRAGUE, 1977, 1978; VAVRA et Coll. 1981) est diploé et chaque sporonte se divise uniquement en deux sporoblastes.

Le sporonte (fig.40), de forme plus ou moins ovoïde, d'environ 8 à 9 μm de long sur 4 à 5 μm de large, est caractérisé par un cytoplasme homogène, relativement dense, riche en reticulum endoplasmique souvent dilaté en petites vésicules et en relation avec un amas de petites vésicules golgiennes. Au sein du cytoplasme se trouve un diplocaryon dont les deux noyaux, à nucléoplasme homogène, présentent quelques densifications pouvant représenter des amas chromatiniens. Ce sporonte est limité par une membrane plasmique montrant, en certains endroits, des épaisissements dus à un dépôt, côté externe, de matériel dense d'environ 18 à 20 nm d'épaisseur. Ce dépôt, localisé initialement aux deux extrémités du sporonte (figs.40, 41) est discontinu, formant ainsi des zones épaissies (membrane plasmique et dépôt) séparées de zones minces constituées de la seule membrane plasmique (figs.43, 44, 45). Puis progressivement toute la surface du sporonte va se trouver recouverte d'une couche de matériel dense (figs. 42, 46, 47, 48, 49).

b) Les stades plasmodiaux

Chaque sporonte va se diviser une seule fois pour former deux sporoblastes. La caryocinèse précédant toujours la cytodièrese, des stades plasmodiaux se forment. Cependant ceux-ci ne possèdent jamais plus de deux diplocaryons (figs. 42, 43, 45, 46, 48, 49). Pendant la durée de ces stades le dépôt de matériel dense sur la membrane plasmique se poursuit

(figs.43, 45) et finira par recouvrir toute la surface du petit plasmode (figs.48, 49). Ces stades plasmodiaux ne semblent guère plus grands que le sporonte initial : de même forme ovoïde ils mesurent environ 8 à 9 μm de long sur 4 à 5 μm de large; leur cytoplasme, légèrement moins dense, mais riche en réticulum endoplasmique en relation avec un ou deux amas golgiens ou d'autres petites vésicules, comporte deux diplocaryons dont les noyaux, toujours à nucléoplasme homogène, montrent une plage plus dense pouvant correspondre à un nucléole (figs. 42, 48, 49). Ils sont limités par une paroi constituée de la membrane plasmique recouverte extérieurement d'un dépôt de matériel dense d'environ 20 nm d'épaisseur.

Il apparaît donc que la seule différence structurale entre le dernier stade schizogonique et le premier stade sporogonique, soit l'apparition chez ce dernier d'un dépôt de matériel dense sur la membrane plasmique. Cependant YOUSSEF et HAMMOND (1971), chez *Nosema apis* parasite d'abeilles d'été, montrent deux figures qu'ils nomment respectivement schizonte et sporonte, avec sur la première un début de dépôt de matériel dense sur la membrane plasmique, et sur la deuxième un dépôt déjà beaucoup plus étendu mais encore discontinu. C'est pourquoi dans notre étude nous avons considéré comme sporonte toute cellule parasitaire sur laquelle apparaît le moindre dépôt, aussi peu étendu soit-il.

Puis chacun de ces stades plasmodiaux va subir une cytodierèse pour former deux sporoblastes.

2) Les sporoblastes : la transformation sporoblastique et l'organitogenèse de la spore

Chez les microsporidies du genre *Nosema*, chaque sporoblaste évolue directement en une seule spore, et au cours de cette différenciation se formera la spore définitive mature. Cette morphogenèse concerne trois types de structures :

- le filament polaire et ses annexes : polaroplaste et vacuole postérieure.

- la paroi de la spore.
- le cytoplasme et les organites cellulaires classiques (= sporoplasme).

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux deux premiers types de structures dont les transformations sont très spectaculaires et importantes en regard de celles intervenant au niveau du cytoplasme. Le filament polaire et ses annexes constituent en effet le système mécanique qui permettra, lors de l'évagination du filament, "d'injecter" le sporoplasme (ou "germe") dans une nouvelle cellule-hôte, lequel sera à l'origine d'un nouveau cycle du parasite. La paroi de la spore, quant à elle, constitue à la fois une protection efficace contre toute agression extérieure et un réactif, en conditions favorables, aux stimuli exogènes qui permettront l'activation de la spore et le déclenchement du processus d'extrusion du filament polaire .

a) Le filament polaire et ses annexes

L'évènement primordial de cette transformation sporoblastique est incontestablement constitué par la formation du filament polaire, du polaroplaste et de la vacuole postérieure. Cette phase très complexe peut être divisée en plusieurs processus plus ou moins simultanés.

α) Origine et formation du filament polaire

Chez *Nosema apis* comme chez *Nosemoides vivieri* , le filament polaire tire son origine, au moins en grande partie, de l'appareil de Golgi comme l'ont signalé YOUSSEF et HAMMOND (1971). Cette origine décrite pour la première fois par VAVRA (1965), est actuellement reconnue par tous les auteurs, le problème étant de savoir si ce Golgi est seul à intervenir, ou bien si d'autres structures cellulaires, comme le réticulum endoplasmique, ne pourraient pas aussi participer directement ou indirectement à l'élaboration de cet organite.

Cet appareil de Golgi atypique, peu visible dans les premiers stades de développement, et qui n'a jamais été mis en évidence dans le "germe sporoplasmique" infestant la cellule-hôte, prend une importance considérable dans le sporoblaste lors de l'élaboration du filament polaire, puis semble disparaître dans la spore mature. Chez les schizontes (figs 10, 13, 14, 15), il a souvent été observé, soit près du diplocaryon, soit dans le cytoplasme environnant, un amas de petites vésicules à contenu plus ou moins dense, assimilable à un appareil de Golgi primitif (VAVRA, 1965). Ces vésicules peuvent être en relation soit avec la membrane externe de l'enveloppe nucléaire (figs 13, 14), soit le réticulum endoplasmique (figs 10, 15), elles seront, dans le sporoblaste, à l'origine du filament polaire. Celui-ci est une structure tubulaire pleine, attachée par sa partie proximale ou basale à un disque d'ancrage en forme d'ombrelle appelé sac polaire (figs 110, 111, 112) et situé au pôle apical de la spore, immédiatement sous la paroi sporale. De ce sac polaire, le filament descend longitudinalement de façon rectiligne vers le centre du sporoblaste, puis s'enroule en spirales dans la moitié postérieure de celui-ci (figs 110, 111, 112, 114, 115).

* Le sac polaire

La première manifestation de l'élaboration du filament polaire est l'apparition, dans le cytoplasme du jeune sporoblaste, d'une nouvelle structure à contenu finement granulaire et moyennement dense, en partie limitée d'un côté par une membrane unitaire (figs. 50, 51, 52, 53) et ouverte, du côté opposé, sur un amas de vésicules golgiennes anastomosées dont le contenu est de densité semblable. Cette structure, située plus ou moins proche du diplocaryon, mais jamais placée dans une dépression de l'enveloppe nucléaire comme chez *Nosemoides vivieri*, est à l'origine du sac polaire formé par coalescence de ces vésicules golgiennes (figs. 50, 51, 52, 53), qui seront également à l'origine du filament polaire (figs. 56, 57, 58, 59, 60). La fig. 53 suggère l'existence de relations possibles entre le sac polaire en formation et le réticulum endoplasmique. Ce sac polaire, dont le contenu deviendra de plus en

plus dense au fur et à mesure de la transformation sporoblastique, va très vite migrer au pôle apical de la future spore (figs 54, 55). Presque simultanément apparaît vers le pôle opposé, une autre structure dense (fig. 54) paraissant également en relation avec les vésicules golgiennes (fig. 55) et qui pourrait être à l'origine de la vacuole postérieure.

* Le filament polaire

Le filament polaire va se différencier entre ces deux nouveaux organites que sont le sac polaire et la vacuole postérieure (fig. 56), rappelant ce qui a été observé chez *Nosemoides vivieri*. Lors de sa formation le filament polaire est constitué de trois zones concentriques (figs. 56, 57, 58, 59, 60, 61) :

- une zone externe sombre limitée extérieurement par une membrane unitaire.

- une zone moyenne claire.

- une zone centrale sombre, toujours excentrée par rapport aux deux autres.

Le diamètre du filament n'est pas constant et peut varier entre 120 et 250 nm environ. Ce filament polaire se forme par coalescence des vésicules golgiennes qui sont en rapport étroit avec la zone externe mais aussi la zone centrale axiale du filament (figs 59, 60, 61, 95, 96). Dans le sporoblaste ces vésicules anastomosées forment un amas plus ou moins central à la périphérie duquel s'élabore le filament polaire : les vésicules se disposent en une sorte de manchon cylindrique englobant une zone centrale dense (figs. 59, 60, 61, 95, 96), et le filament paraît alors constitué de deux cylindres emboîtés séparés par une zone claire (zone moyenne) d'épaisseur variable (25 à 50 nm) : l'externe (= zone externe) épais de 18 à 30 nm comprend la membrane unitaire et la partie dense sous-jacente, et l'interne (= zone centrale axiale) de 40 à 60 nm de diamètre, excentré, plein et de forte densité.

Les vésicules golgiennes peuvent parfois former des figures d'interprétation difficile : il est ainsi possible d'observer des réseaux à mailles plus ou moins hexagonales

(fig.58) rappelant les rayons d'abeilles, ou des sections de filament de diamètre beaucoup plus important comprenant une ou plusieurs zones centrales axiales (figs. 56, 57, 58, 72, 86, 95, 96), ou encore des sections de diamètre plus réduit, dépourvues d'axes centraux, et pouvant être accolées à des sections typiques (figs. 56, 57). Ceci semble aussi avoir été observé par SPRAGUE et VERNICK (1974) chez *Ichthyosporidium sp.*. Parfois ces vésicules paraissent aussi être en rapport avec des granules denses de taille variable (figs. 56, 57, 58, 95, 96). Parmi l'amas de vésicules golgiennes, on peut observer également une zone où celles-ci, plus espacées les unes des autres, sont en partie séparées par d'autres vésicules à contenu clair et dont l'origine pourrait être le réticulum endoplasmique (figs. 65, 66, 95, 96) comme l'ont suggéré YOUSSEF et HAMMOND (1971). Ceci rappelle ce qui a été décrit chez *Thelohania sp.* (VERNIK, SPRAGUE et KRAUSE, 1977), *Tuzetia debaisieuxi* (LOUBES et MAURAND, 1976), *Thelohania corethrae* (LARSSON, 1986). Dans d'autres cas, l'appareil de Golgi peut même prendre un aspect tout à fait particulier (figs. 67, 68, 69) : en effet il apparaît alors constitué de saccules très aplatis à contenu très dense, soit empilés les uns sur les autres (fig.67), soit disposés de façon concentrique (fig.68). Les vésicules golgiennes se formant aux extrémités de ces saccules peuvent se dilater directement, soit en des sections circulaires de diamètre réduit et dépourvues de zone centrale dense, soit en granules de forte densité (figs. 69, 70, 71). Une disposition similaire du Golgi a été observée chez *Hirsutosporos austrosimuli* par BATSON (1983) et chez *Amblyospora pinensis* par KETTLE et PIPER (1988).

Comme nous l'avons déjà signalé (figs.50, 51, 52), il a été souvent observé, dans le cytoplasme du sporoblaste, une ou deux vacuoles (mais peut-être s'agit-il de deux sections de la même vacuole ?) (figs. 73, 74, 75), en relation directe avec le filament polaire : en effet la membrane de cette vacuole est en continuité avec la membrane du filament polaire, soit à la limite sac polaire-filament (fig.74), soit plus loin le long de ce dernier (fig. 75). Cette vacuole peut également être en relation avec le réticulum endoplasmique (fig. 73). Une

telle structure a été observée chez *Nosemoides vivieri* en début de sporoblastogenèse, où elle est en continuité avec la membrane du sac polaire. Sa signification reste énigmatique. Cependant BERREBI (1978, 1979), chez *Glugea atherinae*, décrit une "vacuole commune" incluant des sections de l'axe dense du filament ; puis celui-ci passe au travers de la paroi de la vacuole et dès lors, la zone moyenne claire et la zone sombre périphérique s'organiseront autour de cet axe à partir de vésicules golgiennes anastomosées. Nous ne pouvons affirmer avoir vraiment un tel processus chez *Nosema apis* bien que la fig. 72 montre une petite vacuole avec des sections denses qui pourraient correspondre à l'axe central du filament polaire. Ce type de figure a également été observé chez *Tuzetia debaisieuxi* (LOUBES et MAURAND, 1976), et *Ameson pulvis* (VIVARES et SPRAGUE, 1979).

Le diamètre du filament polaire, pendant sa genèse, n'est pas régulier et peut varier du simple au double (120-250 nm) d'un sporoblaste à l'autre, et dans un même sporoblaste, d'une portion de filament à une autre. Cependant ce diamètre se régularisera en fin de transformation sporoblastique et sera d'environ 100 nm dans la spore. Simultanément, lorsque le sac polaire aura migré au pôle apical de la future spore, le sporoblaste, de contour plus ou moins circulaire ou déjà légèrement ovale (figs. 54, 55), va s'allonger de plus en plus selon l'axe sac polaire-vacuole postérieure, pour prendre une forme nettement ovoïde (figs. 72, 84, 85, 86, 87), et son cytoplasme sera alors caractérisé par la présence d'un réticulum endoplasmique abondant (figs. 84, 85, 86, 87, 88, 92).

L'observation de répliques obtenues par cryofracture de jeunes sporoblastes (fig. 62) montre des structures identiques à celles observées sur coupes fines. Le filament polaire qui se forme à la périphérie de l'amas central de vésicules golgiennes anastomosées, est constitué de trois zones (figs. 62, 63, 64) :

- la zone externe limitée par une membrane unitaire dont les faces de fracture présentent relativement peu de particules intramembranaires, la face E en comportant

cependant plus que la face P. Immédiatement sous cette membrane, se trouve un anneau périphérique de quelques particules correspondant à la zone sombre adjacente à la membrane.

- la zone moyenne claire pratiquement dépourvue de particules.
- la zone centrale axiale, également excentrée, caractérisée par la présence d'une dizaine de particules plus ou moins régulièrement disposées selon un anneau de 50 nm de diamètre environ.

Le diamètre de toutes ces particules intramembranaires semble compris entre 7 et 9 nm.

Sur toutes les répliques observées on retrouve cette même structure du filament polaire (figs 87, 88, 89, 90, 91, 92). En début de formation, le filament polaire paraît parfois très dilaté en certaines zones (figs.88, 89) : ceci rappelle certaines sections de diamètre plus important, observées sur coupes fines, et dans lesquelles plusieurs axes centraux sont visibles (figs 56, 57). Ce filament polaire est donc limité par une membrane unitaire dont les faces de fracture P et E sont peu riches en particules intramembranaires (figs.89, 90, 91, 92) : environ 440 PIM/ μm^2 sur la face P où elles sont assez régulièrement dispersées et 1020 PIM/ μm^2 sur la face E où leur répartition semble plus hétérogène. Dans le cytoplasme du sporoblaste, on remarque également la présence d'une ou deux vacuoles (fig. 91) et du réticulum endoplasmique plus ou moins dispersé ou disposé en lamelles superposées (fig.92).

Dans l'ensemble tout ceci rappelle ce qui a été décrit par VAVRA, TORPIER et PORCHET-HENNERE (1982) chez les microsporidies *Tuzetia sp.*, *Amblyospora bracteata*, *A. varians* et *A. opacita* dont les faces de fracture de la membrane du filament polaire comportent très peu de particules, excepté chez *Tuzetia sp.* où celles-ci sont plus nombreuses. Cependant LIU (1973), chez *Nosema apis*, mais sur tissu non fixé, a également décrit les deux faces de fracture de la membrane du filament polaire : l'une concave, l'autre convexe, pouvant donc correspondre respectivement aux faces P et E, la face concave possédant une population de

particules plus importante que la face convexe, c'est à dire le contraire de ce que nous avons observé.

* Insertion du filament polaire sur le sac polaire

Le sac polaire, de forme ovoïde, va migrer assez tôt à un pôle du sporoblaste, futur pôle apical de la spore. Son contenu, d'abord finement granulaire et de faible densité, va devenir de plus en plus opaque au fur et à mesure de l'élaboration du filament polaire (figs. 76 à 83). A l'endroit où l'extrémité basale ou proximale du filament entre en contact avec le sac polaire il est possible de distinguer trois zones (figs 79, 81, 82) : la zone de jonction proprement dite (zone 3) coiffée d'une zone plus claire (zone 2) et le sac polaire (zone 1). Au niveau de cette jonction, l'axe central du filament polaire pénètre dans le sac polaire où il se dilate en "tête de clou" (fig.81) comme l'a observé BERREBI (1978) chez *Glugea atherinae*. La zone moyenne claire ne rentre que relativement peu dans le sac polaire. La membrane du filament est en continuité directe avec celle limitant le sac polaire (figs 76, 80, 81) mais la couche dense sous-jacente pénètre dans le sac polaire où elle paraît constituer une espèce d'anneau basal stratifié (figs 80, 82) qui pourrait correspondre à ce que VAVRA (1976) a appelé "charnière". Celle-ci est coiffée d'une sorte de capuchon granulaire à la périphérie duquel et à la limite de la zone plus claire, il existe au moins cinq densifications (fig.82). Plus tard, dans la spore (figs 112, 113), ces structures vont se condenser, et le sac polaire va devenir extrêmement aplati (8 à 12 nm d'épaisseur) assez difficilement distinguable des lamelles du polaroplaste qu'il coiffe à la manière d'un "béret" (fig.112). Au niveau de la jonction, seul un anneau arqué, stratifié et constitué de trois couches sombres alternant avec trois couches plus claires, est alors visible. Ceci semble en accord avec ce qui a été observé chez *Tuzetia debaisieuxi* (LOUBES et MAURAND 1976), *Glugea atherinae* (BERREBI 1978, 1979), *Mrazekia brevicauda* (GOTZ 1981) et *Amblyospora culicis* (TOGUEBAYE et MARCHAND 1986).

β) Le polaroplaste

Le polaroplaste est une nouvelle structure qui se forme en fin de genèse du filament polaire, dans le tiers antérieur du sporoblaste et sous le sac polaire, entourant ainsi la partie basale rectiligne du filament. Comme chez *Nosemoides vivieri* cet organite paraît constitué de deux parties : le polaroplaste lamellaire et le polaroplaste vésiculaire (figs. 110, 111, 112, 113, 114, 115).

* Le polaroplaste lamellaire

Lorsque la formation du filament polaire est bien avancée (figs. 95, 96), il apparaît, dans la partie antérieure du sporoblaste, des vésicules plus ou moins allongées dérivant probablement du réticulum endoplasmique, qui viennent se placer soit parallèlement à la partie basale rectiligne du filament, soit sous le sac polaire (figs. 93, 94). Ces vésicules semblent être à l'origine du polaroplaste lamellaire dont la différenciation doit être très rapide car nous n'avons jamais pu observer les différentes phases de son élaboration. Ces vésicules vont s'étirer fortement pour former des espèces de saccules aplatis, empilés les uns sur les autres, dont l'ensemble prendra la forme d'une cloche qui laissera passer, au centre de sa partie supérieure convexe, le filament polaire inséré sur le sac polaire sus-jacent et qui traversera de façon rectiligne l'intérieur de cette cloche (figs. 110, 111). Ce polaroplaste lamellaire semble donc être l'homologue du "cavum" décrit chez *Nosema sp.* par SPRAGUE et Coll., (1968). Le nombre de saccules ainsi empilés est variable mais généralement compris entre une dizaine et plus d'une trentaine (figs. 110, 111). Cet empilement, très lâche au début (fig. 110) se resserre de plus en plus au fur et à mesure de la maturation de la spore (figs. 111, 112, 114, 115) donnant un aspect feuilleté au polaroplaste, lamelles dont l'épaisseur varie entre 9 et 20 nm et séparées les unes des autres par un espace de 8 à 24 nm. Cette structure lamellaire est d'autant plus compacte que l'on passe de la partie interne à la partie externe de la cloche (figs. 111, 112, 115).

En cryofracture, le polaroplaste lamellaire, en début de différenciation (fig.97) paraît également constitué par un empilement de lamelles aplaties séparées, à ce stade, par un espace granulaire dont l'épaisseur varie entre 35 et 44 nm. La face de fracture P (PF) de ces lamelles présente nettement plus de particules intramembranaires ($1650 \text{ PIM}/\mu\text{m}^2$) que la face E (EF) ($350 \text{ PIM}/\mu\text{m}^2$). Cet empilement de lamelles, traversé en son centre par le filament polaire (fig.98) devient de plus en plus compact au fur et à mesure de l'évolution du sporoblaste (fig. 99). LIU (1973, 1975), a également observé un polaroplaste lamellaire largement feuilleté et constitué de lamelles étroitement empilées dont les faces concave et convexe sont granulaires, aussi bien dans la spore immature que dans la spore mature.

* Le polaroplaste vésiculaire

L'intérieur de la cavité limitée par le polaroplaste lamellaire est restreint et simplement occupé par le filament polaire et, vers l'ouverture, par des petites vésicules à l'origine du polaroplaste vésiculaire peu développé chez *Nosema apis*. La différenciation de ce dernier paraît légèrement décalée par rapport à celle du polaroplaste lamellaire et ne semble débiter qu'après l'empilement des saccules (fig.110). Si chez *Nosemoides vivieri* l'origine du polaroplaste vésiculaire n'était pas clairement définie, chez *Nosema apis*, la fig.110 montre que ce polaroplaste est constitué de petites vésicules à contenu plus ou moins dense se formant aux extrémités légèrement dilatées des saccules empilés. De faible importance par rapport à celui observé chez *Nosemoides vivieri*, il semble constituer une formation transitoire car sa structure vésiculaire paraît s'estomper par la suite pour devenir plus granuleuse, et pratiquement disparaître dans la spore (figs.111, 112, 114, 115).

γ) La vacuole postérieure

La vacuole postérieure, difficile à observer chez *Nosema apis*, est située au pôle diamétralement opposé au pôle apical. Bien que signalée chez de nombreuses microsporidies, cet organite constitue toujours une structure énigmatique. Cette vacuole semble

apparaître, au pôle postérieur du sporoblaste, dès que le sac polaire en formation a migré au pôle apical, suggérant ainsi l'hypothèse que le filament polaire pourrait se différencier entre ces deux structures extrêmes. Les figs. 54 et 55 montrent, au niveau de ce pôle postérieur, une structure granulaire dense relativement hétérogène qui pourrait être à l'origine de la vacuole postérieure, et qui paraît aussi être en relation avec les vésicules golgiennes (fig. 55). La cryofracture montre également à l'extrémité postérieure du sporoblaste une sorte de vacuole (figs. 85, 99) pouvant correspondre à cet organite. Plus tard, dans la jeune spore (fig. 110), nous retrouvons, toujours au même emplacement, une structure très hétérogène, plus ou moins granulaire avec de grandes vésicules claires et d'interprétation très difficile. La vacuole postérieure serait limitée, comme le filament polaire, par une seule membrane unitaire, mais nos observations ne permettent pas de préciser si ce filament est en relation ou non avec la vacuole ; seul WEIDNER (1972) signale que chez *Nosema lophii* le filament traverse la vacuole postérieure tout en restant bien limité et isolé par sa propre membrane. LIU et DAVIES (1972), chez *Thelohania bracteata* signalent que la vacuole postérieure possède une double membrane dont les surfaces externe et interne sont relativement lisses. Puis LIU (1973), chez *Nosema apis*, parle de «la membrane de la vacuole postérieure» mais sans préciser davantage. La fig.99 peut également laisser supposer que cette vacuole postérieure n'est limitée que par une seule membrane dont la face de fracture P ici exposée paraît très lisse. Nous n'avons jamais pu observer cette vacuole postérieure dans la spore mature car, comme le signale VAVRA (1976), cet organite n'est généralement pas bien préservé pendant la fixation, et la fig. 115 montre un espace vide à l'emplacement de cette vacuole.

b) La paroi du sporoblaste

Durant toute la phase végétative les mérontes ne sont limités que par la seule membrane plasmique, mais en début de sporogonie du matériel dense va se déposer, en certains endroits, sur la face externe du plasmalemme limitant les sporontes. Ce dépôt, d'abord discontinu, finit par recouvrir toute la surface du sporonte (figs. 40 à 49) et semble être à

l'origine de l'exospore de la future paroi sporale. La paroi du sporoblaste est donc constituée de deux composantes, la membrane plasmique et le dépôt de matériel opaque aux électrons.

α) La membrane plasmique

Ce plasmalemme est une membrane cellulaire typique et la cryofracture montre que les deux faces de fracture portent des particules intramembranaires d'environ 7,5 - 10 nm de diamètre. Seuls le nombre et la répartition de ces PIM varieront selon la face de fracture observée et selon le degré de maturation du sporoblaste, la tendance générale allant vers une réduction de ce nombre au fur et à mesure de la transformation du sporoblaste en spore. Chez le jeune sporoblaste, les PIM sont très nombreuses sur les deux hémimembranes, avec une densité d'environ 1980 PIM/ μm^2 sur la face P (PF, fig.100), densité qui peut fortement augmenter et atteindre environ 3980 PIM/ μm^2 sur la face E (EF, figs. 87, 97, 99, 101). Par la suite chez le sporoblaste plus âgé, il apparaît que la densité de ces particules diminue aussi bien sur la face P (figs.102, 103, 106) que sur la face E (figs. 104, 105). Cette diminution semble se faire de façon hétérogène : en effet sur la face P (figs. 102, 103, 106) les PIM restantes sont disposées en quelques petits amas (dont la densité est alors d'environ 170 PIM/ μm^2) avec quelques rares particules isolées disséminées sur toute la surface de l'hémimembrane. Il en est de même sur la face E car, à un stade intermédiaire (fig. 104), on peut observer des zones pratiquement dépourvues de particules alternant avec des zones où celles-ci sont encore denses (environ 2410 PIM/ μm^2). Il apparaît donc qu'en fin de transformation sporoblastique il ne reste que de très rares particules isolées sur les faces P et E de la membrane du sporoblaste. Cependant lorsque la troisième composante ou endospore de la future paroi sporale va commencer à se différencier, la densité des particules augmente à nouveau sur la face P (540 PIM/ μm^2) (figs. 107, 108), ce phénomène paraissant beaucoup moins évident sur la face E (fig. 109), (mais il est très difficile de comparer les deux hémimembranes d'une membrane sur deux sporoblastes distincts ne sachant pas s'ils sont exactement au même stade de développement). Y a-t-il une relation entre cette augmentation des particules et le début de différenciation de l'endospore ?

B) Le dépôt de matériel dense

En microscopie électronique classique, cette couche de matériel dense constitue, avec la membrane plasmique, une paroi dont l'épaisseur semble approximativement constante, bien que sensiblement plus épaisse lorsque le dépôt est discontinu (34 nm, figs. 41, 44) que par la suite, lorsqu'il recouvre entièrement le plasmalemme du sporonte, l'épaisseur de cette paroi étant alors légèrement réduite (25 nm, figs. 48, 49). Chez le jeune sporoblaste, elle reste d'environ 24-25 nm d'épaisseur (figs. 51, 52), alors que chez le sporoblaste plus âgé elle augmentera quelque peu pour atteindre environ 30-32 nm (figs. 84, 86).

En cryofracture, ce matériel dense présente une texture nettement granulo-fibrillaire. Il semble qu'en début de formation, chez les jeunes sporoblastes, cette texture soit principalement granulaire car on y observe de nombreuses particules de 7 à 9 nm de diamètre plus ou moins bien disposées selon une double rangée (figs. 62, 85, 87, 88, 90, 91, 92). Par la suite, le dépôt s'épaississant, sa texture devient alors nettement granulo-fibrillaire (figs. 97 à 109), et cette paroi paraît toujours bien délimitée extérieurement par une rangée dense en particules régulièrement alignées. LIU (1973, 1975) avait également observé (sur tissus non fixés) une texture microfibrillaire donnant un aspect feuilleté à cette paroi.

L'origine de ce dépôt est inconnue et nous n'avons jamais observé de figures suggérant que ce matériel dense puisse provenir d'un éventuel processus excrétoire du parasite. Il faut cependant noter, comme l'ont signalé YOUSSEF et HAMMOND (1971), que pendant la phase végétative les mérontes, limités par la seule membrane plasmique, sont très souvent encerclés par du réticulum endoplasmique de la cellule-hôte (fig. 126) dont seule la face externe (côté cytoplasme-hôte) porte des ribosomes. Parfois ce réticulum peut-être dilaté en vésicules plus ou moins grandes à contenu relativement clair (fig. 127). Par contre nous n'avons jamais remarqué une forte concentration de mitochondries de la cellule-hôte contre le

parasite, telle que l'ont observée YOUSSEF et HAMMOND (1971). Chez les jeunes sporontes, lorsque ce revêtement est discontinu, le réticulum endoplasmique a disparu là où du matériel dense a été déposé, mais est encore présent là où n'existe que la seule membrane plasmique (figs. 128, 129). La question qui se pose est donc de savoir si ce dépôt tire son origine ou non du réticulum endoplasmique de la cellule-hôte, adjacent à la surface du méronte ? Chez *Nosema cuneatum*, STREETT et HENRY (1987) observent un phénomène similaire et signalent une «couche discontinue entourant les mérontes et apparemment remplacée par le matériel opaque aux électrons qui se dépose sur le plasmalemma du sporonte». Cette "couche" contient d'ailleurs des vésicules avec du matériel dense central qui se déposerait sur la membrane plasmique du sporonte. De même SAKITI et BOUIX (1987) chez *Nosemoides tilapiae* observent des vésicules plus ou moins opaques aux électrons, issues du cytoplasme de la cellule-hôte, qui viennent se déposer sur la membrane plasmique du plasmode dont la paroi prend alors un aspect ornementé très régulier. Ce phénomène rappelle également ce qui avait été décrit chez *Spraguea lophii* (LOUBES et coll., 1979). TOGUEBAYE et MARCHAND (1984) avaient aussi remarqué, chez *Nosema henosepilachnae*, une réaction de la cellule-hôte sous forme de vésicules membranaires contenant des inclusions opaques parfois en contact avec la paroi du sporonte, mais sans toutefois être entièrement convaincus de leur participation directe à la formation de celle-ci.

c) Le cytoplasme sporoblastique

Le cytoplasme du sporoblaste ne présente aucun caractère particulier si ce n'est l'absence totale de mitochondries et de grains de réserves, caractère spécifique des microsporidies. Riche en ribosomes libres, on y observe surtout, en dehors du filament polaire et de ses annexes, beaucoup de réticulum endoplasmique, parfois dilaté en petites vésicules, mais le plus souvent disposé en lamelles plus ou moins parallèles (figs. 84, 85, 86, 87). L'appareil nucléaire, toujours composé de deux noyaux étroitement accolés de 1230 nm de diamètre environ et constituant le diplocaryon, peut occuper une position variable dans le sporoblaste : soit dans la portion antérieure (fig.86), soit dans la partie médiane (figs. 84, 93,

94, 95, 96), position qu'il occupera définitivement sous le polaroplaste, lorsque celui-ci et le filament polaire seront différenciés. Ce cytoplasme se densifiera de plus en plus au fur et à mesure de l'évolution du sporoblaste en spore.

3) La spore

Chez toutes les microsporidies du genre *Nosema*, chaque sporoblaste évolue directement en une seule spore. Cette évolution étant progressive et continue, il est parfois difficile de bien situer la frontière entre ces deux stades. Nous parlerons donc de spore lorsque le parasite sera limité par une paroi sporale complète constituée de ses trois composantes : membrane plasmique, endospore, exospore.

Cette spore constitue donc le résultat final de la transformation sporoblastique et le dernier stade du cycle de la microsporidie. Elle représente tout à la fois, une forme de résistance, de dissémination de l'espèce et de propagation de la maladie, car elle contient l'agent infectieux ou sporoplasme, point de départ d'un nouveau cycle du parasite. Elle possède donc les différentes structures dont nous venons de voir la différenciation et qui sont en rapport avec ces fonctions :

- le sporoplasme ou agent infectieux proprement dit.
- le filament polaire et ses annexes qui assureront la pénétration du sporoplasme dans la cellule-hôte.
- la paroi sporale qui assurera la protection du sporoplasme contre toute attaque extérieure.

a) Le sporoplasme

Ce sporoplasme est constitué par le cytoplasme très dense de la spore (figs. 110, 112, 114, 115), dans lequel des lamelles de réticulum endoplasmique sont difficilement visibles. Il est très riche en ribosomes libres et en ribosomes alignés en polysomes dont

certaines peuvent partiellement encercler les tours de spire du filament polaire (fig. 117). CURGY et Coll. ont montré que les ribosomes des spores de *Thelohania maenadis* et *Inodosporus* sp. présentaient des caractéristiques physico-chimiques identiques à celles des ribosomes d'organismes procaryotes, et suggèrent que ce phénomène pourrait être lié à la vie intracellulaire de ces parasites. La densité du cytoplasme peut en partie s'expliquer par la condensation du volume cellulaire qui a débuté au stade sporoblaste pour se terminer lors de la formation de l'endospore, condensation qui pourrait entraîner une certaine compression des ribosomes en amas suggérant des formations cristallines. L'appareil nucléaire, peu visible dans ce cytoplasme assez opaque, est toujours représenté par un diplocaryon dont les deux noyaux (de 850 nm de diamètre) sont plus petits que ceux observés dans le sporoblaste.

b) Le filament polaire et ses annexes

*** Le filament polaire**

Le filament polaire comprend deux parties : une partie basale ou proximale située dans le tiers ou la moitié antérieurs de la spore, se prolongeant par la partie distale localisée dans la moitié postérieure de celle-ci, et enroulée en spirale sous la paroi sporale.

Ce filament polaire, très long dans sa partie distale, peut effectuer jusqu'à 32 tours de spire (SHOLTYSECK et DANNEEL 1962, en avaient observés, également chez *Nosema apis*, plus de 44), plus ou moins bien disposés selon une double spirale. Il possède alors un diamètre d'environ 100-105 nm. En coupe transversale, ce filament paraît constitué, de l'extérieur vers l'intérieur, d'une succession de six couches concentriques (figs. 117, 118) :

- . une membrane unitaire externe (1) de 5, 5nm d'épaisseur.
- . une couche sombre sous-jacente (2) de 5 nm d'épaisseur.
- . une couche moyennement sombre (3) de 4, 5 nm d'épaisseur.
- . une autre couche sombre (4) de 5 nm d'épaisseur.
- . une couche claire, plus importante (5) de 22 nm d'épaisseur.
- . un axe central dense (6) de 18nm d'épaisseur.

Des couches similaires, mais avec des proportions différentes ont été observées chez de nombreuses autres microsporidies (VAVRA 1976), et leur nombre peut varier suivant l'espèce considérée et la résolution obtenue en microscopie électronique : SCHUBERT (1969), chez *Heterosporis finki* a décrit 11 couches différentes. Le diamètre du filament polaire diminue donc (il pouvait atteindre 250 nm dans le sporoblaste) lors de la transformation sporoblastique, alors que sa structure devient de plus en plus complexe en passant de 3 couches dans le sporoblaste à 6 couches dans la spore. La portion basale du filament est beaucoup plus courte, car uniquement constituée de la partie rectiligne contenue dans la cavité formée par le polaroplaste lamellaire, partie qui vient s'ancrer sur le sac polaire situé au pôle apical antérieur de la spore et légèrement décalé par rapport à l'axe longitudinal de celle-ci. Le filament conserve un diamètre d'environ 100 nm, mais en traversant les lamelles empilées du polaroplaste, ce diamètre va augmenter légèrement et progressivement passant à 115 nm, puis à 130 nm pour finalement atteindre 200 nm à l'endroit où il s'insère sur le sac polaire (figs.112, 113), au niveau d'une zone complexe (dont la structure a été précédemment décrite) appelée "charnière" par VAVRA (1976). La membrane unitaire externe du filament polaire est en continuité avec celle du sac polaire. Celui-ci à contenu très dense et en forme d'ombrelle très aplatie, coiffe la partie apicale du polaroplaste lamellaire. Nous n'avons jamais pu observer, en cryofracture, le contenu de la spore, toutes les fractures effectuées restant superficielles et n'affectant que la paroi sporale.

* Le polaroplaste

Déjà décrit dans un paragraphe précédent, il est situé au pôle apical, immédiatement sous le sac polaire, et occupe généralement le tiers antérieur de la spore (figs. 111, 112, 114, 115). Il comprend généralement deux parties :

- le polaroplaste lamellaire, en forme de cloche, de 450 nm d'épaisseur environ, est constitué par l'empilement d'au moins une bonne trentaine de lamelles légèrement ondulées, empilement qui devient de plus en plus compact au fur et à mesure de la maturation de

la spore, lui donnant ainsi un aspect feuilleté (figs. 111, 112, 114, 115). Ce polaroplaste, vient pratiquement s'appliquer contre la paroi sporale, n'en étant alors séparé que par un espace de 20-25 nm. .

- le polaroplaste vésiculaire semble très peu développé et quasiment inexistant dans la spore de *Nosema apis* . Dans la spore immature (fig. 110) quelques petites vésicules dérivant des extrémités des lamelles du polaroplaste lamellaire pourraient constituer un rudiment de polaroplaste vésiculaire, mais ces vésicules ne sont plus visibles dans les spores plus âgées (figs.111, 112, 114, 115).

* La vacuole postérieure

Cette vacuole postérieure a été rarement observée sur nos coupes fines. La fig.115 montre un espace clair et vide, à l'extrémité postérieure de la spore, marquant probablement son emplacement, car elle est rarement bien préservée par les techniques de fixation.

c) La paroi sporale

La paroi sporale définitivement constituée comprend trois composantes (figs. 110 à 116) :

- . la membrane plasmique qui limite le contenu cytoplasmique de la spore.
- . l'endospore ou couche moyenne, transparente aux électrons.
- . l'exospore ou couche dense externe.

Sur coupes fines, l'épaisseur de cette paroi peut varier d'une spore à l'autre mais est généralement comprise entre 110 et 165 nm, les couches les plus variables étant l'endospore (70-140 nm) et l'exospore (14-28 nm). Au niveau du pôle apical, immédiatement au-dessus du sac polaire, la paroi s'amincit considérablement (23-53 nm), amincissement qui n'affecte que la seule endospore (10-18 nm). Cet endroit marque l'emplacement par où se fera l'extrusion du filament polaire.

α) La membrane plasmique

La membrane plasmique est une membrane cellulaire classique d'environ 8 nm d'épaisseur, et la cryofracture révèle la présence de nombreuses particules intramembranaires, d'une densité d'environ 1120 PIM/ μm^2 , et de 7 à 9 nm de diamètre sur la face de fracture P (PF, figs 119, 120). Nous avons remarqué que chez le sporoblaste âgé (en fin de transformation sporoblastique) ces particules étaient très peu nombreuses, mais que leur nombre paraissait augmenter en début de différenciation de l'endospore ; ce phénomène s'accroît ici (figs. 119, 120), l'endospore devenant beaucoup plus épaisse. Les figures 121 et 122 confirment ce processus sur la face E où le nombre de particules augmente de 320 PIM/ μm^2 lorsque l'endospore est encore peu épaisse (fig.121), à 1620 PIM/ μm^2 lorsque celle-ci devient beaucoup plus importante (fig.122). A ce stade précis du développement, les particules intramembranaires sont nombreuses sur les deux faces PF et EF de la membrane plasmique. LIU et DAVIES (1973) chez *Thelohania bracteata*, LIU (1973, 1975) également chez *Nosema apis*, remarquent que la face P ("face convexe") de la membrane plasmique de la spore porte toujours plus de particules que la face E ("face concave"), et que leur nombre est inversement proportionnel à l'âge de la spore, observations confirmées par celles de VAVRA et coll., (1986) chez d'autres microsporidies. Si l'on considère que les particules sont des protéines facilitant le transport intramembranaire de certaines substances, il est possible que les PIM des faces P et E des figures 119, 120, 121, 122 soient liées au passage de substances nécessaires à l'édification de l'endospore encore en cours d'élaboration, et que ces figures représentent alors des spores immatures.

En extrapolant, on peut penser que sur des spores vraiment matures (donc plus âgées que celles observées ici) nous n'aurions dénombré que peu de particules sur les deux hémimembranes. Il est cependant très difficile de préciser, en observant deux fractures de deux spores différentes, si celles-ci sont exactement au même stade de développement ou non, l'idéal

étant de pouvoir observer les deux faces de fracture complémentaires de la membrane plasmique d'une même spore. Sur certaines spores, nous avons parfois observé, à côté des PIM classiques, des espèces de "protubérances" sur la face P (fig.125) et des "dépressions" sur la face E (fig. 124) de signification inconnue, mais que LIU (1973) avait considérées comme des particules de 20 nm environ. VAVRA et Coll., (1986) ont cependant montré que ces "protubérances et dépressions" ne sont pas des éléments structuraux normaux de la membrane plasmique classique, mais pourraient être dûs à l'osmolarité du fixateur ou du glycérol. De plus LIU (1975) également chez *Nosema apis* décrit "deux membranes sporales", alors qu'au cours de notre étude nous n'avons toujours observé, aussi bien sur coupes fines que sur répliques obtenues par cryofracture, qu'une seule membrane plasmique au niveau de la paroi sporale. VAVRA et Coll., (1986) pensent que la deuxième membrane observée par LIU, la plus interne, pourrait appartenir au filament polaire.

Chez certaines microsporidies telles que *Nosema bombycis* (TAKIZAWA, VIVIER et PETITPREZ, 1975) et *Stempellia mutabilis* (DESPORTES, 1976), un revêtement polysaccharidique ou cell-coat a été mis en évidence au niveau de la membrane plasmique, revêtement qui commencerait à apparaître au stade sporoblaste.

β) L'endospore

L'endospore représente la couche la plus importante de la paroi sporale et son épaisseur (70 -140 nm) peut varier d'une spore à l'autre, et même ne pas être constante sur une même spore. Au pôle apical, elle est toujours très amincie (23-53 nm) (figs. 112, 113, 114) constituant une zone plus sensible et plus fragile là où le filament polaire s'évaginera. Sur coupes fines, cette couche transparente (figs. 110 à 114), caractère qui semble général chez les microsporidies (VAVRA, 1976), serait constituée de matériel astructuré comme le signale DESPORTES (1976) chez *Stempellia mutabilis*. Cette endospore est chitineuse selon VAVRA (1967, 1968, 1971, 1976), chitine dont la présence a été confirmée par analyse chromatographique (ERICKSON et BLANQUET, 1969). Selon VAVRA (1972) puis TAKIZAWA,

VIVIER et PETITPREZ (1975) les polysaccharides sont absents de cette couche, mais DESPORTES (1976), chez *Stempellia mutabilis* y observe une réaction positive à la technique de THIERY (1967), après un traitement plus long à la TCH. Chez *Nosema apis*, les limites de l'endospore avec la membrane plasmique d'une part et l'exospore d'autre part ne sont pas toujours bien nettes et parfois du matériel très légèrement dense peut être observé dans cette endospore (figs. 115, 116). Ce matériel paraît d'ailleurs disposé régulièrement sous forme d'une hélice de 9-10 nm de large reliant la membrane plasmique à l'exospore.

En cryofracture l'endospore apparaît également sans sous-structure apparente (figs. 119 à 125). Cependant il est possible d'y observer quelques particules éparses et des particules irrégulièrement alignées, de façon discontinue, le long de la limite avec la membrane plasmique, mais aussi plusieurs vésicules de taille variable et à surface lisse, noyées dans la matrice de l'endospore (figs. 119, 120, 122, 123, 125) et dont l'origine est inconnue. Au début de la différenciation de l'endospore de *Stempellia mutabilis*, DESPORTES (1976) y remarque, sur coupes fines, la présence de sécrétions granulaires. Chez *Nosema apis*, LIU (1973, 1975) a observé une paroi sporale d'apparence homogène dont la texture est identique à celle de la paroi du sporoblaste. La matrice de cette paroi est constituée de matériel fibrillaire, composé de microfibrilles de 9 nm de diamètre ressemblant à celles de l'endocuticule fracturée de la cuticule abdominale de l'abeille (mais dont le diamètre est de 12 nm). Cet auteur ne retrouve donc pas sur les fractures, la couche transparente observée sur coupes fines et il pense même qu'il ne pourrait s'agir là que d'un espace résultant d'une rétraction due à la fixation chimique. LIU et DAVIES (1972, 1973) observent également le même phénomène sur la paroi sporale de *Thelohania bracteata* observée sur coupes fines puis sur fractures. Cependant VAVRA (1976), dans ce dernier cas, pense qu'il est possible de distinguer sur les microphotographies de LIU et DAVIES (1973) deux couches fibrillaires différentes dont la plus interne pourrait correspondre à l'endospore. Mais si sur coupes fines, la couche transparente était due à un artéfact de fixation, pourquoi n'observe-t-on pas le même phénomène au niveau de la paroi des sporoblastes, les plus âgés en particulier ? VAVRA et Coll., (1986) (cf chapitre

V), chez *Amblyospora bracteata* et *Amblyospora opacita* observent, en cryofracture, une paroi sporale constituée de deux couches granulo-fibrillaires, de texture sensiblement différente, et dont la plus interne correspond à l'endospore, tandis que chez la jeune spore de *Tuzetia sp.* cette couche n'est pas encore différenciée. Alors ne peut-on penser que les observations de LIU (1973, 1975) sur *Nosema apis* ont été faites sur des sporoblastes âgés ou de très jeunes spores immatures, chez lesquels l'endospore n'était pas encore différenciée ? Il peut-être difficile, à la vue d'une micrographie, de préciser l'âge exact d'un stade de développement, d'autant plus qu'il semble exister, chez une même espèce, une certaine variabilité dans la chronologie des événements marquant la transformation sporoblastique.

La figure 120 montre une zone où l'endospore est extrêmement amincie qui pourrait correspondre à celle située au dessus du sac polaire, observée sur coupes fines.

γ) L'exospore

L'exospore ou couche externe de la paroi sporale semble dériver de la couche de matériel dense déposée sur la membrane plasmique au stade sporoblaste. Son épaisseur est variable d'une spore à l'autre (14-28 nm) mais est toujours nettement moins importante que celle de l'endospore. Sur coupes fines cette couche ne montre aucune sous-structure apparente (figs.110 à 116) et son épaisseur paraît constante sur toute la spore, même au niveau du sac polaire où l'endospore s'amincit considérablement. Sa surface paraît relativement lisse et ne comporte aucune ornementation. LIU H.J. et LIU T.P. (1973), LIU T.P. et LIU H.J. (1974), puis LIU T.P. (1983) montrent que les spores de *Nosema apis* paraissent lisses, si après fixation elles ont été enrobées dans l'épon puis fracturées, ou rugueuses à surface réticulée si elles ont été déshydratées par la méthode du point critique, comme ceci a également été observé par STECHE et HELD (1981). L'état de la surface de la spore semble donc varier selon les méthodes de préparation employées, ce qui confirme les observations de VERNICK et Coll., (1969), LOM et WEISSER (1972), FOWLER et REEVES (1975), VAVRA et BARKER (1980), KETTLE et PIPER (1988), sur d'autres microsporidies.

Sur répliques obtenues par cryofracture, l'exospore apparaît nettement granulo-fibrillaire (figs.119 à 125) : de nombreux granules sont mêlés à de courtes fibres. Cependant dans certains cas (fig.125) il est possible de distinguer deux sous-couches au niveau de l'exospore : l'une, la plus externe est plutôt granulaire, l'autre plus interne est plutôt microfibrillaire. Cette disposition pourrait rappeler ce qui a été observé au niveau de la paroi (exospore + endospore) des microsporidies *Amblyospora opacita* et *A. bracteata* (VAVRA et Coll., 1986); chez *Nosema apis* une zone claire, correspondant à l'endospore se différencierait donc entre la sous-couche la plus interne et le plasmalemme. Ne peut-on également penser que chez *Amblyospora opacita* et *A. bracteata*, les deux couches observées (exospore et endospore) au niveau de la paroi des spores ne seraient que deux sous-couches de la seule exospore, d'autant plus que sur coupes fines, cette dernière apparaît constituée de plusieurs strates (VAVRA et Coll., 1986) ? Dans ce cas les stades observés seraient alors des sporoblastes âgés ou des spores immatures chez lesquels l'endospore ne serait pas encore différenciée.

Chez *Nosema apis*, comme chez d'autres microsporidies (VAVRA et Coll., 1986), l'exospore est toujours bordée extérieurement par une rangée dense de granules bien alignés marquant la périphérie de la spore (figs. 119 à 125).

Selon VAVRA (1964, 1968, 1976), l'exospore apparaît être de nature protéique, ce qui a été confirmé par les travaux de MAURAND et LOUBES (1973), MAURAND (1973), DESPORTES (1976) et VIVARES et Coll., (1976). Cependant WEIDNER (1970) avait noté l'existence de polysaccharides dans l'exospore, principalement dans le disque basal, tandis que TAKIZAWA et Coll. (1975) n'en ont pas observé chez *Nosema bombycis*, remarquant uniquement une réaction positive au niveau d'une très mince couche à la surface de la membrane plasmique (cell-coat) de la paroi. IRBY et Coll., (1986) ont mis en évidence, dans l'exospore de neuf espèces de microsporidies au moins quinze polypeptides différents.

C) Les contacts hôte-parasite

Nosema apis, comme *Nosemoides vivieri*, présente à tous les stades de son cycle, un contact direct avec le cytoplasme de la cellule-hôte. Les mérontes, comme nous l'avons déjà signalé, sont très souvent bordés par du réticulum endoplasmique de la cellule-hôte sous forme de vésicules très aplaties, dont seule la face externe, côté cytoplasme-hôte, porte des ribosomes (fig.126) (YOUSSEF et HAMMOND 1971), mais à ce stade nous n'avons jamais rencontré une particulière concentration de mitochondries de la cellule-hôte à la périphérie du parasite comme l'avaient remarqué ces auteurs. La présence d'un tel réticulum endoplasmique autour des stades mérogoniques avait également été mise en évidence chez *Loma salmonae* (BEKHTI et BOUIX, 1985). Parfois ce réticulum peut se dilater en vésicules relativement grandes à paroi plus lisse et à contenu assez clair (fig.127). Plus tard, au stade sporonte, lors du dépôt discontinu de matériel dense sur la membrane plasmique, le réticulum disparaît là où il y a dépôt, mais reste présent là où ce dernier est absent (figs. 128, 129). Toujours au stade sporonte, la membrane plasmique, aux endroits où il n'y a pas de matériel dense, peut former soit des évaginations (fig. 130) laissant supposer l'existence d'un contact direct entre celles-ci et des vésicules du réticulum endoplasmique de la cellule-hôte, soit des invaginations suggérant alors des figures d'endocytose (fig.131). Chez *Glugea weissenbergi* (SPRAGUE et VERNICK 1968) et *Metchnikovella wohlfarthi* (HILDEBRAND, 1974), il peut y avoir continuité entre le réticulum endoplasmique du cytoplasme-hôte et la vacuole parasitaire. DESPORTES et Coll. (1985) observent, chez *Enterocytozoon bienensi*, des sporoblastes entourés de vacuoles issues des vésicules dilatées du réticulum endoplasmique de l'entérocyte-hôte. Souvent des microtubules de 19-22 nm de diamètre sont présents dans le cytoplasme-hôte environnant (fig.131). Des microtubules de 24-27 nm de diamètre, parmi lesquels peuvent se trouver quelques mitochondries mais jamais en forte concentration, peuvent être disposés plus ou moins perpendiculairement à la surface du sporonte, mais nous ne pouvons préciser s'ils sont en contact direct avec elle ou non (fig.132). Comme l'ont signalé YOUSSEF et HAMMOND (1971),

chez le sporonte âgé ou le jeune sporoblaste (la couche de matériel dense étant devenue pratiquement continue), la paroi du parasite peut former des évaginations tubulaires, d'environ 59 nm de diamètre et 175-350 nm de long, plus ou moins renflées à leurs extrémités et limitées par la membrane plasmique recouverte de la couche de matériel dense (figs. 133, 134, 135). TAKVORIAN et CALI (1983) décrivent, chez la microsporidie *Glugea stephani* 3 types de formations tubulaires associées à la paroi des sporontes et des sporoblastes, dont les types I et II pourraient correspondre respectivement aux formations tubulaires (figs. 133, 134, 135) et aux microtubules (fig.132) observés chez *Nosema apis* .

STREETT et HENRY (1987) pensent que chez *Nosema cuneatum* , le matériel dense déposé sur la membrane plasmique du sporonte pourrait tirer son origine du réticulum endoplasmique de la cellule-hôte. Toutes ces formations associées directement ou indirectement à la surface des mérontes, sporontes, sporoblastes, suggèrent l'existence d'échanges entre le parasite et la cellule-hôte. Selon YOUSSEF et HAMMOND (1971), les évaginations de la membrane plasmique et les structures tubulaires augmentent considérablement la surface totale disponible pour ces échanges qui ne seraient donc possibles que jusqu'au stade sporoblaste, car chez la spore il semble que la différenciation de l'endospore rende ces échanges beaucoup plus difficiles si ce n'est impossibles. Chez *Nosema apis* , aucune de ces formations n'a jamais été observée au niveau de la paroi de la spore. Des structures similaires avaient également été remarquées chez *Tuzetia debaisieuxi* (VAVRA 1965, LOUBES et MAURAND 1976) et dans les pansporoblastes de *Thelohania corethrae* (VAVRA 1965). Chez *Inodosporus spraguei* OVERSTREET et WEIDNER (1974) observent dans le pansporoblaste, des sortes de "canaux membraneux" reliant l'enveloppe de celui-ci à la paroi des sporoblastes au niveau des deux pôles. Ce pansporoblaste pourrait constituer un système de transport des molécules et des ions. WEIDNER (1975) remarque la formation de vésicules de pinocytose au niveau de la membrane, et vers l'intérieur, de la vacuole parasitaire chez *Encephalitozoon cuniculi* . Par contre selon ANDREADIS et HANULA (1987), les expansions tubulaires observées au niveau de la paroi des jeunes sporoblastes chez *Ovavesicula popilliae*, pourraient être impliquées dans la sécrétion du

matériel granulaire présent dans la vésicule sporophorique. Chez *Loma dimorpha*, LOUBES et Coll. (1984) notent la présence, dans la vacuole parasitophore, de formations tubulaires structurées en contact d'une part avec la membrane de cette vacuole, et le sporoblaste d'autre part. MORRISON et SPRAGUE, chez *Loma morhua*, attribuent à ces tubules un rôle physiologique en permettant une communication entre la cellule parasitaire et la cellule-hôte. Tout ceci suggère donc l'existence d'échanges entre l'hôte et le parasite, dont le mécanisme n'est pas encore élucidé.

CHAPITRE V

ETUDE EN CRYOFRACTURE DE LA STRUCTURE DE QUELQUES
MICROSPORIDIES : LA VESICULE SPOROPHORIQUE ET LA PAROI
SPORALE.

Cette étude a fait l'objet de l'article "A freeze-fracture study of Microsporidia (Protozoa : Microspora). I. The sporophorous vesicle, the spore wall, the spore plasma membrane. (J. VAVRA, D. VINCKIER, G. TORPIER, E. PORCHET, E. VIVIER). *Protistologica*, 1986, XXII (1) : 143 - 154.

Cinq espèces de microsporidies : *Tuzetia sp*, *Nosema apis*, *Amblyospora bracteata*, *Amblyospora opacita*, *Amblyospora varians*, ont été étudiées en cryofracture, les résultats ainsi obtenus étant complétés par des observations faites sur coupes fines.

Parmi ces microsporidies, seules les spores de *Nosema apis* (comme tous les autres stades du cycle) sont en contact direct avec le cytoplasme de la cellule-hôte, les spores des quatre autres espèces étant contenues dans une sorte de "sac", la vésicule sporophorique (ou pansporoblaste) limitée par une membrane (membrane pansporoblastique) qui isole ces spores du cytoplasme de la cellule-hôte.

A) La vésicule sporophorique

Chez *Tuzetia sp*. la vésicule sporophorique est une structure transitoire enveloppant individuellement chaque spore mais disparaissant lorsque les spores deviennent matures, tandis que chez les trois espèces d'*Amblyospora* elle persiste, contenant alors huit spores ainsi que du matériel sécrété.

La membrane de cette vésicule, observée suivant un plan de fracture transversal, apparaît comme une fine ligne ondulée constituée de petits granules de taille irrégulière et disposés en une rangée plus ou moins discontinue. Suivant un plan de fracture longeant sa surface, elle prend l'aspect d'une mince couche membranaire parfois rugueuse, étroitement accolée à la surface des spores, visualisant ainsi soit une face P, soit une face E. Ces faces peuvent porter quelques petits granules (toujours plus nombreux sur la face P que sur la face E) de différentes dimensions et dont certains rappellent les particules intramembranaires. Ces observations semblent corroborer l'hypothèse déjà émise (CANNING et HAZARD, 1982; VAVRA et Coll., 1982) selon laquelle la membrane de la vésicule sporophorique n'est pas une

vraie membrane, mais un produit de sécrétion du sporonte, structuré à la manière d'une membrane typique.

Dans la vésicule sporophorique, excepté chez *Tuzetia sp.* se trouvent, parmi les spores, deux types de granules : des petits granules agglomérés en amas denses irrégulièrement répartis et des granules plus gros disposés en une couche assez mal définie paraissant suivre, à une certaine distance et de façon irrégulière, le contour des spores. Tous ces granules paraissent correspondre à ceux observés sur coupes fines.

B) La paroi sporale

Sur coupes fines, les spores des espèces étudiées présentent la paroi typique des spores de microsporidies (VAVRA, 1976) avec ses trois composantes : la membrane plasmique qui limite le cytoplasme de la spore, l'endospore et l'exospore. Ces différentes composantes ont été retrouvées sur les répliques obtenues par cryofracture.

1) L'exospore

En microscopie électronique classique l'exospore, chez *Nosema apis* et *Tuzetia sp.*, a l'aspect d'une fine couche homogène, dense aux électrons et sans sous-structure apparente, alors que chez les trois espèces d'*Amblyospora*, il s'agit d'une épaisse couche de matériel opaque dans laquelle plusieurs strates peuvent être distinguées.

En cryofracture, cette couche, chez *Nosema apis* et *Tuzetia sp.*, apparaît granulo-fibrillaire et de nombreux granules mélangés avec de courtes fibres y sont observés. Chez *Amblyospora varians* et *A. opacita* la texture semble identique avec de grossières et courtes fibres disposées parmi de nombreux granules. Chez *Amblyospora bracteata* cette exospore apparaît finement granulaire avec quelques fibres plutôt minces éparses parmi les granules. Chez les cinq espèces, la limite externe de l'exospore a la même apparence c'est à dire marquée par une rangée dense de particules bien alignées.

2) L'endospore

Sur coupes fines, l'endospore (qui n'est bien visible que chez les spores matures) des cinq espèces étudiées (et comme celle des autres espèces de microsporidies, VAVRA 1976) apparaît comme une couche claire, pratiquement transparente et sans structure visible.

En cryofracture, chez *Nosema apis*, l'endospore apparaît également comme une couche claire sans structure, si ce n'est quelques granules et quelques vésicules à surface lisse, noyés dans la matrice de cette endospore. Par contre, chez les différentes *Amblyospora*, elle prendrait un aspect granulo-fibrillaire, sensiblement plus fibrillaire que l'exospore, et dont les granules et les fibres sont de grosseur différente de ceux et celles de l'exospore.

3) La membrane plasmique

En cryofracture, la membrane plasmique présente une grande uniformité de structure chez toutes les espèces étudiées. Cette structure est typique de toute membrane cytoplasmique, avec deux hémimembranes portant des particules intramembranaires de taille régulière (7, 5 - 10 nm de diamètre), généralement plus nombreuses sur la face P que sur la face E. Le nombre de ces particules semble dépendre de l'âge de la spore en étant inversement proportionnel à celui-ci. Si l'on considère que la plupart des PIM sont des protéines dont le rôle est le transport de substances au travers de la membrane, la diminution de la densité des particules, au fur et à mesure de la maturation de la spore, correspondrait donc à une décroissance simultanée du transport de substances au travers de cette membrane.

A FREEZE-FRACTURE STUDY OF MICROSPORIDIA
(PROTOZOA : MICROSPORA)
I. THE SPOROPHOUS VESICLE, THE SPORE WALL,
THE SPORE PLASMA MEMBRANE

Jiri VAVRÁ (1), Daniel VINCKIER (2), Gérard TORPIER (3),
Eliane PORCHET (2), Emile VIVIER (2)

(1) Department of Parasitology and Hydrobiology,
Faculty of Sciences, Charles University, 128 44 Prague, Tchécoslovaquie.

(2) Service de Protistologie, Laboratoire de Biologie Animale,
Université des Sciences et Techniques de Lille,
59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

(3) Centre d'Immunologie et Biologie Parasitaire,
Unité INSERM 167, Institut Pasteur,
1, rue du Professeur A. Calmette. B.P. 245, 59019 Lille Cédex.

SUMMARY

Five species of microsporidia, (*Tuzetia* sp., *Nosema apis*, *Amblyospora bracteata*, *A. opacita*, *A. varians*), fixed by conventional e.m. fixatives or by glutaraldehyde supplemented with potassium chloride, were studied by freeze-fracture using ultrathin sections as controls. The sporophorous vesicle (pansporoblast) membrane cleaved along its surface is revealed as membranous layer, bearing sparse intramembrane particle-like granules of different sizes. In cross-fracture it has the aspect of a thin, granular, discontinuous line. The spore wall has a fibrillo-granular structure in both the exospore and endospore layers except in *N. apis* where the endospore is structureless. The plasma membrane is similar to plasmalemma but with intramembrane particles of uniform size on both its faces, but more abundant on the P face. The number of intramembrane particles is inversely related to the age of the spore. When KCl is added to the fixative, numerous invaginations appear on the P face of the plasma membrane and corresponding protrusions appear on the E face. Their size is proportional to the KCl concentration. A certain degree of spore maturity is necessary for the plasma membrane to react in this way.

Key-words : Microsporidia, Spore, Ultrastructure, Freeze-fracture

RESUME

Cinq espèces de microsporidies (*Tuzetia* sp., *Nosema apis*, *Amblyospora bracteata*, *A. opacita*, *A. varians*), fixées dans les fixateurs traditionnels utilisés en microscopie électronique ou dans la glutaraldéhyde additionnée de chlorure de potassium, ont été étudiées sur répliques obtenues par cryofracture, les résultats ainsi obtenus étant complétés par des observations faites sur des coupes fines. La membrane de la vésicule sporophorique (pansporoblaste), observée suivant un plan de fracture longeant sa surface prend l'aspect d'une couche membranaire comportant des granules épars de différentes dimensions, rappelant les particules intramembranaires. Suivant un plan de fracture transversal, elle a l'aspect d'une fine ligne granulaire discontinue. La paroi de la spore montre une structure fibrillo-granulaire aussi bien au niveau de l'exospore que de l'endospore, sauf chez *Nosema apis* où cette dernière est vide de toute structure. Le plasmalemma de la spore ressemble à une membrane cytoplasmique classique avec, sur les deux faces, des particules intramembranaires de dimension uniforme, mais qui sont cependant plus abondantes sur la face P. Le nombre de ces P.I.M. est inversement proportionnel à l'âge de la spore. Si du KCL est ajouté au fixateur, de nombreuses invaginations apparaissent sur la face P du plasmalemma et correspondent aux protubérances apparues sur la face E. Leur taille est proportionnelle à la concentration en KCL. Cependant le plasmalemma ne réagit de cette façon que si la spore a atteint un certain stade de maturation.

Mots-clés : Microsporidie, Spore, Ultrastructure, Cryofracture.

Manuscrit reçu le 27 décembre 1986, accepté par le Comité de lecture le 23 janvier 1986.

Hommage au Professeur P.-P. GRASSÉ.

ABBREVIATIONS

E	Plasma membrane, face E	SE ₂	secretion granules, coarse
EN	endospore	SP	spore
EX	exospore	SV	sporophorous vesicle (pansporoblast)
P	plasma membrane, face P	SVM	sporophorous vesicle membrane
PF	polar filament	SVME	sporophorous vesicle membrane, face E
PO	polaroplast	SVMP	sporophorous vesicle membrane, face P
PM	plasma membrane	SW	spore wall
SB	sporoblast		
SE ₁	secretion granules, fine		

INTRODUCTION

The microsporidia and especially their spores represent one of the most elaborate examples of structural adaptations of a unicellular protistan organism to the parasitic way of life. The microsporidian spore has a unique function in the transmission of the infection. It is capable, under proper stimulation to inject the "germ" of the microsporidian into a cell of a new host. This capability is based on the presence of several specialized organelles in the spore. The polaroplast and the posterior vacuole are able to swell and serve as osmotic propellant for the germination of the spore. The most remarkable event of the spore germination is the nearly instantaneous evagination of the polar filament through the lumen of which the "germ" (i.e. the cytoplasmic contents of the spore) is expelled from the spore and injected into the host tissue. The chitinous spore case gives to the spore its environmental resistance and serves as the pressure vessel during germination (see VAVRA, 1976 for review of spore structure and function).

All spore organelles are packed into a very small volume and in fact, spores of some microsporidian species belong to smallest known eukaryotic cells. The compactness of the microsporidian spore is the reason why the elucidation of its internal structure was only possible with the aid of electron microscopy. Yet, despite the fact that more than 200 papers dealing with the fine structure of microsporidia were published, the knowledge of the ultrastructural organization of these parasites has still many gaps.

This is especially true as the substructure of spore organelles and their mutual relationship are concerned.

The freeze-fracture technique has been used very little in the study of microsporidia despite the enormous potential it offers. A series of papers was published by LIU (1972, 1973), LIU and DAVIES (1972 a,b,c, 1973 a.), LIU and LIU (1974) and by LIU *et al.* (1971). These studies certainly contributed to our understanding of spore functional morphology, however, their limitation was that they were performed on a non-fixed material and on three species only.

Stimulated by the fact, that fixed material gives generally better resolution is freeze-fracturing and replication, we have undertaken the present study using two species of parasites investigated in previous freeze-etching studies and complementing this with data obtained by freeze-fracturing of another three species.

The present paper focuses its attention to the structure of the spore wall and the spore plasma membrane. The sporophorous vesicle is also considered as it represents a growth chamber for the spores.

Some results of the present study were already published in a short report (VAVRA *et al.*, 1982).

MATERIAL AND METHODS

Five microsporidian species were studied. *Tuzetia* sp., an undescribed parasite of oocytes of *Cyclops strenuus* (Crustacea : Cyclopidae) was found in vernal pools near Kačez, Czechoslovakia. *Nosema apis* was obtained from the midgut of the honeybee. *Amblyospora* (syn. *Thelohania*) *bracteata* and *Amblyospora* (syn. *Thelohania*) *varians*, parasites of the fat body of larvae of *Odagmia ornata* (Diptera : Simuliidae) were collected in the river l'Helpe Majeure at Dompierre (Departement du Nord, France). *Amblyospora* (syn. *Thelohania*) *opacita*, parasite of the larval fat body of *Aedes cantans* (Diptera : Culicidae) was found in vernal pools near Celákovice by Prague, Czechoslovakia.

There exists in the literature some confusion concerning the identity of the *Amblyospora* spp. we used in our study (HAZARD and OLDACRE, 1975, VAVRA and UNDEEN, 1981). We will deal with taxonomic problems related to these species in a separate paper. Presently it is sufficient to state that our *A. bracteata* is morphologically similar to the form I of *T. bracteata* of MAURAND and LOUBÈS (1978). *Amblyospora varians* is similar to the form II of *T. bracteata* of the same authors. This species is also morphologically identical with *Thelohania bracteata* used in the freeze-etching studies by LIU and his co-authors. *A. opacita* is a dimorphic species having octopores with 8 polar filament coils (3 thick, 5 thin coils).

The fixation was performed as shown in Tab.1. After fixation the pieces of tissues containing parasites were washed thoroughly in 0.1 M cacodylate buffer. Impregnation with glycerol and the freeze-fracture was performed according to the protocol given by PORCHET and TORPIER (1977).

Control specimen for ultrathin sections were embedded into epon or eponaraldite, sectioned and stained with uranyl acetate and lead citrate.

Observations were made on a JEOL cx 120 electron microscope*.

* We are grateful to A. JACOB and E. FERREIRA for technical help.

TABLE 1
Fixation methods used.

Microsporidian species/code	A	B	C	D	E	F	G
<i>Tuzetia</i> sp.....	TUA	TUB					
<i>Amblyospora bracteata</i>	ABA	ABB	ABC	ABD	ABE	ABF	ABG
<i>Amblyospora opacita</i>	AOA	AOB					
<i>Amblyospora varians</i>	AVA	AVB	AVC	AVD	AVE	AVF	AVG
<i>Nosema apis</i>	NAA	NAB					

Fixation: A = glutaraldéhyde 3 %, cacodylate buffer pH 7.2, 0.1 M ϕ

B = as A but with postfixation in 1 % OsO₄;

C = as A but with 1 M sucrose added;

D = as A but with 2 M potassium chloride added;

E = 3 % glutaraldéhyde in saturated solution of potassium chloride;

F = as D but with postfixation in 1 % OsO₄;

G = as E but with postfixation in 1 % OsO₄.

OBSERVATIONS

In mature or nearly mature spores the fracture usually followed the cytoplasmic membrane lining the interior of the spore case, i.e. the fracture passed through the middle, hydrophobic layer of the plasma membrane separating the cytoplasm of the spore from the spore wall. Immature spores fractured easily at any plane passing through the spore but fractures similar to those of mature spores were frequently obtained.

The following structures were identified in frozen-fractured preparation: the sporophorous vesicle membrane, the secretory products inside the sporophorous vesicle, the spore wall, the plasma membrane of the spore, the polaroplast, the polar filament, and structures probably representing parts of the posterior vacuole. Nuclei were usually seen in developmental stages and in young spores.

As stated in the Introduction, the present paper will consider the sporophorous vesicle, the spore wall and the spore plasma membrane. Other structures will be described in a future publication.

The sporophorous vesicle (syn. pansporoblast or sporocyst) (SV)

The SV is present in all examined species, except *N. apis* and has in all of them very similar organization. In *Tuzetia* sp., however, the SV is a transient structure, enveloping individually each spore and disappearing when the spore becomes mature. In all other species the SV is persistent and looks in ultrathin sections like a membranous sac enshrouding eight spores and containing

besides the spores secretory material in the form of local aggregates of fine granules or round dense bodies (Fig. 1).

The sporophorous vesicle membrane (SVM) was identified in replicas of frozen-fractured material of all SV possessing species, but usually only in transverse fractures. In this case the SVM appears as a thin, undulatory line, consisting of small granules, irregular in size and arranged in a more or less single discontinuous row (Figs. 5, 6, 7). Only rarely-in *A. bracteata* (ABC) and in *A. varians* (AVD)-we found a structure which we identify as SVM seen in the "en face" view. Such tentative SVM is revealed as slightly and irregularly corrugated membrane, closely applied to the surface of the spores (Figs. 2, 3, 4). Some of the corrugations are apparently impressions of structures lying below the SV membrane (Fig. 3). We believe that the SVM was actually cleaved during the freeze-fracturing, as both its convex (SVMP) and concave (SVME) faces were exposed, both of which carried some granules resembling the intramembranous particles (Figs. 3, 4). The particles were somewhat more frequent on the P face but generally their density was quite low. We do not give their exact number because at higher magnification the exposed SVM is irregularly granulated bearing particles of different sizes from which only the larger granules protrude enough above the surface of the membrane. On the SVMP face there are also some crater-like protrusions of different size on top of which the membrane was apparently torn away. These craters make impression that they are situated in places where some tubular structures lying under the SVM touch its surface - Smaller, pit-like depressions are found on the E face of the SVM (Fig. 3).

The internal structures of the sporophorous vesicle

In addition to spores, the SV is in all species except *Tuzetia* sp. filled with irregularly distributed masses of small, densely packed granules (SE₁, Fig. 14). An ill-defined and irregular layer of large particles follows at a distance the contour of the spores within the SV (SE₂, Fig. 14). The rest of the vesicle seems empty (Fig. 14). In *Tuzetia* sp. one observes sometimes inside the SV a single thick layer of granular material situated closely under the SVM (Fig. 7).

The spore envelope

The observation of ultrathin sections show that in all examined species the envelope of the spore has its typical components (VAVRA, 1976): the spore plasma membrane representing the boundary between the wall and the cytoplasm of the spore. All these components were recognized in the freeze-fracture preparations.

The exospore

In ultrathin sections of *N. apis* and *Tuzetia* sp., the exospore is a thin, homogenous, electron-opaque layer in which no substructures are recognized (Figs. 8, 10). In

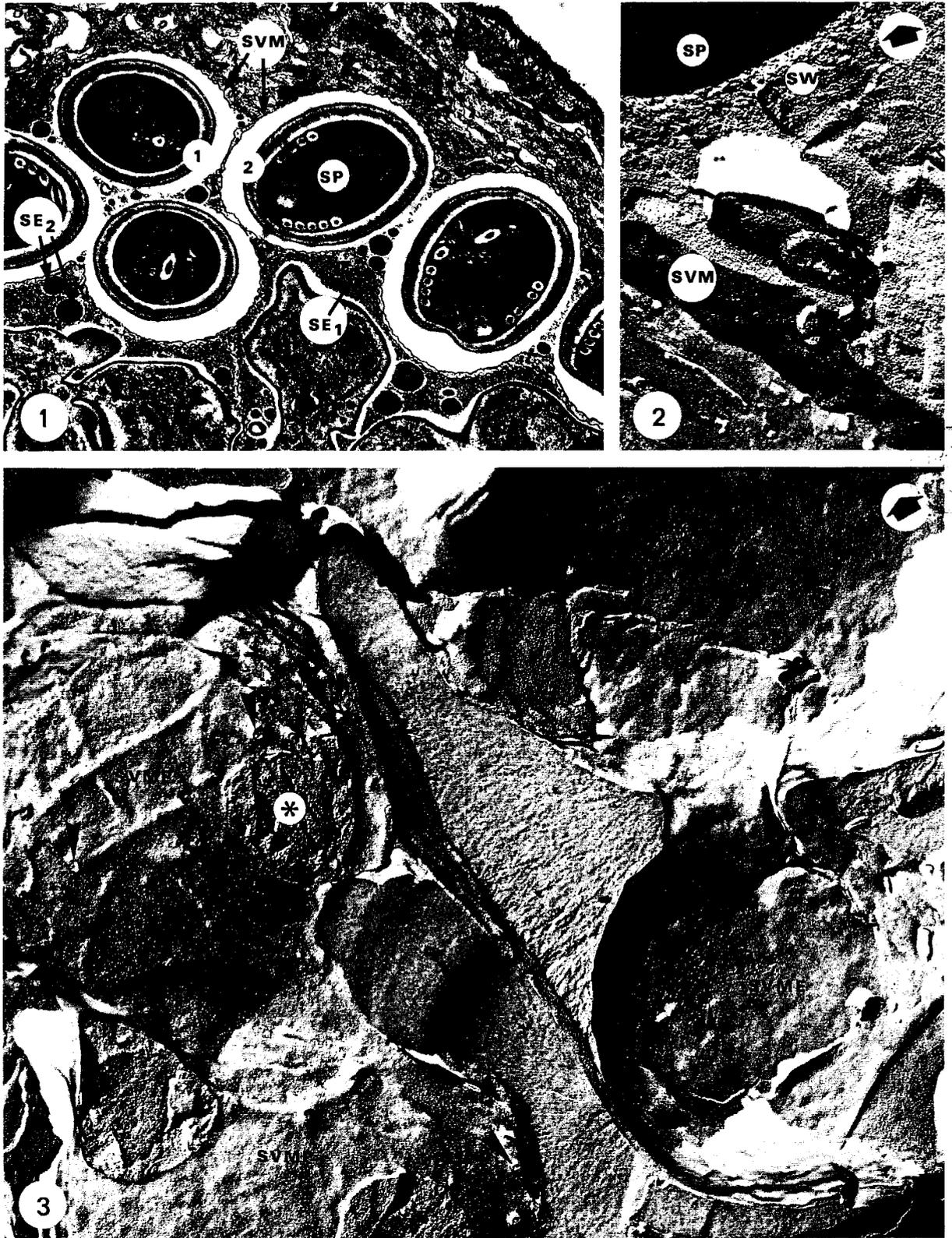


FIG. 1. — Part of two (1, 2) sporophorous vesicles with mature spores of *Amblyospora bracteata* (Fix. ABB). The sporophorous vesicle membrane follows the spore surface at a close distance. Note the two types of secretory material inside the SV. ($\times 12\,980$).

FIG. 2. — Part of the sporophorous vesicle membrane of *A. varians* (Fix. AVD) revealed by freeze-fracture. Note the corrugated surface of the SVM. ($\times 37\,800$).

FIG. 3. — Sporophorous vesicle membranes of *A. bracteata* (Fix. ABA) showing both the convex (P) and concave (E) faces. Folds on the SVM suggest the presence of some structures (partly tubular) under the membrane. The tubules seem to protrude through the membrane (coarse arrow) on the P face, while the E face has pit-like invaginations (fine arrow). In some places the membrane is torn away (*) ($\times 27\,520$).

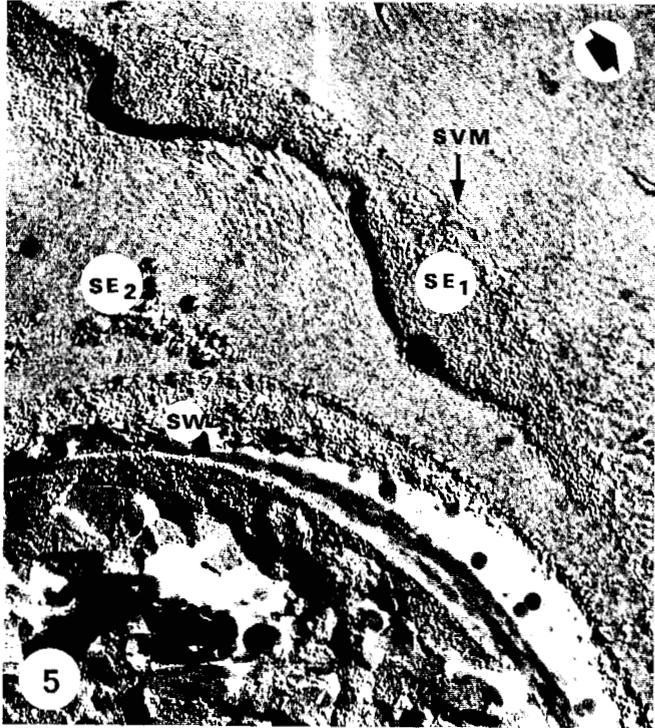
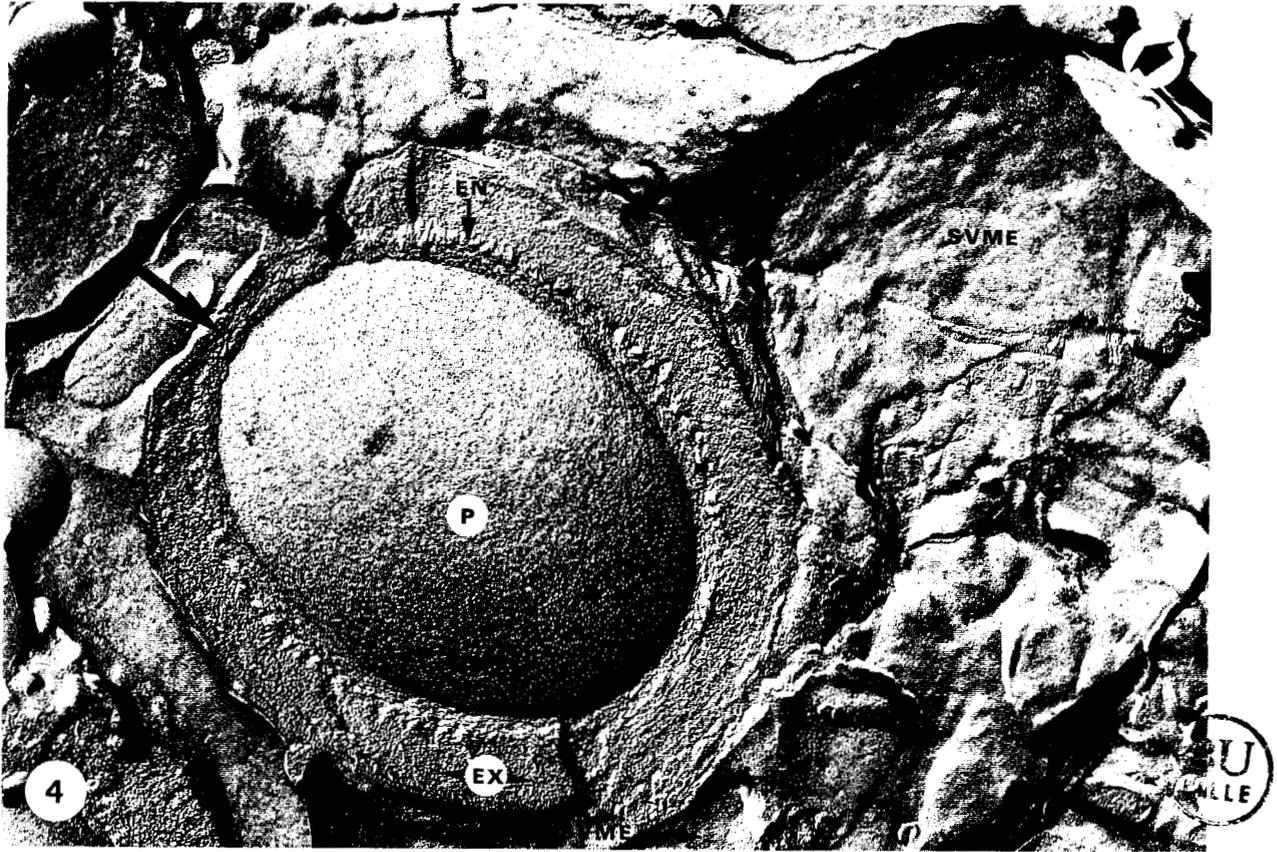


FIG. 4. — Part of *A. bracteata* (Fix. ABC) sporophorous vesicle opened by fracture. E faces of the cleaved sporophorous vesicle membrane are shown as well as one spore with the P face of the plasma membrane and its wall with endo- and exospore. The thin part of the wall at the apical pole of the spore is at coarse arrow. ($\times 31\,610$).

FIG. 5. — Part of *A. opacita* (Fix. AOA) sporophorous vesicle showing the SVM in cross-fracture. Note the similarity of the granular secretory material (SE₁) to the membrane structure. ($\times 49\,880$).

FIG. 6. — Sporophorous vesicle membrane around the sporoblast of *A. opacita* (Fix. AOA) shown in cross-fracture. Note the discontinuous character of the SVM. The future spore wall is at arrow. ($\times 52\,000$).

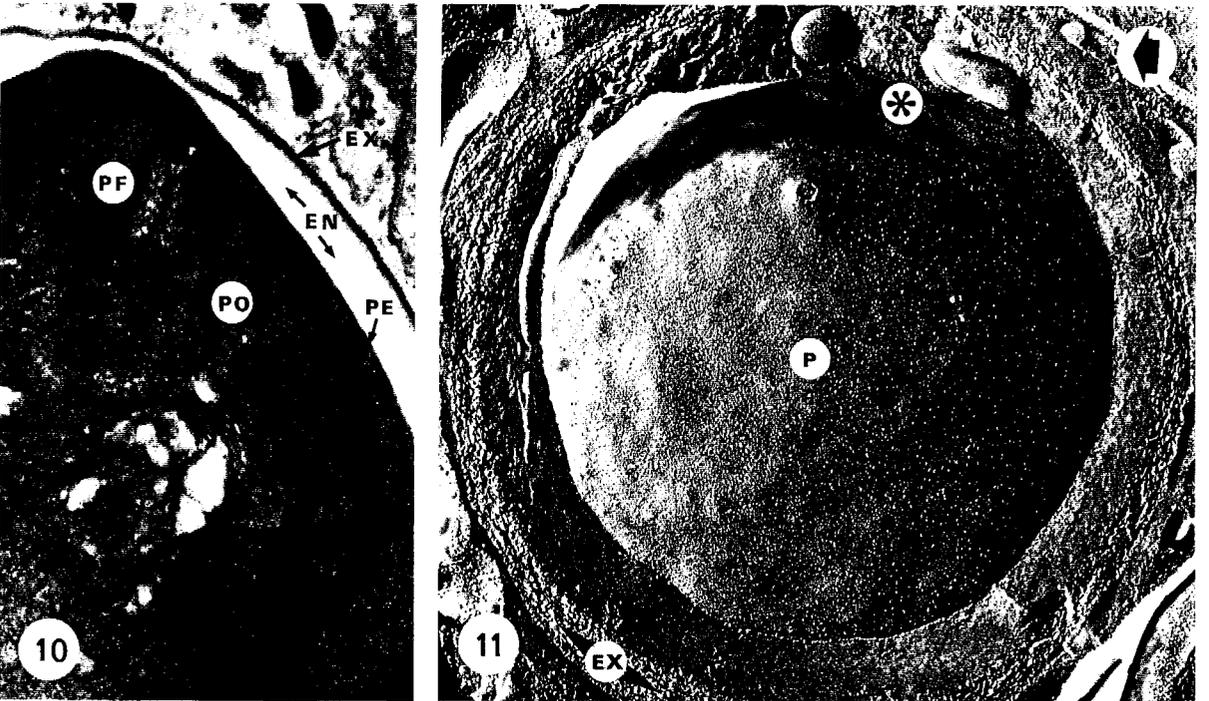
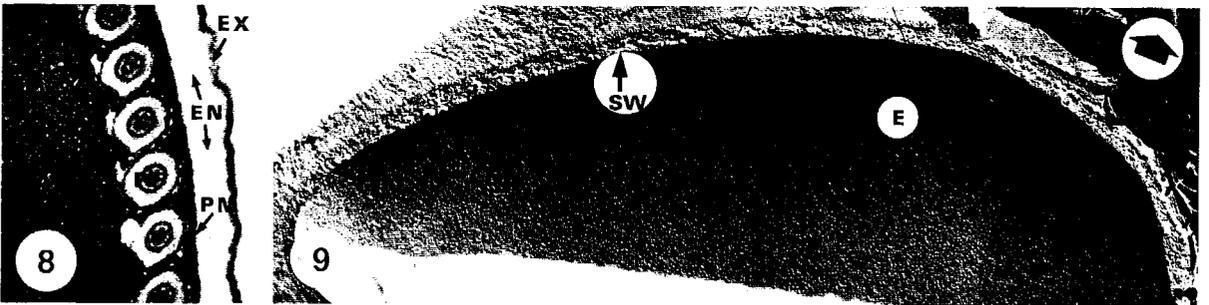
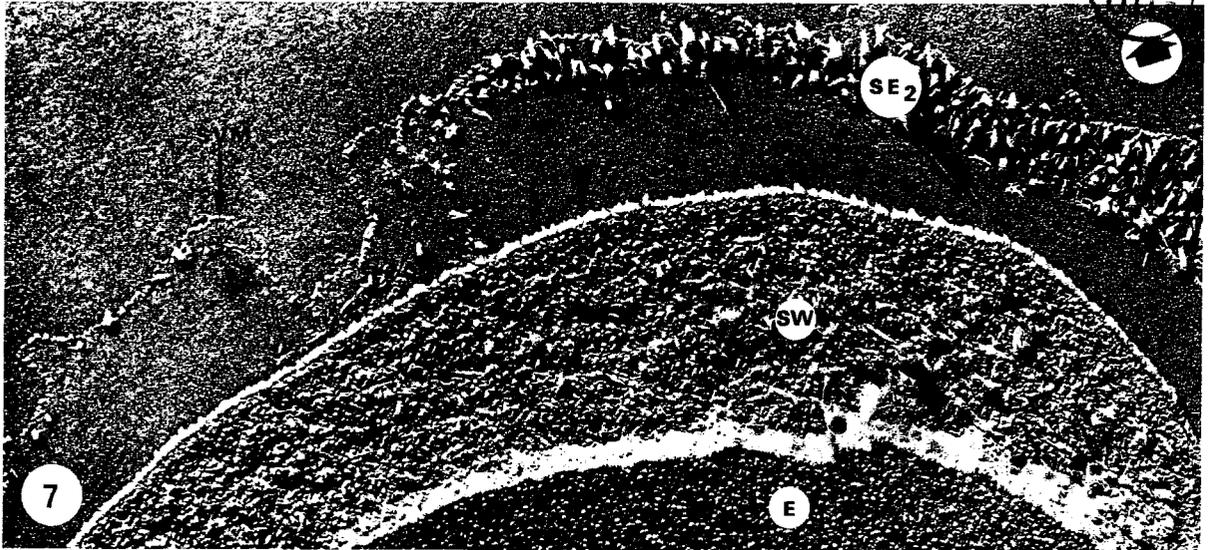


FIG. 7. — Part of the frozen-fractured young spore of *Tuzetia* sp. (Fix. TUA) showing the SVM in cross-fracture, the single type of secretory material, the undifferentiated spore wall and the plasma membrane with still many intramembranous particles. Note the alignment of granules at the outer edge of the wall (arrow) ($\times 67\ 000$).

FIG. 8. — Detail of a mature spore of *Tuzetia* sp. (fix. TUB) as seen in ultrathin section ($\times 53\ 000$).

FIG. 9. — Frozen-fractured *Tuzetia* sp. (Fix TUA) mature spore. Note the absence of intramembranous particles on the E face of the plasma membrane ($\times 18\ 150$).

FIG. 10. — Part of the spore of *N. apis* seen in ultrathin section (Fix. NAB). ($\times 56\ 950$).

FIG. 11. — Frozen-fractured spore of *N. apis* (Fix NAA). Note the presence of vesicles of unknown function in the endospore which is otherwise structureless (*). ($\times 38\ 340$).

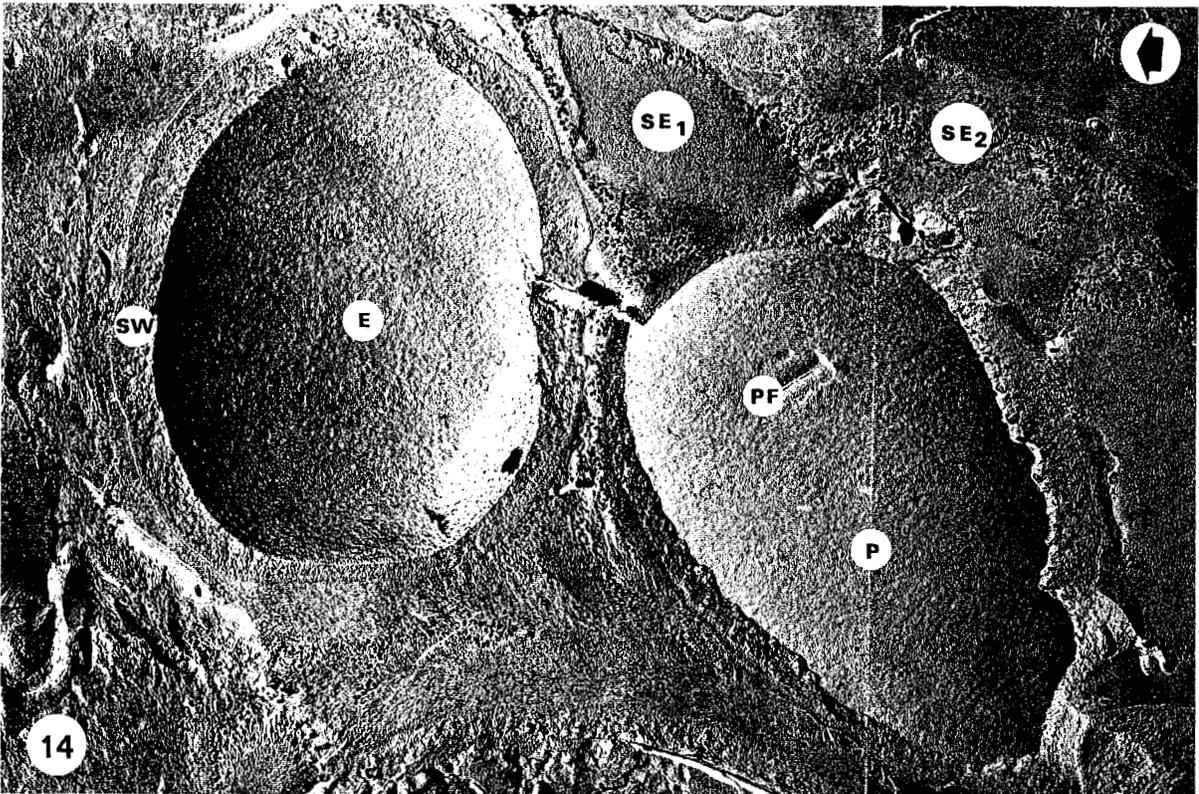
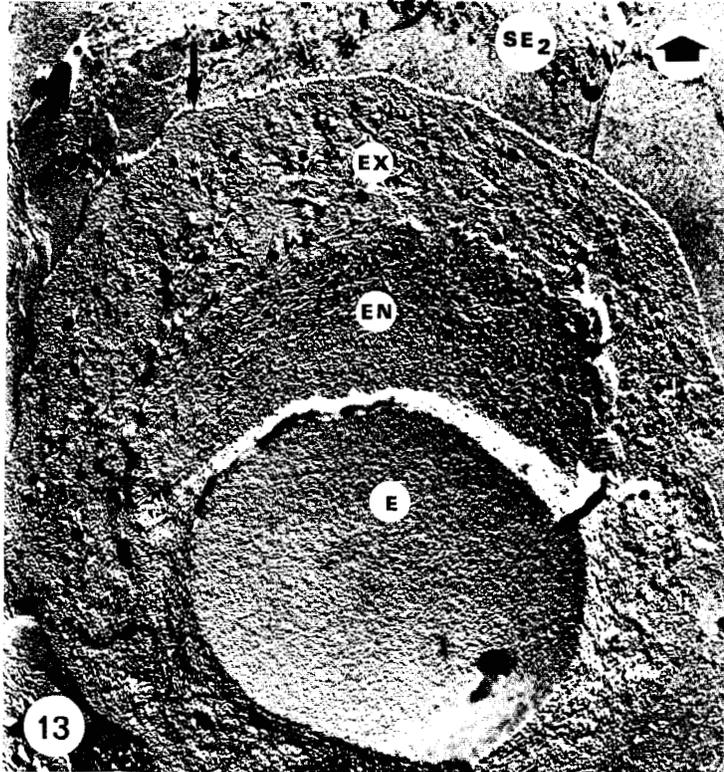
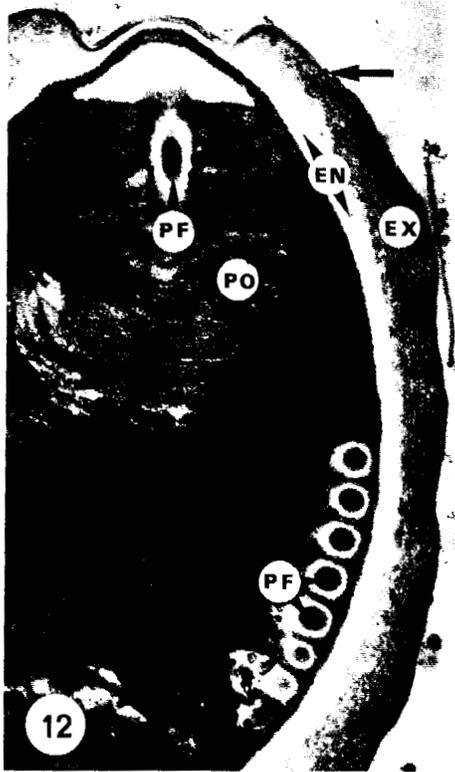
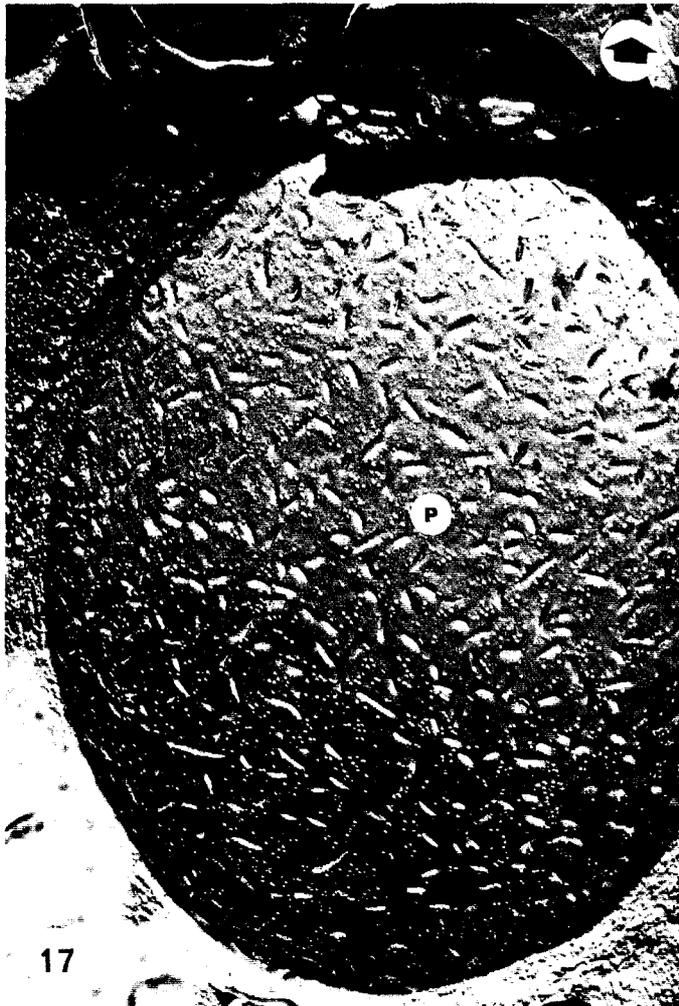
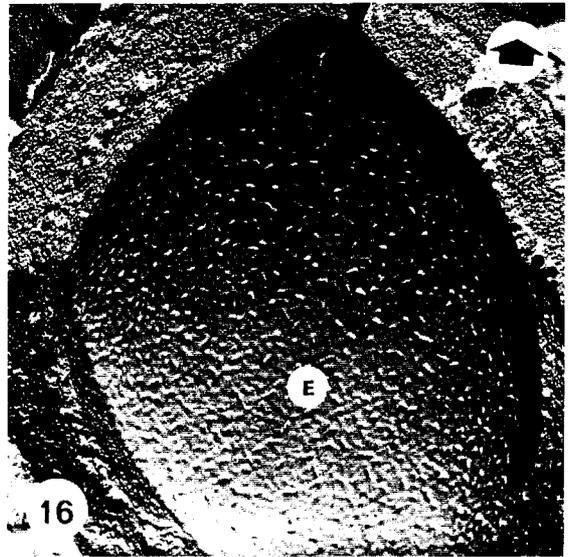
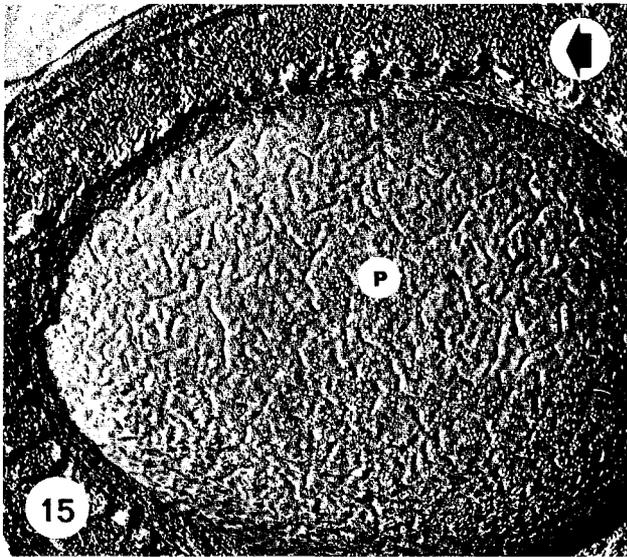


FIG. 12. — Part of the longitudinally sectioned spore of *A. varians* (Fix. AVB). The membrane-like outer margin of the exospore is at arrow. ($\times 38\ 000$).

FIG. 13. — Tangential fracture through the spore of *A. opacita* (Fix. AOA). The outer granular layer of the exospore is at arrow. ($\times 63\ 840$).

FIG. 14. — Part of the sporophorous vesicle of *A. opacita* (Fix. AOA) opened by freeze-fracture. ($\times 18\ 460$).



freeze-fracture preparations this layer consists of many granules, intermingled with some short fibres. A row of coarser granules is present on the periphery of the exospore (Figs. 7, 9, 11). In all *Amblyospora* spp. examined, the exospore layer has a similar structure in ultrathin sections. It is represented by a thick layer of opaque material in which several strata parallel to the spore surface can be recognized. The outer margin of the exospore is formed by two narrow layers arranged in a membrane-like fashion, the inner one being more dense (Figs. 1, 12).

In freeze-fracture preparations the exospore of *A. varians* and *A. opacita* has granulo-fibrillar structure in which among abundant granules are scattered short coarse fibres (Figs. 13, 14). In *A. bracteata* the exospore is finely granular with some rather fine fibres mixed with the granules (Fig. 4). The outer limit of the exospore is similar in all examined species being represented by relatively large particles arranged in a single layer on the exospore surface (Figs. 7, 13, 14).

The endospore.

The endospore appears in sectioned material as a clear, structureless layer inserted between the plasma membrane and the exospore. It is rarely present in *Tuzetia* sp. in which this layer is formed only at a late phase of spore maturation.

In freeze-fractured material, there are some differences in the structure of the endospore layer among individual species. The endospore is most clearly distinguished in fully or nearly mature spores of *N. apis* where it appears as a thick, structureless layer. Occasionally, there are several (1-3), medium sized vesicles with a smooth surface, embedded in the endospore material of *N. apis* (Fig. 11).

In all *Amblyospora* spp. examined, the endospore is granulo-fibrillar in structure. It can be differentiated from the exospore by different coarseness of its fibres and granules. The endospore usually makes the impression that there are more fibres among its granules than in the exospore layer. The fibres are most conspicuous in a layer of coarse appearance at the outer edge of the endospore where it seems that the fibres are preferentially oriented parallel to the spore surface and perpendicularly or obliquely to the spore long axis (Fig. 4).

The plasma membrane of the spore

In all examined species it has a similar structure in the freeze-fracture preparations. The spore plasma membrane is a typical cytoplasmic membrane bearing intramembranous particles uniform in size (7,5-10 nm) which are more numerous on the P face. The number of particles depends of the age of the spore. They are very numerous in young spores (Fig. 7,14). During spore maturation, the number of particles decreases (Figs. 4,11) and in fully mature spores the plasma membrane is practically without particles (Figs. 9,13).

In spores which were fixed in buffered glutaraldehyde with no further additives, the plasma membrane is nearly flat, i.e. it follows regularly the inner contour of the spore shell. When 1 M sucrose is added to the fixative, some spores have the plasma membrane with slightly corrugated surface. The configuration of the plasma membrane, however, dramatically changes when KCl is added to the fixative. In such case the plasma membrane of some spores shows corrugations the prominence of which is proportional to the KCl concentration - When the fixative contains 2 M KCl, small dash like depressions appear on the P face, while the E face shows dash-like elevations (Figs. 15, 16). These depressions and elevations become very conspicuous when the spores are fixed in glutaraldehyde in saturated solution of KCl (Figs. 17, 18). We have no data confirming that the depressions and elevations are truly complementary but judging from their size it seems to be the case. At higher magnifications and with the very low angle of shadowing, one can observe that the depressions contain a small ridge somewhat elevated above the bottom of the groove (Fig. 19). The intramembranous particles do not occur in the depressions or on the elevations (Fig. 17). It should be stressed that the depressions and elevations in the plasma membrane appear only in some spores. There is evidently some relationship to the age of the spore, as spores having large quantity of intramembranous particles on the plasma membrane never show deep alterations due to the presence of KCl in the fixative. In such spores the plasma membrane becomes only slightly corrugated.

The reaction of spores of *N. apis* to the presence of KCl in the fixative was not examined. However, in this species we sometimes observe small conical elevations on the P face of the plasma membrane corresponding to small, pit-like depressions in the E. face. These formations are

FIGS. 15, 16. — The spore plasma membrane of *A. bracteata* fixed in the presence of 2M KCl (fix. ABD). Note the presence of relatively small depressions on the P face and of small elevations on the E face. (Fig. 15 : $\times 41\ 570$; Fig. 16 : $\times 40\ 000$).

FIGS. 17, 18. — Plasma membrane of *A. bracteata* fixed in the presence of saturated KCl (Fix. ABE). The invaginations and elevations are very pronounced. (Fig. 17 : $\times 52\ 250$; Fig. 18 : $\times 46\ 930$).

FIG. 19. — Detail of Fig. 18 showing the substructure at the bottom of invaginations ($\times 137\ 000$).

probably artifacts because photomicrographs of frozen-fractured *N. apis* spores published by LIU (1975), show that the spore plasma membrane in this species is able to form depressions and elevations like other microsporidia.

DISCUSSION

The sporophorous vesicle.

There is some ambiguity in the use of the terms "sporophorous vesicle", "pansporoblast" and "sporocyst". In this paper we use "sporophorous vesicle" in the sense of CANNING and HAZARD (1982) as a synonym for an older and still widely used term "pansporoblast". As explained in VAVRA and SPRAGUE (1976), the name "pansporoblast", was used in microsporidia originally for designation of the cell or cells contained within the "pansporoblastic membrane". This membrane alone was then named "sporophorous vesicle" or "sporocyst". CANNING and HAZARD (1982), however, have recommended that the term pansporoblast should be restricted for use in myxosporidia and that the term "sporophorous vesicle", be used in microsporidia (for the whole formation, i.e. its envelope plus internal contents) as replacement for "pansporoblast". Recently, HAZARD and FEDERICI (1985), proposed to replace the "sporophorous vesicle" with its synonym, the "sporocyst". We do not use the last term here, because in parasitology the "sporocyst", has frequently the meaning of a resistant cover about a parasite and has a special meaning in helminthology. We feel that it would be misleading to call "sporocyst" the thin and little resistant spore containing sacs of *Amblyospora* spp. and *Tuzetia* sp.

The sporophorous vesicle membrane

Our observations have to be compared with those of LIU *et al.*, 1971. These authors observed the same structure of the SVM in cross-fracture as we did. They published one photomicrograph showing the "en face" view of the outer surface of the pansporoblast membrane". In this photograph the SVM has the same granular structure as the fine granular type of secretion (SE₁) found in the interior of the sporophorous vesicle. This type of secretion occurs sometimes very close to the SVM (Fig. 5) and has the structure resembling the SVM in cross-fracture. We believe that LIU *et al.*, 1971 misidentified the secretion with the SVM and that the first true photomicrographs of the SVM fractured along its surface are those shown in the present paper.

A question concerning the nature of the SVM has to be discussed on the basis of our observations. It has been speculated that: 1) the SVM is the original plasma membrane of the sporont and that consequently a new plasma membrane should be neofomed around the sporont cell enclosed in the SVM (SZOLLOSI, 1971; VAVRA and SPRAGUE, 1976), or 2) that the SVM is a plasma

membrane neofomed on the surface of the original sporont plasmalemma (VAVRA, 1965, 1976), or 3) that the SVM is a secretion product of the sporont cell arranged in a membrane-like fashion (CANNING and HAZARD, 1982; VAVRA *et al.*, 1982).

Three facts corroborate in our opinion the last mentioned supposition. First the SVM is much more resistant to cleavage than the usual cytoplasmic membranes. This is documented by the fact that despite the very abundant presence of the SVMs in our material we found the fractures showing the SVM surface only very rarely. Second, the structure of the SVM in transverse fractures is not similar to cytoplasmic membranes being much more loose and discontinuous. Third, the corrugated surface of the SVM, the paucity of particles resembling the intramembranous particles and the presence of other much smaller and ill-defined granules differentiate the SVM from typical plasma membrane.

The fact that the SVM does occasionally cleave during freeze-fracturing and that its faces do show some granules similar to normal intramembranous particles are not "per se" an argument against our above mentioned supposition. Even "synthetic" membranes can imitate true cytomembranes during freeze-fracturing. The occurrence of the intramembranous-like particles could be explained by the transport function which the SV as growth chamber for the spores must perform.

The contents of the sporophorous vesicle

LIU *et al.*, 1971, found that the interior of the SV is filled by uniformly granular material mingled with vesicles having a fingerprint-like internal structure. Our observations are different in this respect, probably because we observed fixed material. The structures which we observe inside the SV more closely resemble those seen in ultrathin sections.

The spore wall.

Our observations are similar to those of LIU and DAVIES (1973a) and LIU (1975) who found that 8-9 nm microfibrils-probably chitinous in nature-are the main component of the wall. These authors, however, failed to distinguish the two sublayers of the wall. In our observations, the exospore and the endospore can be recognized in all species, except *Tuzetia* sp. but with different degree of clarity. We have no explanation for the homogenous, structureless appearance of the endospore in *N. apis*, which is so different from the fibrillo-granular appearance of the same layer in other species. Perhaps the age of the spore and the degree of the development of its wall at the moment of fixation is of importance. This seems to explain why we did not observe in freeze-fracture the endospore layer in *Tuzetia* sp. in which it is formed as the last event in spore maturation.

The plasma membrane of the spore

Our observations agree with those of LIU and DAVIES (1973a) who found that the P face of the spore plasma membrane has more intramembranous particles than the E face and that the absolute number of particles is inversely related to the age of the spore. In the present opinion most intramembranous particles are considered to be proteins with transport function. Thus the diminishing quantity of particles during spore maturation corresponds to the expected diminution of the involvement of the plasma membrane in transport functions during spore ageing.

The elevations on the P face and the depressions on the E face of the plasma membrane were already observed by LIU and DAVIES (1973a) and LIU (1975). These authors observed them in frozen-etched unfixed spores and for this reason considered them to be normal structural elements of the plasma membrane. The function of holdfasts, preventing the cytoplasmic contents of the spore from spinning around during polar filament unwinding and extrusion, was suggested for these structures by the above mentioned authors. Synthetic or transport activities for these structures were postulated by LIU (1975). Our observations indicate that the elevations and depressions are not normal structural elements of the plasma membrane but rather a special phenomenon, related probably to the osmolarity of the fixative. However, we believe that this reflects some special quality of the plasma membrane in the microsporidian spore. LIU and DAVIES (1973a) and LIU (1975) were apparently able to observe these configurations because they worked with unfixed spores soaked prior to freezing in 20-30 % glycerol.

The elevations and depressions on the microsporidian plasma membrane closely resemble plasma membrane invaginations described in yeasts, which are, however, normal structural elements of the plasma membrane in these organisms (MOOR and MÜHLETHALER, 1963; STREIBLOVA, 1968). In yeast the P face bears furrows of different length and configuration while the P face has corresponding ridges. The configuration of the plasma membrane invaginations in yeast depends on the physiological state of the cell (TAKEO, 1984), but their exact function is not known. In contrast to microsporidia, the ridges on the E face are covered with a number of intramembranous particles while the furrows on the P face have no particles (NEČAS *et al.*, 1981).

The explanation of the presence of plasma membrane invaginations in microsporidian spores is difficult. By analogy with yeast one might be tempted to think that their existence is related to the existence of the rigid cell wall lined with elastic plasma membrane. It could be supposed, that different shrinkage rates of both these elements during fixation, or during impregnation with glycerol, would lead to the folding of the plasma membrane. This explanation is probably an oversimplification. Investigations in yeast showed that the occurrence of plasma membrane invaginations is not directly related to the presence of the wall because these formations occur also in yeast protoplasts. Moreover, experiments with

yeast have shown that the plasma membrane invaginations are rigid structures capable of migration in the fluid domain of the membrane (NEČAS *et al.*, 1981).

Further research is needed in order to elucidate the significance and the mechanism of occurrence of plasma membrane invaginations and elevations in microsporidia. Certainly they do not represent simple folds of the plasma membrane as is documented by their structural uniformity, regular distribution over the surface of the membrane and the absence of intramembranous particles on these formations. It should be also noted that the control ultrathin preparations of *A. bracteata* and *A. varians* fixed in the presence of KCl (ABG and AVG) do not show any damage to the spore structure due to osmotic shrinkage. The last point which should be discussed in connection with the plasma membrane of the spore is the observation of LIU (1975) that this membrane is in *N. apis* doubled. According to this author the doubling has some significance for the presumed enzymatic function of the plasma membrane in oxidative metabolism. We believe that the second, inner membrane of LIU (1975) actually belongs to the polar filament and will later enshroud its coils. We will discuss this question further in our next paper.

REFERENCES

- CANNING E.U. and HAZARD E.I. (1982). — Genus *Pleistophora* Gurley, 1983 : an assemblage of at least three genera. *J. Protozool.*, **29**, 39-49.
- HAZARD E.I. and FEDERICI B.A. (1985). — Ultrastructure and description of a new species of *Telomyxa* (Microsporida: Telomyxidae) from the semiaquatic beetle *Ora texana* Champ. (Coleoptera: Helodidae). *J. Protozool.*, **32**, 189-194.
- HAZARD E.I. and OLDACRE S.W. (1975). — Revision of Microsporida (Protozoa) close to *Thelohania*, with descriptions of one new family, eight new genera, and thirteen new species. USDA, ARS Technical Bulletin No. 1530, 104 p.
- LIU T.P. (1973). — The fine structure of the frozen-etched spore of *Nosema apis* Zander. *Tissue and Cell*, **5**, 315-322.
- LIU T.P. (1975). — Ultrastructural analysis of the freeze-etched spore envelope of the microsporidian, *Nosema apis* Zander. *Tissue and Cell*, **7**, 613-618.
- LIU T.P. and DAVIES D.M. (1972 a). — Organization of frozen-etched *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913) (Microsporida, Nosematidae) emphasizing the fine structure of the posterior vacuole. *Parasitology*, **64**, 341-345.
- LIU T.P. and DAVIES D.M. (1972 b). — Fine structure of frozen-etched spores of *Thelohania bracteata* emphasizing the formation of the polaroplast. *Tissue and Cell*, **4**, 1-10.

- LIU T.P. and DAVIES D.M. (1972 c). — Fine structure of developing spores of *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913) (Microsporida, Nosematidae) emphasizing polar filament formation. *J. Protozool.*, **19**, 461-469.
- LIU T.P. and DAVIES D.M. (1973 a). — Ultrastructural architecture and organization of the spore envelope during development in *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913) after freeze-etching. *J. Protozool.*, **20**, 622-630.
- LIU T.P. and DAVIES D.M. (1973 b). — Ultrastructure of the frozen-etched polar filament in a microsporidian *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913). *Canad. J. Zool.*, **51**, 217-219.
- LIU T.P. and LIU H.J. (1974). — Evaluation of some morphological characteristics of spores of two species of Microsporida by scanning electron microscope and freeze-etching techniques. *J. Morphol.*, **143**, 337-347.
- LIU T.P., DARLEY J.J. and DAVIES D.M. (1971). — Preliminary observation on the fine structure of the pansporoblast of *Thelohania bracteata* (Strickland' 1913) (Microsporida, Nosematidae) as revealed by freeze-etching electron microscopy. *J. Protozool.*, **18**, 592-596.
- MAURAND J. and LOUBÈS C. (1978). — Les microsporidies des larves de Simulies : données ultrastructurales. *Z. Parasitenkd.*, **56**, 131-146.
- MOOR H. and MÜHLETHALER K. (1963). — Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell Biol.*, **17**, 609-628.
- NĚCÁS O., SVOBODA A. and PIVNIČKOVÁ E. (1981). — Plasma membrane particles in yeast protoplasts. *Acta Histochemica, Suppl.*, **23**, 151-155.
- PORCHET E. and TORPIER G. (1977). — Etude du germe infectieux de *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii* par la technique du cryodécapage. *Z. Parasitenk.*, **54**, 101-124.
- STREIBLOVA E. (1968). — The surface structure of yeast protoplasts. *J. Bacteriol.*, **95**, 700-707.
- SZOLLOSI D. (1971). — Development of *Pleistophora* sp. (Microsporidian) in eggs of the polychaete *Armandia brevis*. *J. Invert. Pathol.*, **18**, 1-15.
- TAKEO K. (1984). — Lack of invagination of the plasma membrane during budding and cell division of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **22**, 97-100.
- VÁVRA J. (1965). — Etude au microscope électronique de la morphologie et du développement de quelques microsporidies. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **261**, 3467-3470.
- VÁVRA J. (1976). — The structure of microsporidia. In : Bulla, L.A. Jr and Cheng T.C., Eds. Comparative Pathobiology, Vol. 1., Biology of the microsporidia. Plenum Press, N.Y. and London, pp. 1-86.
- VÁVRA J., TORPIER G. and PORCHET E. (1982). — The structure of microsporidian spores as revealed by freeze-fracture technique (FFT). *J. Protozool.*, **29**, 509 (abstract).
- VÁVRA J. and SPRAGUE V. (1976). — Glossary for the microsporidia. In : L.A. BULLA Jr. and T.C. CHENG, Eds. Comparative Pathobiology, Vol. 1. Biology of the microsporidia. Plenum Press, N.Y. and London, pp. 341-363.
- VÁVRA J. and UNDEEN A.H. (1981). — Microsporidia (Protozoa : Microsporida) from Newfoundland black-flies. *Can. J. Zool.*, **59**, 1431-1446.

CHAPITRE VI

DISCUSSION

La discussion concernant *Nosemoides vivieri* ayant déjà été faite au niveau des articles publiés, celle qui va suivre concernera principalement *Nosema apis* et sera surtout axée sur les travaux parus depuis la synthèse de VAVRA (1976).

Dans l'ensemble, les aspects ultrastructuraux étudiés chez *Nosema apis* sont comparables avec les études précédentes effectuées sur d'autres microsporidies du genre *Nosema* telles *Nosema algerae* (VAVRA et UNDEEN 1970, CANNING et SINDEN 1973, AVERY et ANTHONY 1983), *Nosema whitei* (MILNER 1972), *Nosema eurytremae* (COLLEY et Coll., 1975), *Nosema transitellae* (KELLEN et Coll., 1977), *Nosema biissi* (LIU et MACEWEN 1977), *Nosema lymantriae* (SAFTOIU et Coll., 1978), *Nosema tractabile* (LARSSON 1981), *Nosema hylobii* (PURRINI 1981), *Nosema sp* M11 et M12, *Nosema bombycis* (SATO et Coll., 1982), *Nosema calcarati* (PURRINI et HALPERIN 1982), *Nosema ptinidorum* (PURRINI 1983), *Nosema lepocreadii* (CANNING et Coll., 1983), *Nosema rivulogammari* (LARSSON 1983), *Nosema apicalis* (MADDOX et WEBB 1983), *Nosema manierae* (TOGUEBAYE et BOUIX 1983), *Nosema helminthorum* (CANNING et GUNN 1984), *Nosema couilloudi*, *Nosema henosepilachnae* (TOGUEBAYE et MARCHAND 1984), *Nosema varivestis* et *Nosema epilachnae* (BROOKS et Coll., 1985), *Nosema ceratomyxae* (DIAMANT et PAPERNA 1985), *Nosema birgii* (TOGUEBAYE et MARCHAND 1986), *Nosema cuneatum* (STREETT et HENRY 1987), *Nosema galerucellae* (TOGUEBAYE et BOUIX 1989), *Nosema nisotrae* (TOGUEBAYE et MARCHAND 1989).

1) Le cycle

Il ne nous a pas été possible, chez *Nosema apis*, de déterminer le nombre de générations mérogoniques. Cependant GRAY et Coll. (1969) ont établi, en microscopie photonique, qu'il existait généralement deux générations mérogoniques : le méronte issu de la transformation du sporoplasme se divise une première fois pour former les mérontes de

première génération qui, se divisant une deuxième fois, donneront les mérontes de deuxième génération, ceux-ci évoluant directement en sporontes. Parfois les mérontes de première génération peuvent également évoluer directement en sporontes. YOUSSEF et HAMMOND (1971) montrent, en microscopie électronique, que structurellement les différences entre les deux générations de mérontes sont minimales et ne concernent que la distribution et le développement quantitatif du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Ces auteurs pensent qu'il pourrait également y avoir des petites variations structurelles saisonnières. Ces petites différences se situeraient principalement au niveau des sporontes : chez les sporontes d'abeilles d'été, ces auteurs ont mis en évidence des phénomènes d'endocytose qui n'ont pas été retrouvés chez les sporontes d'abeilles d'hiver qui, par contre, présentent un système complexe de tubules ramifiés apparemment formés par des expansions de la paroi du sporonte. D'autre part, les sporontes d'abeilles d'hiver peuvent entrer en division tandis que ceux d'abeilles d'été ne le font pas. STECHE (1965) avait également observé, chez *Nosema apis*, que la succession des stades en été différait de celle en hiver.

En ce qui concerne nos propres observations, toutes les abeilles parasitées étudiées étant des abeilles de printemps, il semblerait que nous ayons des formes intermédiaires : en effet les sporontes observés peuvent entrer en division (figs. 42, 43, 45, 48, 49) et leur paroi peut former des expansions tubulaires (figs. 133, 134, 135) (sporonte d'hiver ?), mais présentent également des figures rappelant des phénomènes d'endocytose (fig. 131) (sporonte d'été ?).

Jusqu'à présent, aucun phénomène de sexualité n'a été mis en évidence dans le cycle de ces deux organismes. En effet nous n'avons jamais observé, au début de la phase sporogonique, de structures synaptonématiques dans le noyau indiquant la présence d'une méiose et donc d'une sexualité (LOUBES et Coll., 1976). Ces complexes synaptonématiques ont été observés chez plusieurs espèces de microsporidies (LOUBES 1976, 1979), la méiose se

déroulant au stade du jeune sporonte et la caryogamie devant alors survenir pendant la phase végétative. HAZARD et Coll. (1985) ont décrit la formation de gamètes, puis leur fusion chez trois espèces de microsporidies. De même chez *Amblyospora culicis*, TOGUEBAYE et MARCHAND (1986) confirment l'existence, dans les jeunes sporontes, d'une méiose aboutissant à la formation de spores haploïdes, et l'existence d'une fusion cytoplasmique puis nucléaire entre deux cellules uninucléées, assimilées à des gamètes, intervenant avant la mérogonie. D'après ces auteurs, ces gamètes seraient vraisemblablement des sporoplasmes issus directement des spores. BECNEL, HAZARD et FUKUDA (1986) observent également une méiose chez *Pilospora chapmani*. Puis BECNEL et Coll. (1987) décrivent, chez *Culicospora magna*, un cycle complexe avec formation de gamètes suivie d'une plasmogamie avec accolement des deux noyaux en un diplocaryon, et différenciation de deux types de spores, uninucléées (haploïdes) et binucléées (diploïdes). BECNEL et Coll. (1989) observent la même formation de gamètes ainsi qu'une plasmogamie chez *Edhazardia culicis*.

2) Les mérontes

a) Structure générale

Les mérontes sont de simples cellules plus ou moins sphériques, limités par la seule membrane plasmique, contenant un diplocaryon et dont la principale caractéristique paraît être une relative pauvreté (qualitativement) en organites cytoplasmiques : du reticulum endoplasmique parfois dilaté en vésicules, des ribosomes libres et un appareil de Golgi sous forme de petites vésicules golgiennes, mais absence totale de mitochondries et de grains de réserves. Ces observations sont en accord avec le schéma général de la structure des mérontes donné par VAVRA (1976) et avec l'étude de YOUSSEF et HAMMOND (1971) chez *Nosema apis*, mais aussi avec les travaux effectués sur d'autres *Nosema* (voir les auteurs cités en début de discussion) et sur d'autres genres tels que *Pleistophora* (LOM et CORLISS 1967, CANNING et NICHOLAS 1980), *Caudospora* (VAVRA 1968), *Metchnikovella* (VIVIER et SCHREVEL 1973),

Inodosporus spraguei (OVERSTREET et WEIDNER 1974), *Unikaryon* (CANNING et NICHOLAS 1974, CANNING et Coll. 1983, TOGUEBAYE et MARCHAND 1983, 1984, TOGUEBAYE 1986, AZEVEDO et CANNING 1987), *Gurleya* (LOUBES et MAURAND 1976), *Stempellia* (DESPORTES 1976), *Nosemoides* (LOUBES et AKBARIEH 1977, SAKITI et BOUIX 1987), *Ormieresia* (VIVARES et Coll. 1977), *Perezia* (ORMIERES et Coll 1977, LANGE 1987), *Ameson* (LOUBES et Coll. 1977, VIVARES et SPRAGUE 1979), *Baculea* (LOUBES et AKBARIEH 1978), *Amphiamblys* (DESPORTES et THEODORIDES 1979), *Spraguea* (LOUBES et Coll. 1979), *Glugea* (BERREBI 1979, CANNING et Coll. 1982), *Vairimorpha* (MALONE et CANNING 1982), *Pleistophora*, *Vavraia*, *Polydispyrenia* (CANNING et HAZARD 1982), *Trichoduboscqia* (BATSON 1982), *Hirsutusporos* (BATSON 1983), *Amblyospora* (ANDREADIS 1983, TOGUEBAYE et MARCHAND 1985), *Thelohania* (LARSSON 1983, 1986), *Norlevinea* (VAVRA 1984), *Chapmanium* (LARSSON 1984), *Microsporidium* (MALONE 1985, LOUBES et Coll. 1988), *Loma* (LOUBES et Coll. 1984, BEKHTI et BOUIX 1985), *Telomyxa* (HAZARD et FEDERICI 1985), *Pyrotheca* (XIE et CANNING 1986), *Abelspora* (AZEVEDO 1987), *Cougourdella* (LARSSON 1989), pour ne citer que les principaux.

L'appareil de Golgi, considéré comme très primitif (VAVRA 1976, VIVIER 1979) et mis en évidence pour la première fois chez les microsporidies par VAVRA (1965), est présent dans le cytoplasme de divers stades de développement principalement les mérontes, sporontes et sporoblastes (VAVRA 1976). Il semble par contre absent du cytoplasme des sporoplasmes fraîchement "déchargés" (ISHIHARA 1968, WEIDNER 1972, WEIDNER et TRAGER 1973, WEIDNER et Coll. 1984, SCARBOROUGH-BULL et WEIDNER 1985), et des spores (VAVRA 1976). Chez les mérontes, ce Golgi est matérialisé par un ou plusieurs amas de petites vésicules plus ou moins noyées dans une matrice homogène plus dense que le cytoplasme environnant (YOUSSEF et HAMMOND 1971, VAVRA 1976). Ces amas peuvent être soit adjacents au noyau et les vésicules paraissent être en contact avec la membrane externe de l'enveloppe

nucléaire, soit épars dans le cytoplasme et elles sont alors en relation avec le réticulum endoplasmique. A ce stade il semble donc que la membrane nucléaire externe, les vésicules golgiennes et le réticulum endoplasmique forment un système plus ou moins continu. L'origine de ces vésicules golgiennes pourrait donc être double comme chez *Nosemoides vivieri* : enveloppe nucléaire (une origine semblable du Golgi a été observée chez divers Sporozoaires par VIVIER et PETITPREZ 1972, VIVIER et Coll., 1972, mais aussi dans les cellules embryonnaires de sauterelle par KESSEL 1971), et réticulum endoplasmique (YOUSSEF et HAMMOND 1971). Ce Golgi deviendra de plus en plus important au fur et à mesure de l'avancée dans le cycle pour atteindre son maximum de développement chez les sporoblastes.

b) Le diplocaryon

L'appareil nucléaire, chez *Nosema apis*, est toujours constitué de deux noyaux associés en un diplocaryon. Ces deux noyaux, de structure identique, se comportent de façon parfaitement synchrone durant tout le cycle de développement. Chacun d'eux possède sa propre enveloppe et est aplati au niveau de la zone d'accolement. Ces enveloppes nucléaires sont percées de nombreux pores nucléaires excepté, semble-t-il, au niveau de l'aire de contact (YOUSSEF et HAMMOND 1971) comme cela a également été observé chez d'autres microsporidies à diplocaryon (VAVRA 1976), ceci ne signifiant pas obligatoirement qu'il n'en existe pas. En effet, dernièrement DARWISH et Coll. (1989), ont observé au niveau de cette zone de contact, chez *Vairimorpha necatrix*, des pores nucléaires disposés face à face, suggérant l'existence d'un système de canaux "internucléaires" au niveau de ces pores, et donc d'un échange d'informations entre les deux noyaux. Ceci concorde avec nos observations en cryofracture où nous avons constaté que les particules intramembranaires étaient plus denses au niveau de la zone d'accolement que sur le reste des hémimembranes nucléaires, ce qui laisse également supposer une activité plus intense à cet endroit et probablement des échanges permettant, pour le moins, un parfait synchronisme dans le comportement de ces deux noyaux. Nous n'avons

jamais observé de fusion des membranes nucléaires au niveau de la zone d'accolement, comme le décrivent YOUSSEF et HAMMOND (1971), mais peut-être le grandissement utilisé par ces auteurs n'était-il pas suffisant pour obtenir une bonne résolution de ces membranes. En cryofracture nos résultats confirment ceux de LIU (1972) chez *Thelohania bracteata*, à savoir que chacune des deux hémimembranes des deux membranes de l'enveloppe nucléaire porte des PIM, celles-ci étant toujours plus nombreuses sur les faces P que sur les faces E, et aucun pore nucléaire n'a été observé au niveau de la zone de contact entre les deux noyaux du diplocaryon. Ailleurs sur l'enveloppe nucléaire, LIU (1972) décrit des pores constitués d'un granule central entouré d'un complexe de huit sous-unités à symétrie radiaire, comme cela avait été démontré chez *Tetrahymena pyriformis* par SPETH et WUNDERLICH (1970) et d'une façon plus générale, par MAUL (1971). LIU (1972) pense que la densité de ces pores, liée à l'intensité des échanges nucléocytoplasmiques, varie au cours des différents stades du cycle, pour atteindre son maximum au stade sporoblaste, stade pendant lequel s'effectue toute la genèse des différentes structures de la future spore.

c) La caryocinèse

La division nucléaire, chez les mérontes et les sporontes de *Nosema apis* et *Nosemoides vivieri*, est une cryptomitose à formations polaires extranucléaires, telle qu'elle a été définie par HOLLANDE (1972) et reconnue chez les Microsporidies (VIVIER 1973, VIVIER et VICKERMAN 1974). Le déroulement de cette cryptomitose a été parfaitement mis en évidence chez *Stempellia mutabilis* (DESPORTES 1976). Ce type de division est caractérisé par la présence constante de l'enveloppe nucléaire et par l'absence de centriole. Le fuseau mitotique est intranucléaire et les microtubules fusoriaux divergent à partir de deux formations polaires, les plaques fusoriales (VAVRA 1976) par analogie avec ce qui se passe chez les levures (MOENS et RAPPORT 1971), ou plaques polaires (DESPORTES 1976), placées sur l'enveloppe nucléaire au niveau d'une dépression. Dans ces formations polaires de structure complexe et considérées

comme des centres cinétiques (VAVRA et UNDEEN 1970, SPRAGUE et VERNICK 1971), il est possible de distinguer plusieurs couches sombres très contrastées, surmontées de plusieurs vésicules polaires. DESPORTES (1976) décrit ces centres cinétiques comme étant constitués de deux lames bimembranaires, alors que LOUBES et Coll. (1976) chez *Glugea habrodesmi* observent un centre cinétique formé par l'empilement de trois doubles membranes ou vésicules aplaties. CANNING et Coll. (1982) parlent de deux disques sombres, mais ce nombre peut varier d'une espèce à l'autre : un chez *Gurleya chironomi*, *Tuzetia debaisieuxi* (LOUBES et MAURAND 1975, 1976), *Trichoduboscqia epeori* (BATSON 1982), *Nosema henosepilachnae* (TOGUEBAYE et MARCHAND 1984), *Unikaryon legeri* (AZEVEDO et CANNING 1987), *Nosema nisotrae* (TOGUEBAYE et MARCHAND 1989), deux chez *Glugea atherinae* (BERREBI 1979), *Ormieresia carcini* (VIVARES et Coll. 1977), trois chez *Pleistophora typicalis* (CANNING et NICHOLAS 1980), quatre chez *Loma sp.* (MORRISON et SPRAGUE 1981) et un nombre variable chez *Hirsutusporos austrosimulii* (BATSON 1983). Il peut également y avoir de légères variations interspécifiques quant à la position de ces disques sombres, la plus courante étant celle où ils surmontent l'enveloppe nucléaire (DESSPORTES 1976, LOUBES et Coll. 1976, BERREBI 1979, CANNING et Coll. 1982, BATSON 1983). Cependant chez *Nosema apis* il semble que les deux disques sombres soient formés par des épaissements des deux membranes nucléaires, comme chez *Nosema cuneatum* (STREETT et HENRY 1987), avec à cet endroit un rétrécissement de l'espace périnucléaire (YOUSSEF et HAMMOND 1971). De même VIVIER et SCHREVEL (1973) remarquent chez *Metchnikovella hovassei*, un accroissement de l'opacité des membranes au niveau de la dépression de l'enveloppe nucléaire. Chez *Tuzetia debaisieuxi* (LOUBES et MAURAND 1976), un seul disque sombre surmonte un épaissement de l'enveloppe nucléaire tandis que chez *Ormieresia carcini* (VIVARES et Coll. 1977) le centre cinétique comprend un disque sombre supérieur et un disque inférieur intercalé entre les deux membranes de l'enveloppe nucléaire. Une formation polaire un peu particulière, en forme de cylindre, a été

observée chez *Amphiamblys laubieri* (DESPORTES et THEODORIDES 1979). Chez *Orthothelohania sp.*, CODREANU-BALCESCU et Coll. (1975) signalent une plaque fusoriale en forme de rosette régulière renfermant deux ou trois rondelles axiales entourées de plusieurs couples de rondelles périphériques foncées. Les plaques fusoriales se trouvent toujours enrobées dans une sorte de matériel dense amorphe, situé de part et d'autre de l'enveloppe et sur lequel, sous la membrane nucléaire interne, prend racine le fuseau mitotique. Selon DESPORTES (1976) des microtubules se différencient à partir de ce matériel, de part et d'autre des plaques fusoriales, les microtubules sus-jacents se résorbant lors de la différenciation du fuseau mitotique. Nous n'avons pas observé ces derniers microtubules sus-jacents chez *Nosema apis*. CANNING et Coll. (1982) décrivent également, chez *Glugea anomala* des fibres extranucléaires denses traversant les disques sombres et reliant l'amas de vésicules polaires à l'enveloppe nucléaire.

La présence de ces vésicules polaires surmontant les plaques fusoriales, constitue une autre des particularités de la caryocinèse microsporidienne. VIVIER (1965), WEIDER (1970), YOUSSEF et HAMMOND (1971), VIVIER et SCHREVEL (1973), DESPORTES (1976), LOUBES et MAURAND (1976, 1981), LOUBES et AKBARIEH (1978), BERREBI (1979), CANNING et Coll. (1982), BATSON (1982, 1983), TOGUEBAYE et MARCHAND (1984), LARSSON (1986) les ont également observées. STREETT et HENRY (1987), chez *Nosema cuneatum* parlent de "corps polaires" ressemblant à des anneaux membraneux à centre clair. Cependant ces vésicules ne semblent pas toujours présentes : en effet, elles n'ont pas été mises en évidence chez certaines espèces telles que *Nosemoides vivieri*, *Gurleya chironomi* et *Tuzetia debaisieuxi* (LOUBES et MAURAND 1975, 1976), *Ormieresia carcini* (VIVARES et Coll. 1977), *Nosema henosepilachnae* (TOGUEBAYE et MARCHAND 1984), *Unikaryon legeri* (AZEVEDO et CANNING 1987). Ces vésicules dont l'origine est inconnue, sont généralement limitées par une simple membrane comme chez *Nosema apis* (YOUSSEF et HAMMOND 1971),

Metchnikovella hovassei (VIVIER 1965, VIVIER et SCHREVEL 1973), *Metchnikovella wohlfarthi* (HILDEBRAND 1974), *Stempellia mutabilis* (DESPORTES 1976), *Glugea habrodesmi* (LOUBES et Coll. 1976), *Glugea atherinae* (BERREBI 1979), *Glugea truttae* (LOUBES et Coll. 1981), *Episetum inversum* et *Thelohenia corethrae* (LARSSON 1986). Cependant elles peuvent parfois être limitées par une double membrane comme chez *Glugea anomala* (CANNING et Coll. 1982), *Trichoduboscqia epeori* (BATSON 1982), *Hirsutusporos austrosimulii* (BATSON 1983). Ceci laisse donc supposer une origine variable de ces vésicules. VIVIER (1965), VIVIER et SCHREVEL (1973) chez *Metchnikovella hovassei* parlent, au niveau du centre cinétique, d'un ensemble de vésicules simulant une sorte de dictyosome et montrant une polarité nette caractérisée par l'augmentation de taille des vésicules en allant de la zone proximale (au contact de l'enveloppe nucléaire) vers la zone distale. Chez *Nosema apis* nous avons remarqué qu'il existait souvent, à proximité de ces vésicules, des lames ergastoplasmiques. Chez *Trichoduboscqia epeori*, BATSON (1982) pense que ces vésicules seraient dues aux circonvolutions d'une double membrane englobant du matériel homogène moyennement dense, mais il ne précise pas si celle-ci correspond à l'enveloppe nucléaire ou non.

3) Les sporontes

En début de sporulation, les sporontes, de forme plus ou moins ovoïde, sont limités par une membrane plasmique épaissie, en certains endroits, par un dépôt de matériel dense qui forme à la surface du parasite des sortes de plaques irrégulièrement espacées. Ce dépôt, d'abord discontinu, finira par recouvrir la totalité de la surface externe de la membrane plasmique et sera à l'origine de l'exospore. La structure fine des jeunes sporontes, hormis la membrane limitante, est semblable à celle des mérontes. Cependant l'épaississement de la membrane plasmique ne constitue pas toujours un critère suffisant pour caractériser les sporontes, car chez certaines microsporidies telles que *Perezia lankesteriae* (ORMIERES et

Coll. 1977) des stades mérogoniques peuvent avoir une paroi complexe, et des stades sporogoniques ne peuvent être limités que par la seule membrane plasmique. De même chez *Nosema henosepilachnae* (TOGUEBAYE et MARCHAND 1984) les mérontes sont limités par une membrane plasmique déjà recouverte d'une fine paroi opaque aux électrons. A ce stade sporonte nous n'avons pas encore observé, chez *Nosema apis*, le halo clair situé entre le parasite et le cytoplasme de la cellule-hôte, signalé par VAVRA (1976) et retrouvé chez d'autres espèces comme *Nosema manierae* (TOGUEBAYE et BOUIX 1983) et *Nosema algerae* (AVERY et ANTHONY 1983). Cet espace clair n'apparaîtra que plus tard, autour des sporoblastes.

L'origine de ce matériel dense se déposant sur la membrane plasmique est mal connue. Chez *Nosema cuneatum* STREETT et HENRY (1987) observent autour des mérontes, une assise discontinue portant des ribosomes sur sa surface externe et qui apparaît globulaire en certains endroits, contenant alors des vésicules dont le centre est occupé par du matériel dense. Ces auteurs pensent que celui-ci est déposé sur la surface du plasmalemmes, les petites vésicules paraissant fusionner avec la membrane plasmique du parasite. L'assise discontinue pourrait aussi être constituée par du réticulum endoplasmique de la cellule-hôte qui se dilaterait, en certains endroits, en grandes vésicules bourgeonnant, côté parasite, ces petites vésicules à contenu central dense. Chez *Nosema apis*, nous avons pu voir que les stades mérogoniques étaient encerclés par des vésicules plus ou moins aplaties du réticulum endoplasmique de la cellule-hôte, mais nous n'avons jamais observé de petites vésicules à contenu dense. LOUBES et Coll. (1979) avaient également remarqué, chez *Spraguea lophii*, des vésicules denses aux électrons venant se déposer à l'extérieur de l'enveloppe du plasmode sporogonial en une assise d'abord discontinue, puis en une enveloppe continue autour des sporoblastes. Chez *Nosema henosepilachnae* (TOGUEBAYE et MARCHAND 1984), une importante réaction de la cellule-hôte se traduit parfois par l'apparition, autour du sporonte, de vésicules membranaires contenant des inclusions denses pouvant se trouver en contact direct avec la paroi du sporonte. Toutefois,

la présence de ces vésicules n'étant pas constante, les auteurs pensent que celles-ci ne participent pas directement à la formation de la paroi du sporonte. Chez *Nosema birgii* (TOGUEBAYE et MARCHAND 1986), des granules denses se déposent également contre le plasmalemme du sporonte, puis fusionnent pour former une paroi continue. SAKITI et BOUIX (1987) observent, chez *Nosemoides tilapiae*, des vésicules plus ou moins opaques, issues du cytoplasme de la cellule-hôte, venant se déposer sur la membrane plasmique des plasmodes sporogoniaux pour former une paroi d'aspect ornementé très régulier. Chez *Mrazekia brevicauda* (GOTZ 1981), le matériel dense déposé sur la membrane du sporoblaste proviendrait du cytoplasme-hôte. Ces quelques exemples, pris parmi les microsporidies apansporoblastiques, suggèreraient que le matériel dense qui se dépose sur la membrane plasmique serait d'origine exogène et pourrait constituer, en quelque sorte, une réaction directe ou indirecte de la cellule-hôte vis à vis du parasite. Cependant chez *Nosema lapocreadii*, CANNING et Coll. (1983) observent une sécrétion de matériel dense sur le plasmalemme des sporontes. Chez les microsporidies pansporoblastiques, ce dépôt dense serait par contre d'origine endogène et pourrait provenir de produits de sécrétion du parasite lui-même. En effet DESPORTES (1976) chez *Stempellia mutabilis* parle de l'exsudation de matériel dense de texture granuleuse, entre la membrane dite pansporoblastique et la membrane plasmique du sporonte sur laquelle il se dépose en une couche d'abord discontinue, puis en un revêtement continu, avec interposition entre ce dernier et le plasmalemme d'une fine formation polysaccharidique. Chez *Glugea habrodesmi* (LOUBES et Coll. 1976), *Glugea atherinae* (BERREBI 1979), *Glugea truttae* (LOUBES et Coll. 1981) *Loma dimorpha* (LOUBES et Coll. 1984), la membrane plasmique s'épaissit après la formation de la membrane de la vacuole de sporogonie. Cet épaississement serait dû à un phénomène sécrétoire de la paroi tandis que la membrane pansporoblastique se formerait par une sorte de délamination du plasmalemme du plasmode végétatif. AZEVEDO (1987), chez *Abelspora portucalensis*, signale l'apparition, sur

le plasmalemme des sporontes, d'une couche discontinue de matériel dense et amorphe. Mais des grandes vésicules, de diamètre variable et contenant une matrice de matériel floconneux avec un ou deux granules denses, apparaissent étroitement accolées à la paroi du sporonte, uniquement au niveau des zones où cette paroi est épaissie. Selon l'auteur le matériel dense est déposé sur le plasmalemme entre celui-ci et la membrane de la vésicule, la vacuole sporophorique dérivant de ces vésicules. Ceci semble rappeler ce qui a été observé chez *Nosema cuneatum* (STREETT et HENRY, 1987) chez laquelle il n'y a pas formation de vésicule sporophorique.

Le sporonte de *Norlevinea daphniae* (VAVRA 1984) est caractérisé par la différenciation, autour de la membrane plasmique, d'une deuxième couche membranaire qui se sépare complètement du parasite, pour constituer la membrane de la vésicule sporophorique considérée comme un produit de sécrétion du parasite. Cette membrane proviendrait de vésicules membranaires et de petits granules denses qui apparaissent à la surface de la cellule microsporidienne. Une grande partie du matériel sécrété dans la vésicule sporophorique participera à la formation de la paroi sporale. Chez *Glugea anomala* (CANNING et Coll. 1982), les stades mérogoniques sont déjà recouverts d'un petit dépôt dense qui semble disparaître par la suite, alors que deux membranes accolées sont visibles à la surface du parasite. La plus externe de ces membranes sera à l'origine de la membrane de la vésicule sporophorique : cette membrane se soulève, formant des boursouflures, tandis qu'un nouveau matériel dense est sécrété sur le plasmalemme du plasmode, d'abord d'une façon discontinue uniquement au niveau des boursouflures, puis d'une façon continue lorsque la vésicule est totalement différenciée. Dans cette vésicule sporophorique des sécrétions métaboliques, sous forme d'un réseau granulaire clairsemé, occupent les espaces entre les parasites. Ceci appelle plusieurs questions: la membrane de la vésicule sporophorique semble se former à partir du premier dépôt visible sur les stades végétatifs, mais quelle est l'origine de ce matériel ? Est-il sécrété par le parasite ou bien ne peut-il provenir directement ou indirectement du réticulum endoplasmique qui

entoure les premiers stades de développement? Les auteurs se demandent d'ailleurs s'il s'agit là d'une vraie membrane ou plutôt d'un matériel granulaire structuré à la façon d'une membrane. VAVRA et Coll. (1986) ont montré par la technique de la cryofracture, que la membrane de la vésicule sporophorique chez *Amblyospora bracteata*, *Amblyospora opacita* et *Tuzetia sp.*, n'était effectivement pas une vraie membrane. Une autre question est de savoir si le deuxième dépôt, sur le plasmalemme du plasmode, est de même nature et a la même origine que les sécrétions métaboliques contenues dans la vésicule sporophorique ? Selon BEKHTI et BOUIX (1985), la paroi des sporontes de *Loma salmonae* ne s'épaissit que lorsque la vacuole de sporogonie est différenciée. Ceci semble donc écarter l'hypothèse d'une origine exogène de ce matériel. Chez *Thelohania corethrae* (LARSSON 1986) du matériel dense est sécrété sur la face externe du plasmalemme du jeune sporonte. Puis cette couche s'écarte de la membrane plasmique, en certains endroits d'abord, formant des protubérances remplies de matériel granulaire, et finit par former une grande vésicule sporophorique contenant le plasmode sporogonial dont la paroi s'épaissit alors par un dépôt, sur la membrane plasmique, de matériel dense dont l'origine n'est pas précisée. La vésicule sporophorique, chez cette espèce, ne paraît donc pas limitée par une vraie membrane. De même chez *Amblyospora culicis* (TOGUEBAYE et MARCHAND 1986), en fin de mérogonie, le "présporonte" est limité par une membrane déjà recouverte extérieurement par une fine paroi de matériel dense. La transformation du présporonte en sporonte débute par un décollement, en certaines zones, entre cette paroi et la membrane plasmique. Dans ces zones apparaissent des "granules métaboliques" qui se déposeront contre le plasmalemme du jeune sporonte et finiront par réaliser une nouvelle paroi continue. Après décollement total, la paroi initiale du préposporonte devient l'enveloppe du pansporoblaste. L'origine du matériel constituant cette enveloppe n'est pas précisée. Un phénomène similaire a été décrit chez *Ovavesiculata popilliae* (ANDREADIS et HANULA 1987), et la paroi de la vésicule sporophorique ne ressemble pas du tout à une membrane. Les produits

métaboliques accumulés dans la vésicule pourraient également être à l'origine de la couche de matériel dense superposée à la membrane plasmique des sporoblastes. Par contre, la vacuole parasitaire observée chez *Microsporidium acanthocephali* (LOUBES et Coll. 1988) se constituerait à partir du réticulum endoplasmique du cytoplasme-hôte qui entoure le parasite. Chez *Encephalitozoon cuniculi* (WEIDNER 1975), la vacuole parasitaire se développerait aux dépens de la masse cytoplasmique de la cellule-hôte, et le nombre de parasites présents dans cette vacuole serait fonction de l'importance de son développement, celui-ci étant accompagné de la formation de vésicules de pinocytoses vers l'intérieur de la vacuole.

Tous ces exemples montrent que l'origine de la future exospore n'est pas encore établie avec certitude. Ainsi chez les Microsporidies apansporoblastiques, la paroi du sporonte peut provenir soit d'un phénomène sécrétoire de la cellule-hôte (sorte de réaction parasitaire), soit d'une sécrétion du parasite lui-même. Chez les Microsporidies pansporoblastiques, elle peut également être le résultat, soit d'un phénomène sécrétoire de la cellule microsporidienne, soit d'un dépôt, sur le plasmalemme, de matériel dense issu des produits métaboliques accumulés dans la vésicule sporophorique, le pansporoblaste ou la vacuole parasitaire.

4) Les sporoblastes

Les sporontes de *Nosema apis* se divisent en deux sporoblastes, chacun d'eux évoluant directement en une spore. Au cours de ce stade s'effectuera la sporogénèse ou différenciation sporoblastique qui donnera à la spore sa structure définitive (paroi sporale, filament polaire et annexes, sporoplasme).

a) Le filament polaire

L'origine golgienne du filament polaire, signalée dès 1965 par VAVRA, puis SPRAGUE et VERNICK (1969) et confirmée par des preuves cytochimiques (WALKER et HINSCH

1972; VAVRA 1972; TAKIZAWA et Coll. 1975; DESPORTES 1976) est donc nettement établie ici chez *Nosemoides vivieri* et *Nosema apis*. Si cette origine ne semble plus discutée actuellement, il est possible que d'autres structures telles que le réticulum endoplasmique puissent également intervenir. Les relations étroites entre les vésicules golgiennes et le réticulum endoplasmique d'une part, et la membrane externe de l'enveloppe nucléaire d'autre part, observées chez nos deux microsporidies vont dans ce sens, tout comme les observations de DESPORTES (1976) chez *Stempellia mutabilis*. VERNICK et Coll. (1977) décrivent l'appareil de Golgi des Microsporidies comme un "système complexe de membranes et de produits de sécrétion", pouvant revêtir plusieurs aspects : cisternes, vésicules, vacuoles et granules de sécrétion. C'est pourquoi il peut apparaître, selon les espèces considérées, des petites différences dans les modalités de formation de ce filament polaire, celles-ci ayant été d'ailleurs en grande partie analysées par VAVRA (1976).

L'élaboration du filament polaire débute, chez *Nosema apis* comme chez *Nosemoides vivieri*, par la formation du futur sac polaire à partir d'un amas de vésicules golgiennes anastomosées en un réseau à mailles denses. Ce sac polaire, situé dans le cytoplasme du sporoblaste chez *Nosema apis*, est toujours proche du noyau et dans une dépression de celui-ci chez *Nosemoides vivieri* (comme chez *Nosemoides simocephali*, LOUBES et AKBARIEH 1977), ce qui a suggéré à certains auteurs l'idée que ce sac pouvait représenter du matériel nucléaire transformé (JENSEN et WELLINGS 1972, LOUBES et Coll. 1979, BATSON 1983). Nos observations montrent bien l'origine golgienne du sac polaire et de la totalité du filament polaire qui viendra s'ancrer sur ce sac dont la nature polysaccharidique a été démontrée par VAVRA (1972), TAKIZAWA et Coll. (1975), DESPORTES (1976).

Le filament polaire proprement dit tire également son origine d'un amas de vésicules golgiennes à contenu dense, et qui s'anastomosent pour constituer un réseau dont les mailles, formées de matériel opaque, délimitent des zones claires à texture parfois très

légèrement et finement granulaire. Souvent dans cet amas se trouve une zone où les mailles sont mélangées à des petites vésicules à contenu clair. Le filament polaire se différencie et se dégage à la périphérie de ce réseau. Il est alors constitué de trois zones : un axe central dense situé à l'intérieur d'une zone moyenne claire, elle-même entourée d'une zone dense externe limitée par une membrane. Selon DESPORTES (1976) le contenu opaque, de nature protéique, des vésicules donnera l'axe central et la zone externe dense du filament, alors que la zone moyenne proviendrait de la matrice plus claire du réseau golgien, matrice de texture filamenteuse et de nature probablement polysaccharidique. La formation du filament polaire de *Nosema apis* rappelle celle observée chez *Stempellia mutabilis* (DESPORTES, 1976), bien que la texture filamenteuse de la zone moyenne ne soit pas aussi évidente que chez cette espèce. Il est possible de rencontrer plusieurs axes centraux encore groupés à l'intérieur des zones moyenne et externe communes. Le filament polaire de *Nosema apis* est limité par une membrane de type unitaire et le problème est de connaître l'origine de cette membrane : appareil de Golgi ou réticulum endoplasmique ou autre origine ? DESPORTES (1976) parle d'une enveloppe membranaire constituée à partir soit d'éléments membranaires inclus dans le réseau golgien, soit d'expansions de la membrane cytoplasmique du sporoblaste et du cell-coat sus-jacent. Chez *Nosema apis* il est aussi possible de penser à une origine golgienne, notamment à partir des éléments membranaires des vésicules claires emprisonnées dans les mailles de certaines zones du réseau golgien (figs.65, 66). Certaines figures montrent aussi des longs saccules très aplatis à contenu dense, dilatés à leurs extrémités et montrant des sections de diamètre inférieur à celui du filament, sans axe central mais avec la zone moyenne claire et la zone externe limitée par une membrane (figs 69, 70, 71). L'extrémité de ces saccules peut également donner naissance à des granules denses de diamètre relativement important. Un Golgi de ce type a également été observé chez *Hirsutusporos austrosimulii* (BATSON 1983) et *Amblyospora pinensis* (KETTLE et PIPER 1988). D'après WEIDNER (1970) le filament polaire aurait une

double origine : condensation de matériel dense dans des saccules golgiens et enveloppement de celui-ci par du réticulum endoplasmique. Selon YOUSSEF et HAMMOND (1971), il serait constitué à la fois par le Golgi et l'ergastoplasme. Il faut en effet rappeler que ces deux structures, appareil de Golgi et réticulum endoplasmique, sont souvent étroitement intriquées, la première étant issue de la seconde, et la limite entre les deux n'étant pas toujours très nette.

Un fait intéressant à souligner est la présence, en début de sporogénèse, chez *Nosemoides vivieri* comme chez *Nosema apis* d'une ou plusieurs vacuoles dans le cytoplasme du jeune sporoblaste. La plus grande de ces vacuoles est en relation directe soit avec le sac polaire (*Nosemoides vivieri*), soit avec le filament polaire, à la limite avec le sac polaire, la membrane de cette vacuole étant en continuité avec la membrane du sac et du filament polaires (*Nosema apis*). Elles paraissent se réduire au fur et à mesure que se différencie le filament polaire et a disparu lorsque celui-ci est entièrement élaboré. Cette grande vacuole pourrait provenir de la fusion de vésicules golgiennes avec les vacuoles observées dans le cytoplasme du sporoblaste et dont l'origine semble être le réticulum endoplasmique. Elle correspondrait au "canal cytoplasmique" décrit par VAVRA (1965) chez *Pleistophora debaisieuxi*. Dans ce canal seraient "déversés" les contenus denses des vésicules golgiennes anastomosées, contenus qui pourraient être à l'origine, selon DESPORTES (1976), du matériel protéique constituant l'axe central et la zone dense externe du filament d'une part, et du matériel polysaccharidique de la zone moyenne plus claire d'autre part, le tout encerclé par une membrane dérivant de celle du "canal cytoplasmique". Ceci paraît également en accord avec ce qui a été observé chez *Tuzetia debaisieuxi* (LOUBES et MAURAND 1976), *Nosemoides simocephali* (LOUBES et AKBARIEH 1977), *Glugea atherinae* (BERREBI 1979), *Ameson pulvis* (VIVARES et SPRAGUE 1980), *Glugea truttiae* (LOUBES et Coll. 1981), *Tuzetia boeckella* (MILNER et MAYER 1982), *Nosema manierae* (TOGUEBAYE et BOUIX 1983), *Loma diplodae* (BEKHTI et BOUIX 1985), *Amblyospora culicis* (TOGUEBAYE et MARCHAND 1986). Dans tous ces exemples en effet, les

auteurs parlent d'une grande vacuole, la "vacuole commune du filament polaire" qui apparaît près du complexe golgien, s'allonge, et dans laquelle se différencient les différentes zones du filament polaire, à partir du réseau golgien. Chez d'autres espèces l'origine du filament polaire peut être légèrement différente : ainsi chez *Nosema algerae* (CANNING et SINDEN 1973) le filament se constitue à partir des sécrétions golgiennes et des polyribosomes. Chez *Nosema apis* (YOUSSEF et HAMMOND 1971), l'axe central dense du filament serait issu du réseau golgien tandis que le réticulum endoplasmique serait à l'origine des couches externes. Cette interprétation légèrement différente de la nôtre pourrait être due au fait qu'un certain nombre d'étapes intermédiaires, dans la formation du filament polaire, n'ont pas été observées par ces auteurs. Chez *Nosemoides vivieri* nous avons décrit un filament polaire, en cours d'élaboration, limité par deux membranes, mais il semble, à la lumière des observations faites chez *Nosema apis*, que la membrane la plus interne n'en soit pas une, mais simplement la couche externe dense du filament dont le matériel serait structuré à la façon d'une membrane.

Un mode un peu particulier de différenciation du filament polaire a été observé par DESPORTES et Coll. (1985) chez *Enterocytozoon bieneusi*. En effet, dans un même plasmode sporogonique, les filaments polaires des futurs sporoblastes se différencient simultanément au voisinage des noyaux. Puis lorsque tout l'appareil d'extrusion est formé, les huit sporoblastes s'individualisent, comprenant chacun un noyau et un filament polaire complet avec ses annexes.

Il ressort donc de cette étude que le principal (et primordial) appareil à l'origine du filament polaire est le complexe golgien observé sous ses différents aspects possibles : cisternes, saccules très aplatis, vésicules, granules de sécrétion (VERNICK et Coll., 1977). Il ne faut cependant pas oublier le rôle plus discret du réticulum endoplasmique souvent associé à l'appareil de Golgi. Tous les travaux et toutes les hypothèses possibles concernant l'origine du filament polaire ont d'ailleurs été analysés par VAVRA (1976).

Sur les répliques obtenues par cryofracture on retrouve, au niveau de la structure du filament polaire en cours de différenciation, les trois zones observées sur coupes ultrafines : un axe central (toujours excentré) constitué d'environ une douzaine de particules, une zone moyenne claire avec parfois quelques rares particules, et une zone externe où quelques particules sont visibles et limitée par une membrane dont les deux faces de fracture complémentaires sont mises en évidence. La face FP (face concave) de la membrane porte peu de particules intramembranaires en regard de la face EF (face convexe) où elles sont nombreuses et réparties plus ou moins régulièrement sans dessiner de motif particulier. Ces observations corroborent celles de VAVRA et Coll., (1982). Cependant parmi les espèces étudiées par ces auteurs, seule la membrane du filament polaire de *Tuzetia sp.* porte, sur sa face EF de nombreuses PIM, comme chez *Nosema apis*. Chez les autres espèces, *Amblyospora bracteta*, *A. varians* et *A. opacita*, les deux faces EF et PF de cette membrane ne portent que très peu de PIM. La technique de la cryofracture a été très peu utilisée pour l'étude des microsporidies et seule une série d'articles avait été publiée par LIU (1972, 1973, 1975), LIU et DAVIES (1972, 1973), LIU et LIU (1974) et LIU et Coll. (1971), mais ces travaux ayant été effectués sur du matériel non fixé, la résolution est moins bonne que sur le matériel fixé (VAVRA et Coll., 1986). Chez *Thelohania bracteata* LIU et DAVIES (1972, 1973) observent, dans une zone du cytoplasme du sporoblaste, une concentration en réticulum endoplasmique de type vésiculaire correspondant manifestement à l'amas de vésicules golgiennes à l'origine du filament polaire. Celui-ci est décrit comme enveloppé dans une double membrane, bien que les microphotographies présentées ne paraissent en montrer qu'une seule. Il semble que ces auteurs considèrent comme double membrane les deux faces de fracture EF et PF d'une seule et même membrane. Ces deux faces portent de nombreuses particules intramembranaires plus ou moins disposées suivant un réseau, à la manière des mailles d'un filet. Le coeur du filament présente une structure tubulaire constituée de sous-unités ou "microcylindres" rangés selon une

symétrie radiaire d'ordre douze. Ces "microcylindres" pourraient correspondre aux particules observées au niveau de l'axe central du filament polaire de *Nosema apis*. CANNING et NICHOLAS (1974) ont observé, sur coupes ultrafines, un anneau de dix-huit sous-unités à l'intérieur du filament polaire. A un stade plus avancé (sporoblaste âgé), cet axe central est beaucoup moins visible et les particules paraissent occuper tout le volume du filament limité par la membrane. La structure tubulaire du filament polaire des microsporidies avait déjà été envisagée par KRAMER (1960) et LOM et VAVRA (1963), hypothèse reprise par VAVRA (1976). LIU (1973) décrit, chez *Nosema apis*, un filament polaire limité par une membrane dont la face convexe (= face EF ?) porte moins de particules que la face concave (= face PF?), ce qui paraît être le contraire de nos propres observations chez cette même espèce.

b) Le polaroplaste

Le polaroplaste apparaît en fin de différenciation du filament polaire dans la partie antérieure de la spore, immédiatement sous le sac polaire, et où il pourra occuper jusqu'à un tiers du volume total de la spore (VAVRA 1976). Il est constitué par un empilement serré de lamelles très aplaties et disposées autour de la partie basale du filament polaire. Il prend la forme d'une ombrelle ou d'une sorte de cloche, coiffée par le sac polaire, dont la cavité restreinte est traversée par la partie basale rectiligne du filament. Ces lamelles semblent provenir de cisternes, saccules et vésicules probablement issus du réticulum endoplasmique. Une telle origine du polaroplaste a également été observée chez *Mrazekia brevicauda* (GOTZ, 1981). Sous ce polaroplaste lamellaire se trouve un polaroplaste vésiculaire, très peu développé chez *Nosema apis*, constitué de petites vésicules issues des extrémités légèrement dilatées des lamelles du polaroplaste lamellaire. Cette partie vésiculaire du polaroplaste n'est pratiquement plus visible dans la spore mature. Chez *Nosema couilloudi* et *Nosema nisotrae* (TOGUEBAYE et MARCHAND, 1984, 1989), le polaroplaste apparaît uniquement lamellaire. Le

polaroplaste peut parfois revêtir des aspects assez particuliers. Ainsi chez *Episeptum inversum* (LARSON 1986), la partie antérieure est constituée de lamelles lâches disposées comme les pétales d'une fleur autour du filament polaire, la partie postérieure étant constituée de lamelles plus serrées. Les lamelles postérieures du polaroplaste de *Glugea americanus* (TAKVORIAN et CALI 1986) paraissent en continuité avec des structures tubulaires, figurant le reste des structures golgiennes, attachées au filament polaire. Chez *Culicospora magna* (BECNEL et Coll. 1987) le polaroplaste occupe les deux tiers antérieurs de la spore et est constitué de grandes vésicules séparées par des septa disposés de façon hélicoïdale. Celui de *Duboscqia aediphaga* (KETTLE et PIPER 1988) comprend trois parties : une partie antérieure à lamelles dilatées et une partie postérieure à lamelles étroites et serrées, séparées par une zone intermédiaire vésiculaire. Chez *Edharzia aedis* (BECNEL et Coll., 1989), il est compartimenté en plusieurs grandes chambres de taille uniforme. Selon VAVRA (1976), le polaroplaste peut provenir soit du réticulum endoplasmique, soit de l'appareil de Golgi, soit des deux à la fois. Pour TOGUEBAYE et MARCHAND (1984, 1986), l'élaboration du polaroplaste de *Unikaryon mattei* et *Amblyospora culicis* débute par la formation d'une masse de matériel amorphe opaque aux électrons, dans laquelle se différencieraient des membranes réalisant des saccules parallèles disposés autour du filament.

La cryofracture montre parfaitement bien que les lamelles du polaroplaste lamellaire sont des membranes dont la face de fracture PF porte nettement plus de particules intramembranaires que la face EF. LIU (1973) remarque également, lors de la formation de la spore de *Nosema apis* des lamelles étroitement empilées dont la face concave (= face PF ?) est granulaire, tandis que dans la spore mature (LIU 1973) il observe un polaroplaste lamellaire feuilleté, constitué de lamelles très serrées dont la face convexe (= face EF ?) est granulaire. Les deux faces PF et EF des lamelles seraient donc également granulaires, l'auteur ne précisant toutefois pas s'il existe une différence de densité des PIM entre les deux faces. Chez *Thelohania*

bracteata (LIU et DAVIES, 1972) le polaroplaste apparaît très feuilleté et les surfaces des lamelles empilées sont lisses. Il semblerait que dans ce cas, les surfaces lisses observées représentent les vraies surfaces des membranes et non les faces fracturées.

Le rôle du polaroplaste est encore mal connu et plusieurs hypothèses ont été émises. Selon VAVRA (1976), dans la spore activée, le polaroplaste gonfle et augmente de volume, élevant ainsi la pression intrasporale, ce qui pourrait déclencher le processus d'extrusion du filament polaire. Cependant le devenir des lamelles est très discuté. WEIDNER (1972) pense que le polaroplaste d'*Ameson michaelis* est constitué d'une membrane plissée en accordéon et continue avec la membrane limitante du filament polaire ; cette membrane serait incorporée dans le tube polaire en cours d'extrusion, contribuant à son élongation. Cependant ANDREADIS et HALL (1979), AVERY et ANTHONY (1983) montrent que, pendant l'extrusion du filament polaire, le polaroplaste reste dans la spore. WEIDNER (1976) avait aussi observé que, toujours après l'extrusion du filament, sa propre membrane était restée dans la spore vide, mais il ne parle pas du polaroplaste. Plus tard, WEIDNER et Coll. (1984) puis SCARBOROUGH-BULL et WEIDNER (1985) indiquent que, chez *Glugea hertwigi* et *Spraguea lophii*, la membrane du polaroplaste est expulsée en même temps que le sporoplasme et participe à la formation de la nouvelle membrane de ce dernier, la membrane plasmique de la spore restant à l'intérieur de celle-ci. Chez *Nosema couilloudi*, TOGUEBAYE et MARCHAND (1987) montrent que, dans le cas d'une émergence intracellulaire du sporoplasme, le polaroplaste est expulsé hors de la spore, immédiatement après l'extrusion du filament polaire et avant l'expulsion du sporoplasme qui sortira alors limité par sa propre membrane plasmique. Les restes membranaires retrouvés dans la spore vide, seraient alors constitués par la membrane de la vacuole postérieure et une partie de la membrane plasmique sporale.

c) la paroi

La paroi des sporoblastes est constituée de la membrane plasmique et de la couche externe de matériel dense, apparemment sans sous-structure, déjà observée chez les sporontes. Cette couche sera à l'origine de l'exospore de la future spore.

En cryofracture cette couche apparaît de texture granulo-fibrillaire. LIU (1973) avait simplement signalé que la paroi du sporoblaste de *Nosema apis* montrait une structure comprenant des unités granulaires. Sous cette couche se trouve la membrane plasmique, dont une des caractéristiques intéressantes consiste en l'évolution de la densité des particules intramembranaires au cours de la sporogenèse. En début de différenciation sporoblastique la densité des PIM, sur les deux faces de fracture EF et PF, est élevée et plus importante sur la face EF que sur la face PF. Ces PIM, régulièrement réparties sur la face EF, paraissent vaguement disposées en réseau, à la manière des mailles d'un filet, sur la face PF. Puis en fin de sporogenèse la densité de ces PIM diminue fortement sur les deux faces pour devenir très faible chez les sporoblastes âgés. Toujours chez *Nosema apis*, LIU (1973) ne remarque que des particules fortement agrégées sur la membrane fracturée. Il semble donc que la densité de ces PIM soit liée à l'activité physiologique de la cellule microsporidienne. Pendant la sporogenèse, la différenciation des organites de la future spore est le reflet d'une activité importante qui ralentit nettement une fois celle-ci terminée. Cette activité nécessitant beaucoup d'énergie, LIU (1973) émet l'hypothèse selon laquelle les PIM observées dans la membrane, et sensées représenter des unités enzymatiques (STAEHLIN, 1970), pourraient constituer le support des enzymes participant aux oxydations biologiques. Chez les bactéries où les mitochondries sont également absentes, ces enzymes sont localisées dans la membrane plasmique (CARPENTER, 1967). WEIDNER et TRAGER (1973) montrent le rôle important de l'ATP dans la survie extracellulaire des sporoplasmes de *Nosema michaelis* et pensent que les microsporidies pourraient utiliser une source externe d'ATP, hypothèse étayée par le fait que

ces parasites, dépourvus de mitochondries, ont souvent été observés, pendant leur phase de croissance, entourés de mitochondries du cytoplasme-hôte (YOUSSEF et HAMMOND 1971, DESPORTES 1976). Pendant cette phase de croissance, l'ATP ne pourrait-il pas alors être stocké dans la membrane plasmique, pour être utilisé au fur et à mesure des besoins pendant la sporogenèse ?

5) la spore

La spore constitue l'ultime étape du développement des microsporidies. Elle est le résultat de la sporogenèse qui se termine par la différenciation de la paroi sporale et plus particulièrement de l'endospore. Elle constitue le support du germe infectieux ou sporoplasme avec son système d'infestation (filament polaire) d'une part, et une forme de résistance et de propagation avec sa paroi sporale épaisse protégeant le sporoplasme contre toute attaque extérieure d'autre part. Elle réagira cependant aux stimuli qui déclencheront le processus d'extrusion du filament polaire permettant la pénétration du sporoplasme dans une nouvelle cellule-hôte.

a) Le filament polaire

Dans la spore, le filament polaire est ancré, par son extrémité basale, sur le sac polaire situé au pôle apical. Puis il traverse, en une portion rectiligne, le polaroplaste lamellaire, pour s'enrouler en une double spirale à la périphérie des deux tiers postérieurs de la spore. Ce filament, de type isofilaire, est limité par une membrane enveloppant une structure compacte qui, en coupe transversale, présente plusieurs sous-couches concentriques dont le nombre peut varier suivant les espèces, mais aussi suivant la résolution obtenue sur les préparations. En coupe longitudinale, ces différentes couches paraissent beaucoup moins visibles. La partie basale rectiligne du filament polaire constitue l'équivalent du manubrium des spores des microsporidies à manubrium telles que les *Metchnikovellidae* (VIVIER 1975) :

Metchnikovella hovassei (VIVIER et SCHREVEL 1973), *Metchnikovella wohlfarthi* (HILDEBRAND et VIVIER 1971), *Amphiamblys laubieri* (DESPORTES et THEODORIDES 1979), ou les Mrazekiidae : *Mrazekia lumbriculi* (DE PUYTORAC, 1961, 1962), *Mrazekia brevicauda* (GOTZ 1981). L'enroulement du filament semble se faire au fur et à mesure de sa formation à la périphérie du réseau golgien. Il n'y a donc pas d'enroulement initial de l'axe central du filament à l'intérieur de la vacuole du filament polaire, tel que cela a été signalé chez certaines espèces par BERREBI (1978, 1979), MILNER et MAYER (1982), TOGUEBAYE et MARCHAND (1986). Toutes les études faites au microscope électronique à transmission ont montré que le filament polaire est constitué de plusieurs couches concentriques très bien analysées par VAVRA (1976). D'après cet auteur, il est généralement admis que le filament polaire est une structure complexe dans laquelle se trouvent deux tubes emboîtés l'un dans l'autre. Le tube externe pourrait correspondre à la zone externe du filament observée lors de sa différenciation, et l'axe central au tube interne dont la lumière contient du matériel dense. Le problème, toujours selon VAVRA (1976), est de connaître la structure du tube interne et du matériel présent entre les deux tubes. WEIDNER (1972), dans un premier temps, pense que la matrice du filament est glycoprotéique et que cette substance entoure le filament polaire, après extrusion, en une sorte d'enveloppe. Puis WEIDNER (1976, 1982) montre que le filament polaire, après dévagination (= tube polaire), est composé d'une protéine, la protéine du tube polaire, constituée d'un simple polypeptide de bas poids moléculaire. Cette protéine est également la principale composante du filament polaire à l'intérieur de la spore. Au tout début de l'extrusion, le filament se différencie en un tube polaire, au niveau de son extrémité basale, là où il est amarré sur le sac polaire. La protéine du filament polaire, en s'écoulant hors de la spore, s'assemble en un tube dont la paroi est constituée par une couche protéique. Certains facteurs, comme un changement de pH ou le calcium, peuvent modifier son comportement (WEIDNER 1976, WEIDNER et BYRD 1982). La membrane limitant le filament dans la spore,

qui était considérée comme partie intégrante du tube polaire , reste en fait dans la spore (WEIDNER 1976). Ce tube polaire, qui présente une certaine élasticité pendant le passage du sporoplasme, doit être complètement formé avant que n'y passe le sporoplasme. Ce passage ne pourra s'effectuer que si le milieu environnant est hypoosmotique et s'il présente une certaine consistance (WEIDNER 1976). Selon TOGUEBAYE et MARCHAND (1987), lors de l'extrusion du filament polaire de *Nosema couilloudi* à l'intérieur même d'une cellule-hôte, ce filament ne jouerait qu'un rôle restreint limité à la formation, au pôle apical de la spore, d'une ouverture dans la paroi sporale. En effet le tube polaire, aussitôt constitué, se désagrège rapidement et ne sert donc pas au passage du sporoplasme qui est alors directement libéré dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Cette désagrégation pourrait s'expliquer par le fait que, à l'intérieur de la cellule-hôte, les facteurs du milieu environnant qui influencent la stabilité du tube polaire ne sont pas les mêmes que ceux rencontrés dans un milieu extérieur approprié tel que la lumière intestinale de l'individu-hôte.

En cryofracture nous n'avons jamais pu observer la structure du filament polaire de *Nosema apis* , les fractures effectuées n'affectant que la paroi de la spore.

b) La paroi sporale

La paroi de la spore des microsporidies est formée, selon VAVRA (1976), de trois parties : la membrane plasmique, l'endospore et l'exospore, parfaitement observées chez *Nosemoides vivieri* et *Nosema apis* . Si les deux premières composantes présentent une structure identique à celle décrite par HUGER (1960) et retrouvée chez toutes les autres espèces étudiées jusqu'ici, la structure de la troisième composante ou exospore paraît plus variable.

. La membrane plasmique

Observé sur coupes ultrafines et sur répliques obtenues par cryofracture, le plasmalemmme représente une membrane cellulaire typique. Chez *Nosema apis* , les faces de

fractures portent des particules intramembranaires dont le nombre varierait en fonction de l'âge de la spore. En effet, en fin de sporogenèse, les faces PF et EF de la membrane du sporoblaste portaient très peu de PIM. Puis la densité de celles-ci paraît augmenter considérablement au début de la formation de l'endospore, ce qui traduirait une nouvelle et importante activité de la membrane à cette période, dont on pourrait penser qu'elle est liée, directement ou indirectement, à la formation de l'endospore. Dans cette hypothèse, la logique voudrait que, l'endospore une fois différenciée, l'activité physiologique au niveau de la membrane ralentisse et que la densité des PIM diminue à nouveau. C'est ce qui semble se passer, bien qu'il soit difficile, à la vue d'une paroi sporale fracturée, de déterminer l'âge de la spore ou de savoir, si au moment de la fracture nous étions en début, pendant ou en fin de différenciation de l'endospore. Une étude plus précise de ce phénomène serait donc nécessaire, de même qu'une étude de la membrane pendant l'activation de la spore avant l'extrusion du filament polaire.

Chez *Thelohania bracteata* LIU et Coll. (1971) puis LIU et DAVIES (1972, 1973) observent, sur les faces concave (EF) et convexe (PF) de la membrane fracturée de la spore, de nombreuses particules parfois disposées en une sorte de réseau. Parmi ces PIM ils remarquent également sur la face concave (EF) des sortes de "pustules" et sur la face convexe (PF) des petites dépressions, qui pourraient constituer un "système antidérapant" empêchant le contenu de la spore de tourner dans la spore, au moment de l'activation et de l'extrusion du filament polaire. Mais selon VAVRA et Coll. (1986), ce "système" pourrait être dû à un artéfact. Chez *Nosema apis*, LIU (1973) décrit une membrane plasmique dont la face convexe (PF) porte de nombreuses PIM alors que la face concave (EF), également granulaire, comporte des "particules" de taille plus grande. Puis LIU (1975), toujours chez *Nosema apis*, observe de nombreuses PIM sur la face convexe (PF) de la membrane d'une jeune spore, alors que cette même face, chez une spore mature apparaît relativement lisse avec peu de PIM ; cependant la

face concave (EF) porte ces sortes de "pustules" déjà remarquées chez *Thelohania bracteata* et qui pourraient être la conséquence d'un artéfact (VAVRA et Coll. 1986).

. L'endospore

La différenciation de l'endospore marque le passage du stade sporoblaste âgé au stade jeune spore, et semble indiquer la fin de la sporogénèse. L'endospore est une couche transparente, trois à quatre fois plus épaisse que l'exospore chez *Nosema apis*. Elle s'amincit fortement au pôle apical de la spore, là où se pratiquera l'ouverture permettant l'extrusion du filament polaire. La limite exospore-endospore est toujours marquée par l'existence d'une petite zone de matériel floconneux moins dense que celui constituant l'exospore. Dans l'endospore ce matériel floconneux peut parfois constituer des minces travées reliant la membrane plasmique à l'exospore. En raison de sa transparence certains auteurs ont cru voir, au niveau de cette endospore, un simple espace clair artificiel enveloppant la spore (MILNER 1972). De même LIU et DAVIES (1972) chez *Thelohania bracteata* et LIU (1973) chez *Nosema apis* suggèrent l'idée que cet espace clair pourrait résulter d'un phénomène de rétraction dû à la fixation chimique. Mais depuis VAVRA (1968, 1976) il est unanimement reconnu que cette couche transparente fait intégralement partie de la paroi sporale. Selon VAVRA (1967, 1968, 1971, 1976), le principal constituant de cette endospore est la chitine qui se présente comme un complexe protéino-chitineux. DESPORTES (1976) puis TOGUEBAYE et MARCHAND (1986), pensent que cette couche exsudée dans une zone de rétraction formée en fin de sporogénèse, serait d'origine endogène. Selon LIU et DAVIES (1972), les saccules dilatés à surface lisse, observés dans le cytoplasme des sporoblastes et issus du réticulum endoplasmique, joueraient un rôle dans la formation de l'enveloppe sporale.

En cryofracture nous avons retrouvé, au niveau de l'endospore, une zone vide et transparente dans laquelle on peut observer quelques particules et parfois des vésicules d'origine inconnue. Ces particules pourraient correspondre au matériel floconneux observé à la

limite endo-exospore, mais aussi à celui des travées reliant la membrane plasmique à la couche externe. L'endospore de *Nosema apis* ne présente jamais, en cryofracture, une texture fibrillaire. LIU et DAVIES (1973) décrivent la paroi de la spore de *Thelohania bracteata* comme étant formée de nombreuses microfibrilles emballées dans une matrice épaisse, sans toutefois pouvoir différencier l'endospore de l'exospore. Cependant VAVRA (1976) signale que les microphotographies présentées par ces auteurs montrent une couche fibrillaire dont l'épaisseur est comparable à celle de l'endospore observée sur coupes ultrafines (LIU et DAVIES 1972). Mais si cette couche correspond effectivement à l'endospore, sa structure fibrillaire, bien matérialisée en cryofracture, devrait l'être tout autant sur coupes ultrafines. De même dans la paroi de la spore de *Nosema apis* LIU (1975) ne distingue pas d'endospore mais remarque une matrice constituée de nombreuses microfibrilles fracturées longitudinalement et transversalement, qui ressemblent à celles observées dans l'endocuticule abdominale des abeilles parasitées. Si l'endospore est réellement fibrillaire, pourquoi ne retrouve-t-on pas ces microfibrilles sur coupes ultrafines ? Le principal problème est alors de connaître l'âge exact des stades étudiés et le moment précis du cycle où cette endospore se différencie. N'est-il pas possible que, sur tous les stades observés par ces auteurs, l'endospore ne soit pas encore formée, et la paroi ne comprendrait alors que la seule exospore dans laquelle deux sous-couches pourraient être distinguées. Chez *Nosema apis*, deux sous-couches peuvent parfois être observées au niveau de l'exospore (fig.125) de certaines spores. L'endospore de *Nosema apis* apparaît transparente aussi bien sur coupes ultrafines que sur répliques obtenues par cryofracture. Alors ne peut-on imaginer que cette composante puisse être constituée de chitine colloïdale (donc amorphe et sans sous-structure) non associée à des protéines. En effet MAUCHAMP et SCHREVEL (1977) ont montré l'existence d'une telle chitine au niveau des disques alaires de la chenille du lépidoptère *Pieris brassicae*. Il est également possible aussi que cette chitine puisse revêtir des aspects différents d'une espèce à l'autre.

. L'exospore

L'exospore est issue du matériel dense qui se dépose sur la membrane plasmique du sporonte, dépôt qui représente la première manifestation visible de la différenciation sporoblastique. Chez les sporoblastes âgés, en fin de sporogénèse, cette couche se décolle de la membrane plasmique, à l'instant où se forme l'endospore, pour constituer l'exospore proprement dite. L'épaisseur de celle-ci est variable d'une espèce à l'autre et peut même ne pas être uniforme autour d'une même spore, comme chez *Amblyospora sp.* (ANDREADIS et HALL 1979). Chez *Nosema apis* elle est relativement mince, par rapport à l'épaisseur de l'endospore, et présente un aspect homogène, sans sous-structure apparente, comme chez la plupart des *Nosema*. Cependant TOGUEBAYE et BOUIX (1989) décrivent, chez *Nosema galerucellae*, une exospore formée de plusieurs couches. Chez d'autres microsporidies l'exospore paraît également stratifiée et comporte plusieurs sous-couches comme chez *Thelohania maenadis* (VIVARES 1980), *Thelohania capillata*, *Thelohania corethrae* et *Episeptum inversum* (LARSSON 1983, 1986), *Amblyospora culicis* (TOGUEBAYE et MARCHAND 1986), *Duboscqia aediphaga* et *Amblyospora pinensis* (KETTLE et PIPER 1988). L'exospore de *Nosema apis* apparaît relativement lisse ou légèrement rugueuse, mais ne présente jamais d'ornementations comme chez *Spraguea lophii* (LOUBES et Coll. 1979) ou *Glugea americanus* (TAKVORIAN et CALI 1986). VAVRA (1976), signale la présence de certains appendices aux pôles des spores dans les genres *Caudospora*, *Weiseria*, *Mrazekia*. CODREANU et Coll. (1974) avaient aussi remarqué trois appendices tubulaires au pôle basal de la spore d'*Orthothelohania sp.*. D'autres appendices peuvent également être observés, au niveau de l'exospore de certaines microsporidies, sous forme soit de longs et fins filaments (VIVARES 1978, 1980), soit de filaments fins et de filaments larges (BATSON 1983), soit de formations microtubulaires comme chez *Ameson michaelis* (SPRAGUE et Coll. 1968, WEIDNER 1970) dont la structure a été précisée par DWYER et WEIDNER (1973), soit de formations tubulaires

comme chez *Tuzetia debaisieuxi* (VAVRA 1965, 1976; LOUBES et MAURAND 1976). Ces appendices se rencontrant plus fréquemment chez les espèces parasites d'animaux aquatiques, ils pourraient jouer un rôle important dans la flottaison des spores (VAVRA, 1963 1976) ou permettre de fixer celles-ci à un substrat ou aux particules flottantes (OVERSTREET et WEIDNER 1974).

En cryofracture, l'exospore de *Nosema apis* présente une texture granulofibrillaire comme cela a également été observé par LIU et DAVIES (1973), VAVRA et Coll. (1982, 1986). Chez les spores matures il est possible de distinguer deux sous-couches dans cette exospore : une sous-couche externe de texture plutôt granulaire et une sous-couche interne de texture plutôt fibrillaire (fig.125). Chez *Thelohania bracteata* (LIU et DAVIES 1973) montrent une paroi sporale dans laquelle deux sous-couches sont également visibles, et la plus interne pourrait correspondre, selon VAVRA et Coll. (1986), à l'endospore. Chez *Amblyospora opacita*, VAVRA et Coll. (1986) décrivent également une paroi avec deux couches de texture différente : l'exospore externe et l'endospore interne. Mais la question de savoir si cette couche interne représente vraiment l'endospore, reste posée. Chez *Nosema apis*, si deux sous-couches peuvent être visibles au niveau de l'exospore, l'endospore reste toujours aussi transparente.

Il est généralement reconnu que l'exospore est de nature protéique (VAVRA 1976). Selon VAVRA (1968), elle est dissoute par les alcalis puissants. WEIDNER (1976) indique que la paroi de la spore de *Nosema michaelis* résiste, comme la paroi interne du filament polaire, à un traitement à l'acide sulfurique; les images présentées suggèrent d'ailleurs que cette partie résistante pourrait correspondre à l'exospore. Celle-ci pourrait donc constituer la partie la plus résistante et la plus coriace de la paroi sporale.

RESUME et CONCLUSION

Les microsporidies *Nosemoides vivieri* et *Nosema apis* sont des parasites intracellulaires dont tous les stades du cycle sont en contact direct avec le cytoplasme de la cellule-hôte, et à ce titre, font partie des microsporidies apansporoblastiques considérées, d'un point de vue phylogénétique, comme plus évoluées que les microsporidies pansporoblastiques (MAURAND 1973, LOUBES 1979). L'intérêt systématique de l'existence ou non d'un pansporoblaste ou vésicule sporophorique a d'ailleurs été démontré par TUZET et Coll. (1971), SPRAGUE (1972, 1977, 1982), WEISER (1977, 1985), LARSSON (1986).

Ces deux parasites présentent le cycle classique des microsporidies (VAVRA 1976, VIVIER 1979) avec l'alternance des deux phases caractéristiques que sont la mérogonie ou phase végétative et la sporogonie ou sporogénèse. Cependant deux caractères principaux différencient ces deux espèces :

- *Nosema apis* apparaît toujours sous l'état diplocaryotique, c'est à dire que tous les stades du cycle présentent toujours un appareil nucléaire constitué de deux noyaux accolés en un diplocaryon, alors que *Nosemoides vivieri* est toujours monocaryotique.

- La sporogonie est de type disporé chez *Nosema apis* (chaque sporonte se divisant en deux sporoblastes) et du type polysporé chez *Nosemoides vivieri* (chaque sporonte produisant plusieurs sporoblastes plus ou moins disposés en rosette). Dans les deux cas, chaque sporoblaste évolue directement en une seule spore.

En ce qui concerne la structure fine des différents stades de développement, il semble exister peu de différences entre ces deux parasites, hormis la présence d'un diplocaryon pour l'un et d'un simple noyau pour l'autre.

La phase végétative ou mérogonie est représentée par des cellules classiques, les mérontes, limités par une simple membrane plasmique et principalement caractérisés par l'absence de mitochondries et de grains de réserves. Le nombre de générations mérogoniques n'est pas bien connu. Au cours de la division du noyau il y a persistance de l'enveloppe nucléaire

et la caryocinèse est une cryptomitose à formations polaires extranucléaires. Le diplocaryon de *Nosema apis* est constitué par la juxtaposition de deux noyaux sans qu'il y ait fusion d'une ou des deux membranes nucléaires au niveau de la zone d'accolement. Cependant la densité des particules intramembranaires, observée en cryofracture à cet endroit, est plus élevée que sur le reste des membranes nucléaires des deux noyaux, ce qui semble suggérer une activité plus intense à ce niveau et pourquoi pas l'échange d'informations ou même de matériel entre les deux noyaux.

Les mérontes de la dernière génération, parfois appelés présporontes par certains auteurs, évoluent en sporontes qui constituent le point de départ de la deuxième phase du cycle, la sporogonie. La structure des jeunes sporontes est identique à celle des mérontes, si ce n'est le dépôt d'une couche, d'abord discontinue puis continue ensuite, de matériel dense sur la face externe de la membrane plasmique. Ce phénomène marque la première manifestation visible de la sporogénèse. De chaque sporonte seront issus plusieurs (*Nosemoides vivieri*) ou deux (*Nosema apis*) sporoblastes. La caryocinèse précédant toujours la cytodièrese, des stades plasmodiaux transitoires sont fréquemment rencontrés.

Chaque sporoblaste évolue en une seule spore et constitue un remarquable exemple de différenciation cellulaire avec l'organitogénèse des différentes structures de la spore. Au cours de ce stade va s'élaborer tout le système d'extrusion, c'est à dire le filament polaire et ses annexes (polaroplaste et vacuole postérieure) qui permettra, après activation de la spore, "d'inoculer" le sporoplasme dans une nouvelle cellule-hôte. Le sporoblaste est donc le siège d'une très grande activité de la part de l'appareil de golgi, du réticulum endoplasmique mais également de la membrane plasmique. Le filament polaire sera constitué de deux parties : une partie basale rectiligne venant se fixer sur une structure particulière, le sac polaire situé au pôle apical de la spore, et une partie distale, beaucoup plus longue, enroulée en spirale sous la paroi de la spore. Il tire principalement son origine de l'intense activité de nombreuses

vésicules golgiennes. Son élaboration débute par la formation du sac polaire par coalescence de vésicules golgiennes et fusion de vésicules issues du réticulum endoplasmique. Ce sac polaire, en début de formation, est toujours situé dans une dépression du noyau chez *Nosemoïïes vivieri* ou ailleurs dans le cytoplasme chez *Nosema apis*, avant de gagner le pôle apical de la spore. Puis une vacuole en relation avec le sac polaire ou la base du filament, se forme à partir du réticulum endoplasmique mais aussi par coalescence des vésicules golgiennes. Dans cette "vacuole du filament polaire" (LOUBES et MAURAND 1976) qui correspond au "canal cytoplasmique" de VAVRA (1965), vont se différencier les éléments internes du filament polaire, à partir du contenu des vésicules golgiennes organisé en un réseau dense, éléments qui seront limités par une membrane correspondant à la membrane de la vacuole. Le filament, limité par une membrane, est alors constitué de trois zones : un axe central et une zone externe denses probablement de nature protéique, séparés par une zone moyenne claire de nature polysaccharidique (DESPORTES 1976). Ces trois zones correspondent parfaitement à celles observées sur les répliques obtenues par cryofracture. Le polaroplaste lamellaire se différencie, en fin de transformation sporoblastique, à partir de saccules et vésicules issus du réticulum endoplasmique qui viennent se placer sous le sac polaire, entourant la partie basale rectiligne du filament. La vacuole postérieure reste l'organe le plus énigmatique : son origine, son rôle, est-elle en relation ou non avec l'extrémité distale du filament polaire, sont des questions non élucidées à ce jour.

Tout au long de ce stade la membrane plasmique montre également une activité importante au vu de la forte densité des particules intramembranaires observées sur ses deux faces de fracture. Chez les sporoblastes âgés, lorsque le filament polaire et ses annexes sont différenciés, cette densité chute considérablement, puis remontera sensiblement lors de la formation de l'endospore. La membrane plasmique est recouverte d'une couche de matériel dense qui s'opacifie de plus en plus et qui sera à l'origine de l'exospore de la future paroi sporale.

Cette couche dense doit vraisemblablement constituer une barrière de plus en plus infranchissable entre le parasite et le cytoplasme de la cellule-hôte, et les échanges deviennent de moins en moins possibles. D'autre part toute cette organitogenèse doit nécessiter une importante quantité d'énergie et chez ces organismes les mitochondries et les réserves sont absentes. Cette énergie est-elle stockée au cours de la phase végétative et alors sous quelle forme ?

La spore constitue l'ultime étape du développement des microsporidies. Elle acquiert sa structure définitive dès la formation de l'endospore, qui est accompagnée d'une certaine compression du contenu cellulaire avec densification du cytoplasme. Le filament polaire, toujours enveloppé d'une membrane, présente une structure complexe où plusieurs couches concentriques sont visibles. Le polaroplaste prend un aspect feuilleté et paraît constituer une structure relativement rigide par compression des saccules en lamelles très serrées. La paroi sporale est constituée de trois parties : la membrane plasmique, l'endospore de nature chitineuse et l'exospore de nature protéique. Cette paroi forme une enveloppe très résistante avec une endospore insoluble par les alcalis (VAVRA 1968) et une exospore résistant à l'action des acides (WEIDNER 1976). L'origine exacte et le mécanisme de formation de ces deux composantes sont inconnus. Cette origine semble endogène pour l'endospore, puisqu'elle se différencie entre la membrane plasmique et l'exospore par une sorte d'exsudation ; quant à l'exospore, elle pourrait également être endogène, mais aussi exogène, à partir de matériel du cytoplasme de la cellule-hôte ; s'il s'agit alors d'une espèce de réaction parasitaire, pourquoi avoir attendu le stade sporonte pour réagir, à moins que cela ne constitue la deuxième phase d'un processus complexe et inconnu ayant débuté par l'encerclement des mérontes par le réticulum endoplasmique-hôte. En cryofracture, la densité des particules intramembranaires de la membrane plasmique augmente sensiblement au moment de la formation de l'endospore, puis diminue à nouveau chez les spores matures, mais cela demande confirmation. L'endospore

apparaît, comme sur les coupes ultrafines, pratiquement transparente et amorphe, ce qui serait original par rapport à l'aspect de celle des quelques autres microsporidies étudiées par la même technique. Cependant une étude complémentaire est nécessaire avant de pouvoir porter un jugement définitif. Enfin l'exospore présente une texture granulo-fibrillaire dans laquelle il est parfois possible, chez les spores âgées, de distinguer deux sous-couches : l'une interne plutôt fibrillaire et l'autre externe à dominante granulaire.

Ce travail devrait donc contribuer à une meilleure connaissance du monde des Microsporidies, et si la structure de ces parasites commence à être bien établie et que leur dépendance vis à vis de la cellule parasitée ne fait pas de doute, les problèmes liés à leur physiologie cellulaire sont nombreux : comment fonctionnent ces organismes, d'où tirent-ils l'énergie dont ils ont besoin, quelle est la nature des échanges hôte-parasite ? Ce sont là autant de questions qui restent à résoudre.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDREADIS T.G. (1983). Life cycle and epizootiology of *Amblyospora* sp. (Microspora : Amblyosporidae) in the mosquito *Aedes cantator* . J. Protozoology, 30 (3) : 509-518.
- ANDREADIS T.G., and HALL D.W. (1979). Development, ultrastructure and mode of transmission of *Amblyospora* sp. (Microspora) in the mosquito. J. Protozoology, 26, (3) : 444-452.
- ANDREADIS T.G. and HANULA J.L. (1987). Ultrastructural study and description of *Ovavesicula popilliae* N.G. n.sp. (Microsporida : Pleistophoridae) from the japanese beetle, *Popillia japonica* (Coleoptera : Scarabaeidae). J. Protozoology, 34, (1) : 15-21.
- AVERY S.W. and ANTHONY D.W. (1983). Ultrastructural study of early development of *Nosema algerae* in *Anopheles albimanus*. J. Invertebrate Pathology, 42 : 87-95.
- AWERINZEW S. (1908). Studies on parasitic protozoa. (Russian with german summary). Trav. Soc. Inst. Nat. St. Petersburg, Sect. Zool. et Physiol., 38 (2) : 1-139.
- AWERINZEW S. (1908). Über die Gregarinen aus dem Darne von *Amphiporus* sp. .Zool. Anz., 33 : 685-687.
- AWERINZEW S. (1909). Studien über parasitische Protozoan. III. Beobachtungen über die Vorgangen der Schizogonie bei Gregarinen aus dem Darne von *Amphiporus* sp.. Arch. Protistenk., 16 : 71-80.
- AZEVEDO C. (1987). Fine structure of the microsporidian *Abelspora portucalensis* g. n. sp. n. (Microsporida) parasite of the hepatopancreas of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). J. Invertebrate Pathology, 49 : 83-92.
- AZEVEDO C. and CANNING E.U. (1987). Ultrastructure of a microsporidian hyperparasite, *Unikaryon legeri* (Microsporida) of Trematode larvae. The Journal of Parasitology, 73 (1) : 214-223.
- BAILEY L. (1955). The infection of the ventriculus of the adult honeybee by *Nosema apis* Zander. Parasitology, 45 : 86-94.

- BAILEY L. (1976). La pathogénèse et l'écologie de *Nosema apis*. Symposium de Merelbeke. Ed. Apimondia, 41-46.
- BALBIANI G. (1882) . Sur les Microsporidies ou psorospermies des Articulés. C.R. Acad. Sci. Paris, 95 : 1168-1171.
- BATSON B.S. (1982) . A light and electron microscopical study of *Trichoduboscqia epeori* Léger (Microspora: Dubosqiidae). J. Protozoology, 29 (2) : 202-212.
- BASTON B.S. (1983) . A light and electron microscopic study of *Hirsutusporos austrosimulii* gen. n., sp. n., (Microspora : Nosematidae), a parasite of *Austrosimulium* sp. (Diptera : Simuliidae) in New-Zealand. Protistologica, 19 (2) : 263-280.
- BECNEL J.J., HAZARD E.I., FUKUDA T. and SPRAGUE V. (1987) . Life cycle of *Culicospora magna* (Kudo, 1920) (Microsporida : Culicosporidae) in *Culex restuans* Theobald with special reference to sexuality. J. Protozoology, 34 (3) : 313-322.
- BECNEL J.J., SPRAGUE V., FUKUDA T. and HAZARD E.I. (1989) : Development of *Edharzia aedis* (Kudo, 1930) N.G., N. Comb. (Microsporida : Amblyosporidae) in the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera : Culicidae). J. Protozoology, 36 (2) : 119-130.
- BEKHTI M. et BOUIX G. (1985) . *Loma salmonae* (Putz, Hoffman et Dunbar, 1965) et *Loma diplodae* n. sp., microsporidies parasites de branchies de poissons Téléostéens : implantation et données ultrastructurales. Protistologica, 21 (1) : 47-59.
- BERREBI P. (1978) . Contribution à l'étude biologique des zones saumâtres du littoral méditerranéen français. Biologie d'une Microsporidie : *Glugea atherinae* n. sp., parasite de l'athérine *Atherina boyeri* Risso, 1810, (Poisson Téléostéen) des étangs côtiers. Thèse de 3ème cycle, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- BERREBI P. (1979) . Etude ultrastructurale de *Glugea atherinae* n.sp., microsporidie parasite de l'athérine *Atherina boyeri* Risso 1810 (Poisson Téléostéen) dans les lagunes du Languedoc et de Provence. Z.Parasitenkunde, 60 : 105-122.

- BRANTON D., BULLIVANT S., GILULA N.B., MOOR H., MUHLETHALER K., NORTHCOTE D.H., PACKER L., SATIR B., SPETH V., STAEHELIN L.A., STEERE R.L., WEINSTEIN R.S. (1975) . Freeze etching nomenclature. *Science*, 190 : 54-56.
- BROOCKS W.M., HAZARD E.I. and BECNEL J. (1985) . Two new species of *Nosema* (Microsporida, Nosematidae) from the mexican bean beetle *Epilachna varivestis* (Coleoptera : Coccinellidae). *J. Protozoology*, 32 (3) : 525-535.
- BURNETT R.G. and KING R.C. (1962) . Observations on a microsporidian parasite of *Drosophila willistoni* Sturtevant. *J. Insect Pathology*, 4 : 104-112.
- CALI A. (1971) . Morphogenesis in the genus *Nosema*. Proc. 4 th Int. Colloq. Insect. Pathol., College Park, Maryland, 1970, 431-438.
- CANNING E.U., BARKER R.J., HAMMOND J.C. and NICHOLAS J.P. (1983) . *Unikaryon slaptonleyi* sp. nov. (Microsporida : Unikaryonidae) isolated from echinostome and strigeid larvae from *Lymnea peregra* : observations on its morphology, transmission and pathogenicity. *Parasitology*, 87 : 175-184.
- CANNING E.U. and GUNN A. (1984). *Nosema helminthorum* Moniez, 1887 (Microsporida, Nosematidae): a taxonomic enigma. *J. Protozoology*, 31 (4) : 525-531.
- CANNING E.U. and HAZARD E.I. (1982) Genus *Pleistophora* Gurley, 1893 : an assemblage of at least three genera. *J. Protozoology*, 29, (1) :39-49.
- CANNING E.U., LAI P.F. and LIE K.J. (1974). Microsporidian parasites of Trematode larvae from aquatic snails in West Malaysia. *J. Protozoology*, 21 (1) : 19-25.
- CANNING E.U., LOM J. and NICHOLAS J.P. (1982). Genus *Glugea* Thelohan 1891 (Phylum Microsporida) : redescription of the type species *Glugea anomala* (Moniez 1887) and recognition of its sporogonic development within sporophorous vesicles (pansporoblastic membranes). *Protistologica*, 18 (2) : 193-210.

- CANNING E.U. and NICHOLAS J.P. (1974): Light and electron microscope observations on *Unikaryon legeri* (Microsporida, Nosematidae), a parasite of the metacercaria of *Meigymnophallus minutus* in *Cardium edule* . J. Invertebrate Pathology, 23 : 92-100.
- CANNING E.U. and NICHOLAS J.P. (1980) . Genus *Pleistophora* (Phylum Microspora) : redescription of the type species *Pleistophora typicalis* Gurley, 1893 and ultrastructural characterization of the genus. J. Fish Diseases, 3 : 317-338.
- CANNING E.U., OLSON A.C. and NICHOLAS J.P. (1983). The ultrastructure of *Nosema lepocreadii* Canning and Olson, 1979 (Microspora, Nosematidae) and its relevance to the generic diagnosis of *Nosema* Naegeli, 1857. J. Parasitology, 69 : 143-151.
- CANNING E.U., SINDEN R.E. (1973). Ultrastructural observations on the development of *Nosema algerae* Vavra and Undeen (Microsporida, Nosematidae) in the mosquito *Anopheles stephensi* Liston. Protistologica, 9 : 405-415.
- CANNING E.U. and VAVRA J. (1977) . Microspora and Myxospora. Proceedings of the 5 th International Congress of Protozoology, New York, 42-50.
- CARPENTER P.L. (1967). Microbiology. W.B. Saunders editor, Philadelphia, London, 79.
- CAULLERY M. et MESNIL F. (1897). Sur un type nouveau (*Metchnikovella* n.g.) d'organismes parasites des Grégarines. C.R. Acad. Sci. Paris, 125 : 787-790.
- CAULLERY M. et MESNIL F. (1897). Sur un type nouveau (*Metchnikovella* n.g.) d'organismes parasites des Grégarines. C.R.Soc.Biol., 10 ser., 49 : 960-962.
- CAULLERY M. et MESNIL F. (1919). Metchnikovellidae et autres Protistes parasites des Grégarines d'Annélidés. Ann. Inst. Pasteur, 33 : 209-240.
- CODREANU R. (1967). Sur une Microsporidie nouvelle hyperparasite d'une Grégarine du genre *Enterocystis* et le statut systématique de la famille des Enterocystidae Margareta Codreanu 1940 propres aux Ephémères. Protistologica 3 : 351-352.
- CODREANU R. , POPA A.L. et VOICULESCU R. (1965) . Données sur l'ultrastructure des spores de microsporidies. Bulletin Apicole, 8 : 5-16.

- CODREANU-BALCESCU D., CODREANU R., PORCHET-HENNERE E. (1975). Aspects ultrastructuraux de la mitose chez les Microsporidies polysporées. J. Protozoology, 22, abstract 237, 78 A.
- COLLEY F.C., JOE L.K., ZAMAN V., CANNING E.U. (1975). Light and electron microscopical study of *Nosema eurytremae*. J. Invertebrate Pathology, 26 : 11-20.
- CORBEL C. (1967). *Metchnikovella martojai* n.sp. (Microsporidies, Metchnikovellidae) parasite d'une Grégarine de Gryllide. Protistologica, 3 : 365-368.
- CORLISS J.O. and LEVINE N.D. (1963). Establishment of the Microsporidea as a new class in the protozoan subphylum Cnidospora. J. Protozoology, 10 (Suppl.) : 26-27.
- COSSINS A.R. and BOWLER K. (1974). A histological and ultrastructural study of *Thelophania contejeani* Henneguy, 1892 (Nosematidae), microsporidian parasite of the crayfish *Autropotamobius pallipes* Lereboullet. Parasitology, 68 : 81-91.
- CURGY J.J., VAVRA J. and VIVARES C. (1980). Présence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in Microsporida, eukaryotic organisms. Biologie Cellulaire, 38 (1) : 49-52.
- DARWISH A., WEIDNER E. and FUXA J.R. (1989). *Vairimorpha necatrix* in adipose cells of *Trichoplusia ni*. J. Protozoology, 36 (3) : 308-311.
- DEBAISIEUX P. (1928). Etudes sur les Microsporidies. Cellule, 40 : 147-168.
- DESPORTES I. (1976). Ultrastructure de *Stempellia mutabilis* Léger et Hesse, microsporidie parasite de l'éphémère *Ephemera vulgata* L.. Protistologica, 12 (1) : 121-150.
- DESPORTES I., LE CHARPENTIER Y., GALIAN A., BERNARD F., COCHAND-PRIOU B., LAVERGNE A., RAVISSE P. et MODIGLIANI R. (1985). Occurrence of a new microsporidian : *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n.sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. J. Protozoology, 32 (2) : 250-254.

- DESPORTES I. et THEODORIDES J. (1979). Etude ultrastructurale d'*Amphiamblys laubieri* n. sp. (Microsporidie, Metchnikovellidae) parasite d'une grégarine (*Lecudina* sp.) d'un echiurien abyssal. *Protistologica*, 15 (4) : 435-457.
- DIAMANT A. et PAPERNA I. (1985). The development and ultrastructure of *Nosema ceratomyxae* sp. nov., a microsporidian hyperparasite of the Myxosporean *Ceratomyxa* sp. from red sea rabbitfish (Siganidae). *Protistologica*, 21 (2) : 249-258.
- DOTTIN B. (1986). La nosémose. Contribution à l'étude de l'influence de nourrissements printaniers sur la réceptivité de colonies d'abeilles *Apis mellifera* L.. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, Faculté de Médecine de Créteil.
- DUPRAW E.J. (1970) . DNA and chromosomes. Holt, Rinehart and Winston Inc., New York.
- DUVE (de) C. (1969).In "Lysosomes in Biology and Pathology". J.T. Dingle and H.B. Fell Editors (North-Holland, Amsterdam 1969), vol 1 : 3-40.
- DUBREMETZ J.F. and TORPIER G. (1978). Freeze fracture study of the pellicle of an Eimerian sporozoïte (Protozoa, Coccidia). *Journal of Ultrastructure Research*, 62 : 94 - 109.
- DWYER D.M., WEIDNER E. (1973). Microsporidian extrasporular microtubules. Ultrastructure, isolation and electrophoretic characterization. *Z. Zellforschung*, 140 : 177-186.
- ERICKSON B.W. Jr and BLANQUET R.S. (1969). The occurrence of chitin in the spore wall of *Glugea weissenbergi*. *J. Invertebrate Pathology*, 14 :358-364.
- FANTHAM H.B. and PORTER A. (1912). The morphology and life history of *Nosema apis* and the significance of its various stages in the so called "Isle of Wight" disease in bees (Microsporiosis). *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 6 : 163-195.
- FOWLER J.L. and REEVES E. (1975). Microsporidan spore structure as revealed by scanning electron microscopy. *J. Invertebrate Pathology*, 26 : 1-6.

- GORTZ H.D. (1987). Infections of *Stentor roeseli* and *S. polymorphus* (Ciliophora, Heterotrichida) by microsporidia. Z. Parasitenkunde Parasitology Research, 74 (1) : 34-35.
- GÖTZ P. (1981). Homology of the manubrium of *Mrazekia brevicauda* and the polar filament of other Microsporidia. Z. Parasitenkunde, 64 : 321-333.
- GRASSE P.P. (1960). Les Myxosporidies sont des organismes pluricellulaires. C.R.Acad.Sci. Fr., 152 : 2638-2640.
- GRASSE P.P. (1970). Embranchement des Myxozoaires. In GRASSE P.P., POISSON R.A., TUZET O., Ed. Précis de Zoologie. 1. Invertébrés, 2e ed., Masson et Cie, Paris, 107-112.
- GRAY F.H., CALI A. and BRIGGS J.D. (1969). Intracellular stages in the life cycle of the microsporidian *Nosema apis*. J. Invertebrate Pathology, 14 : 391-394.
- HAZARD E.I. and FEDERICI B.A. (1985). Ultrastructure and description of a new species of *Telomyxa* (Microspora : Telomyxidae) from the semiaquatic beetle *Ora taxana* Champ. (Coleoptera : Helodidae). J. Protozoology, 32 : 189-194.
- HAZARD E.I., FUKUDA T. and BECNEL J.J. (1985) : Gametogenesis and plasmogamy in certain species of Microspora. J. Invertebrate Pathology, 46 : 63-69.
- HAZARD E.I. and OLDACRE S.W. (1975). Revision of Microsporida (Protozoa) close to *Thelohania*, with descriptions of one new family, eight new genera, and thirteen new species. U.S. Dep. Agric. Techn. Bull., 1530, 104 p.
- HESSE E. (1909). Contribution à l'étude des Monocystidées des Oligochètes. Arch. Zool. exp. gen., 43 : 27-301.
- HILDEBRAND H.F. (1974). Observations ultrastructurales sur le stade plasmodial de *Metchnikovella wohlfarhi* HILDEBRAND et VIVIER 1971, microsporidie hyperparasite de la grégarine *Lecudina tuzetae*. Protistologica, 10 (1) : 5-15.

- HILDEBRAND H.F. et VIVIER E. (1971). Observations ultrastructurales sur le sporoblaste de *Metchnikovella wohlfarthi*, n. sp. (Microsporidies), parasite de la grégarine *Lecudina tuzetae*. *Protistologica*, 7 (1) 131-139.
- HOLLANDE A. (1972). Le déroulement de la cryptomitose et les modalités de la ségrégation des chromatides dans quelques groupes de Protozoaires. *Ann.Biol.*, 11 (9-10) : 427-466.
- HUGER A. (1960). Electron microscope study on the cytology of a microsporidian spore by means of ultrathin sectioning. *J.Insect Pathology*, 2 : 84-105.
- HUGER A. (1960). Elektronenmikroskopische analyse der innenstruktur von mikrosporidiensporen. *Naturwissenschaften*, 47 : 68-70.
- HUGER A. (1961). Sporentierchen als insektenfeinde. I. Elektronenmikroskopische untersuchungen über bau-und lebensweise der mikrosporidien. *Umschau* 9 : 270-272.
- IRBY W.S., HUANG Y.S., KAWANISHI C.Y. and BROOKS W.M. (1986). Immunoblot analysis of exospore polypeptides from some entomophilic microsporidia. *J. Protozoology*, 33 (1) :14-20.
- ISHIHARA R. (1968). Some observations on the fine structure of sporoplasm discharged from spores of a microsporidian, *Nosema bombycis*. *J. Invertebrate Pathology*, 12 : 245-257.
- KELLEN W.R., HOFFMANN D.F. and COLLIER S.S. (1977). Studies on the biology and ultrastructure of *Nosema transitellae* sp.n. (Microsporidia : Nosematidae) in the navel orangeworm, *Paramyebis transitella* (Lepidoptera : Pyralidae). *J. Invertebrate Pathology*, 29 : 289-296.
- KESSEL R.G. (1971). Origin of the Golgi apparatus in embryonic cells of the grasshopper. *J.Ultrastructure Research*, 34 : 260-275.

- KETTLE D.S. and PIPPER R.G. (1988). Light and electron microscope studies on three new species of microsporidia from saltmarsh mosquitoes in Australia. *European Journal of Protistology*, 23 (3) : 229-241.
- KRAMER J.P. (1960). Observations on the emergence of the microsporidian sporoplasm. *J. Insect Pathology*, 2 :433-439.
- KUDO R.R. (1920). Notes on *Nosema apis* Zander. *J. Parasitology*, 7 : 85-90.
- KUDO R. (1924). A biologic and taxonomic study of the Microsporidia. *Illinois Biol. Monographs*, 9 (2-3):1-268.
- KUDO R. and DANIELS E.W. (1963). An electron microscope study of the spore of a microsporidian, *Thelohania californica*. *J. Protozoology*, 10 : 112-120.
- LABBE A. (1899). Sporozoa. In "Das Tierreich" 5 Lief, Bütschli O. ed., 180 p., Friedlander u Sohn, Berlin.
- LANGE C.E. (1987). A new species of *Perezia* (Microsporida : Pereziiidae) from the argentine grasshopper *Dicroplus elongatus* (Orthoptera : Acrididae). *J. Protozoology*, 34 (1) : 34-39.
- LARSSON R. (1981). Description of *Nosema tractabile* n. sp. (Microspora, Nosematidae) a parasite of the leech *Helobdella stagnalis* L. (Hirudinea, Glossiphoniidae). *Protistologica*, 17 : 407-422.
- LARSSON R. (1983). *Thelohania capillata* n. sp. (Microspora, Thelohaniidae). An ultrastructural study with remarks on the taxonomy of the genus *Thelohania* Henneguy, 1892. *Arch.Protistenkunde*, 127 :21:46.
- LARSSON R. (1983). A revisionary study of the taxon *Tuzetia* Maurand, Fize, Fenwich and Michel 1971, and related forms (Microspora, Tuzetiidae). *Protistologica*, 19 (3):323-355.

- LARSSON R. (1983). On two microsporidia of the amphipod *Rivulogammarus pulex*. Light microscopical and ultrastructural observations on *Thelohania muelleri* (Pfeiffer 1895) and *Nosema rivulogammari* n. sp. (Microspora, Thelohaniidae and Nosematidae). Zool. Anz. Jena, 211 (5-6) : 299-323.
- LARSSON R. (1984). Ultrastructural study and description of *Chapmanium dispersus* n.sp. (Microspora, Thelohaniidae), a microsporidium parasite of *Endochironomus* larvae (Diptera, Chironomidae). Protistologica, 20 : 547-563.
- LARSSON R. (1986). Ultracytology of a tetrasporoblastic microsporidium of the caddisfly *Holocentropus picicornis* (Trichoptera, Polycentropodidae), with description of *Episeptum inversum* gen. sp. nov. (Microspora, Gurleyidae). Arch. Protistenkunde, 131:257-279.
- LARSSON R. (1986). Development, ultracytology and taxonomical position of *Thelohania corethrae* Schuberg and Rodriguez 1915 (Microspora, Thelohaniidae). Arch. Protistenkunde, 132 : 245-264.
- LARSSON R. (1986). Ultrastructure, function and classification of Microsporidia. Progr. Protozool., 1 : 325-390.
- LARSSON R. (1986). Sporogony of Microsporidia : ultrastructural features of taxonomic significance. Proceedings of the 4th International Colloquium of Invertebrate Pathology, Veldhoven 18-22 August 1986, 339-342.
- LARSSON R. (1988). Identification of microsporidian genera (Protozoa, Microspora). A guide with comments on the taxonomy. Arch. Protistenkunde, 136 :1-37.
- LARSSON R. (1989). On the cytology and life cycle of *Cougourdella polycentropi* Weiser 1965, with comments on the taxonomy of the genus *Cougourdella* Hesse, 1935 (Microspora, Cougourdellidae). European Journal of Protistology, 25 (1):33-44.
- LARSSON R. (1989). On the ultrastructure of *Hyalinocysta expilatoria* (Microspora, Thelohaniidae) and the taxonomy of the species. J. Invertebrate Pathology, 54 : 213-233.

- LARSSON R. and NORMAN D.Y. (1988). The ultrastructural cytology and taxonomy of *Duboscqia sidae* Jirovec 1942 (Microspora, Duboscqiidae) with establishment of the new genus *Agglomerata* gen. nov. . Arch. Protistenkunde, 135 :271-288.
- LEGER L. et DUBOSCQ O. (1909). Microsporidie parasite de *Frenzelina*. In : "Etudes sur la sexualité chez les Grégarines". Arch. Protistenkunde, 17:117-119.
- LEGER L. et DUBOSCQ O. (1909). Sur une Microsporidie parasite d'une grégarine. C.R.Acad. Sci. Paris, 148 : 733-734.
- LEGER L. et DUBOSCQ O. (1909). *Perezia lankesteriae* n. g. n. sp., Microsporidie parasite de *Lankesteria ascidiae* Ray-Lank. Arch. Zool. exp.gen.5e ser., 1, N.et R., n°3 :89-93.
- LEGER L. et HESSE E. (1922). Microsporidies bactériformes et essai de systématique du groupe. C.R.Acad.Sci.Paris, 174:327-330.
- LEGER L. et HESSE E. (1924). Microsporidies nouvelles parasites des animaux d'eau douce. II. Microsporidies bactériformes et essai de systématique du groupe. Trav.Lab. Hydrobiol. Pisc. Univ. Grenoble, 14 : 49-56.
- LIU H.J. and LIU T.P. (1973). Scanning electron microscope observations on the spore of *Nosema apis* Zander. Tissue & Cell, 5 (4) : 581-584.
- LIU H.J., MACEWEN F.L. (1977). *Nosema blissi* n.sp. (Microsporida, Nosematidae), a pathogen of the chinch bug *Blissus leucopterus hirtus* (Hemiptera, Lygaeidae). J. Invertebrate Pathology, 29 : 141-146.
- LIU T.P. (1972). A freeze-etching study on the nuclear envelope during development in a microsporidian *Thelophania bracteata* (Strickland, 1913). J. Parasitology, 58 (6): 1151-1161.
- LIU T.P. (1973). Fine structure of the developing spore of *Nosema apis* Zander. Z. Zellforschung, 141 : 469-478.
- LIU T.P. (1973). The fine structure of the frozen-etched spore of *Nosema apis* Zander. Tissue & Cell, 5 (2) : 315-322.

- LIU T.P. (1974). An ultrastructural analysis of spore development in *Thelohania fibrata* (Strickland, 1911). *Z. Parasitenkunde*, 43 : 279-284.
- LIU T.P. (1975). Ultrastructural analysis of the freeze-etched spore envelope of the microsporidian *Nosema apis* Zander. *Tissue & Cell*, 7 (4) : 613-618.
- LIU T.P. (1983). Surface structure of spores of *Nosema apis* Zander as seen in the scanning electron microscope. *American Bee Journal*, 123 (11) : 810-811.
- LIU T.P., DARLEY J.J. and DAVIES D.M. (1971). Preliminary observations on the fine structure of the pansporoblast of *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913) (Microsporida, Nosematidae) as revealed by freeze-etching electron microscopy. *J. Protozoology*, 18 (4) : 592-596.
- LIU T.P. and DAVIES D.M. (1972). Fine structure of developing spores of *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913) (Microsporida, Nosematidae) emphasizing polar filament formation. *J. Protozoology*, 19 (3) : 461-469.
- LIU T.P. and DAVIES D.M. (1972). Fine structure of frozen-etched spores of *Thelohania bracteata* emphasizing the formation of the polaroplast. *Tissue & Cell*, 4 (1) : 1-10.
- LIU T.P. and DAVIES D.M. (1972). Organization of frozen-etched *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913) (Microsporida, Nosematidae) emphasizing the fine structure of the posterior vacuole. *Parasitology*, 64 : 341-345.
- LIU T.P. and DAVIES D.M. (1973). Ultrastructure of the frozen-etched polar filament in a microsporidian *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913). *Canadian Journal of Zoology*, 51 (2) : 217-219.
- LIU T.P. and DAVIES D.M. (1973). Ultrastructural architecture and organization of the spore envelope during development in *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913) after freeze-etching. *J. Protozoology*, 20 (5) : 622-630.
- LIU T.P. and LIU H.J. (1974). Evaluation of some morphological characteristics of spores of two species of Microsporida by scanning electron microscope and freeze-etching techniques. *J. Morphology*, 143 : 337-348.

- LOM J. (1971) : On the structure of the extruded microsporidian polar filament. Z. Parasitenkunde, 38 : 200-213.
- LOM J. and CORLISS J.O. (1967). Ultrastructural observations on the development of the microsporidian protozoon *Plistophora hyphessobryconis* Schäperclaus. J. Protozoology, 14 : 141-152.
- LOM J. and VAVRA J. (1961). Contribution to the knowledge of microsporidian spore. Proc. 1st Int. Conf. Protozool., Praha, 487-489.
- LOM J. and VAVRA J. (1962). A proposal to the classification within the subphylum Cnidospora. Syst. Zool., 11 : 172-175.
- LOM J. and VAVRA J. (1963). The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores. Acta Protozoologica, 1 : 89-90.
- LOM J. and VAVRA J. (1963). Fine structure of microsporidian spore. Acta Protozool., 1 : 279-283.
- LOM J. and WEISER J. (1969). Notes on two microsporidian species from *Silurus glanis* and on the systematic status of the genus *Glugea* Thelohan. Folia Parasitol. (Prague), 16 : 193-200.
- LOM J. and WEISER J. (1972). Surface pattern of some microsporidian spores as seen in the scanning electron microscope. Folia Parasitol. (Praha), 19 : 359-363.
- LOUBES C. (1976. : Recherches sur la méiose chez les Microsporidies : conséquences sur les cycles biologiques. J. Protozoology, 26 (2) : 200-208.
- LOUBES C. (1979). Ultrastructure, sexualité, dimorphisme sporogonique des Microsporidies (Protozoaires). Incidences taxonomiques et biologiques. Thèse de Doctorat d'Etat Sciences Naturelles, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- LOUBES C. et AKBARIEH M. (1977). Etude ultrastructurale de *Nosemoides simocephali* n. sp. (Microsporidie) parasite intestinal de la daphnie *Simocephalus vetulus* (Muller, 1776). Z. Parasitenkunde, 54 : 125-137.

- LOUBES C. et AKBARIEH M. (1978). Etude ultrastructurale de la microsporidie *Baculae daphniae* n. g., n. sp., parasite de l'épithélium intestinal de *Daphnia pulex* Leydig, 1860 (Crustacé, Cladocère). *Protistologica*, 14 (1) : 23-38.
- LOUBES C. et MAURAND J. (1975). Etude ultrastructurale de *Gurleya chironomi* n. sp., microsporidie parasite des larves d'*Orthocladus* (Diptera, Chironomidae). *Protistologica*, 11 (2) : 233-244.
- LOUBES C. et MAURAND J. (1976) : Etude ultrastructurale de *Pleistophora debaisieuxi* Jivorec, 1943 (Microsporida) : son transfert dans le genre *Tuzetia* Maurand, Fize, Michel, et Fenwick, 1971, et remarques sur la structure et la genèse du filament polaire. *Protistologica*, 12 (4) : 577-591.
- LOUBES C. et MAURAND J. (1977). Essai de définition de critères ultrastructuraux pour la taxonomie des genres de Microsporidies. Fifth International Congress of Protozoology New-York, 26 june - 2 july 1977.
- LOUBES C., MAURAND J. et de BURON I. (1988). Premières observations sur deux microsporidies hyperparasites d'Acanthocephales de poissons marins lagunaires. *Parasitology Research*, 74 : 344-351.
- LOUBES C., MAURAND J., COMPS M. et CAMPILLO A. (1977) . Observations ultrastructurales sur *Ameson nelsoni* (Sprague, 1950), microsporidie parasite de la crevette *Parapenaeus longirostris* Lucas. Conséquences taxonomiques. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, 41 (3) : 217-222.
- LOUBES C., MAURAND J., GASC C. et BOUIX G. (1976). Cycle de développement et ultrastructure de *Glugea habrodesmi* n. sp., microsporidie parasite de Polydesmidae (Myriapoda, Diplopoda. *Acta Tropica Separatum*, 33 (3) : 246-253.
- LOUBES C., MAURAND J., GASC C., de BURON I. et BARRAL J. (1984). Etude ultrastructurale de *Loma dimorpha* n. sp., microsporidie parasite de poissons Gobiidae languedociens. *Protistologica*, 20 (4) : 579-589.
- LOUBES C., MAURAND J. et ORMIERES R. (1979). Etude ultrastructurale de *Spraguea lophii* (Doflein, 1898), microsporidie parasite de la baudroie : essai d'interprétation du dimorphisme sporal. *Protistologica*, 15 (1) : 43-54.

- LOUBES C. , MAURAND J. et ROUSSET-GALANGAU V. (1976). Présence de complexes synaptonématiques dans le cycle biologique de *Gurleya chironomi* Loubes et Maurand, 1975 : un argument en faveur d'une sexualité chez les microsporidies. C.R. Acad.Sci. Paris ser.D.,282 : 1025-1027.
- LOUBES C., MAURAND J., WALZER C. (1981). Développement d'une microsporidie (*Glugea truttiae* n. sp.) dans le sac vitellin de l'alevin de la truite *Salmo fario* L. : étude ultrastructurale. Protistologica, 17 (2) :177-184.
- MADDOX J.V. and SPRENKEL R.K. (1978). Some enigmatic Microsporida of the genus *Nosema*. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America, 11 (1) : 65-84.
- MADDOX J.V. and WEBB D.W. (1983). A new species of *Nosema* from *Hylobittacus apicalis* (Insecta, Mecoptera, Bittacidae). J. Invertebrate Pathology, 42 : 207-220.
- MALONE L.A. (1985). A new pathogen *Microsporidium itiiti* n. sp. (Microsporida), from the argentine stem weevil *Listronotus bonariensis* (Coleoptera, Curculionidae). J. Protozoology, 32 (3) : 535-541.
- MALONE L.A. and CANNING E.U. (1982). Fine structure of *Vairimorpha plodiae* (Microspora, Burenellidae), a pathogen of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Phycitidae) and infectivity of the dimorphic spores. Protistologica, 18 (4) : 503-516.
- MAUCHAMP B. et SCHREVEL J. (1977). Observations en microscopie à fluorescence de la cuticule des Insectes : une méthode faisant appel aux propriétés spécifiques de la WGA vis à vis des glycoconjugués de la chitine. C.R. Acad. Sc. Paris, 285 : 1107-1110.
- MAUL G.G. (1971). On the octogonality of the nuclear pore complex. J.Cell Biology, 51 : 558-563.
- MAURAND J. (1973). Recherches biologiques sur les microsporidies des larves de similies. Thèse Doctorat ès Sciences Naturelles, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.

- MAURAND J., FIZE A., FENWICK B., MICHEL B. (1971). Etude au microscope électronique de *Nosema infirmum* Kudo, 1921, microsporidie parasite d'un copépode cyclopoïde; création du genre nouveau *Tuzetia* à propos de cette espèce. *Protistologica*, 7 : 221-225.
- MAURAND J. et LOUBES C. (1973). Recherches cytochimiques sur quelques microsporidies. *Bull. Soc. Zool. France*, 98 : 373-383.
- MAURAND J. et VEY A. (1973). Etudes histopathologique et ultrastructurale de *Thelohania contejeani* (Microsporida, Nosematidae) parasite de l'écrevisse *Austropotamobius pallipes* Lereboullet. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 48 : 411-421.
- MESNIL F. (1915). Sur les Metchnikovellidae et autres Protistes parasites des Grégarines d'Annélides. *Bull. Inst. Pasteur*, 13 : 359.
- MILNER R.J. (1972). *Nosema whitei* microsporidian pathogen of some species of *Tribolium* . II. Ultrastructure. *J. Invertebrate Pathology*, 19 : 239-247.
- MILNER R.J., MAYER J.A. (1982). *Tuzetia boeckella* sp. nov. (Protozoa : Microspora), a parasite of *Boeckella triarticulata* (Copepoda : Calanoidea) in Australia. *J. Invertebrate Pathology*, 39 : 174-184.
- MOENS P.B. and RAPPORT E. (1971). Spindles, spindle plaques, and meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen). *J. Cell Biol.*, 50 : 344-361.
- MONTGOMERY T.H. (1898). Comparative cytological studies with especial regard to the morphology of the nucleolus. *J. Morphology*, 15 (2) : 265-582.
- MORRISON C.M., SPRAGUE V. (1981). Microsporidian parasites in the gills of salmonid fishes. *J. Fish Dis.*, 4 : 371-386.
- MORRISON C.M., SPRAGUE V. (1981). Electron microscopical study of a new genus and new species of Microsporida in the gills of Atlantic cod *Gadus morhua* L.. *J. Fish. Dis.*, 4 : 15-32.

- ORMIERES R., LOUBES C. et MAURAND J. (1977). Etude ultrastructurale de la microsporidie *Perezia lankesteriae* Léger et Duboscq 1909, espèce-type : validation du genre *Perezia* . Protistologica, 13 (1) : 101-112.
- ORMIERES R., LOUBES C., MAURAND J. (1981). *Amphiamblys bhatiellae* n. sp., microsporidie parasite de *Bhatiella marphysae* Setna, 1931, eugrégarine d'Annélide Polychète. Protistologica, 17 (2) : 273-280.
- ORMIERES R. and SPRAGUE V. (1973) . A new family, new genus and new species allied to the microsporida. J. Invertebrate Pathology, 21 : 224-240.
- OUAISSI M.A. (1977). Etude cytologique et cytochimique ultrastructurale de la jonction entre des protozoaires parasites (grégarines) et leur cellule-hôte (cellule intestinale d'Annélides Polychètes). Thèse Troisième cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- OUAISSI M.A. et PORCHET-HENNERE E. (1978). Etude ultrastructurale du mucron d'une grégarine du genre *Lecudina*, parasite intestinal d'*Audouinia tentaculata* (Annélide Polychète) et de ses rapports avec la cellule-hôte. Protistologica, 14 (1) : 39-52.
- OVERSTREET R.M., WEIDNER E. (1974). Differentiation of microsporidian spore-tails in *Inodosporus spraguei* gen. et sp. n. Z. Parasitenkunde, 44: 169-186.
- PILLEY B.M. (1976). A new genus *Vairimorpha* (Protozoa : Microsporida) for *Nosema necatrix* Kramer, 1965 : pathogenicity and life cycle in *Spodeptera exempta* (Lepidoptera : Noctuidae). J. Invertebrate Pathology, 28 : 177-183.
- POISSON R. (1953). Sous-embranchement des Cnidosporidies. Ordre des Microsporidies. Traité de Zoologie, sous la direction de P.P. GRASSE, Masson et Cie ed., I, fasc. 2, 1042-1070.
- POPA A.L. (1964). Données concernant la morphologie et la pathogénie du parasite *Nosema apis* Zander. Bulletin Apicole 7 : 93-105.

- POPA A.L., CODREANU R., VOICULESCU R., IONESCU M., PETROVICI A., SERBAN M., GRISAN I. (1967). Contribution à l'étude de l'ultrastructure des spores de *Nosema apis* Z..Bull. Apicole, 10 (1) : 5-10.
- PORCHET E. et TORPIER G. (1977). Etude du germe infectieux de *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii* par la technique du cryodécapage. Z. Parasitenkunde, 54 : 101-124.
- PURRINI K. (1981). *Nosema hylobii* n. sp. (Nosematidae, Microsporida), a new microsporidian parasite of *Hylobius abietis* L. (Curculionidae, Coleoptera). Z. Angew. Entomol., 92 : 1-18.
- PURRINI K. (1983). Über zwei Protozoenarten *Adelina triboli* Bathia, comb. nov. (Coccidia) und *Nosema ptinidorum* n. sp. (Microsporidia) als Krankheitserreger der vorratsschädlichen Käfer *Ptinus pusilus* Strm. und *P. brunneus* Dft. (Col.Ptinidae). Z. Angew. Entomol., 95 : 477-482.
- PURRINI K. and HALPERIN J. (1982). *Nosema calcarati* n. sp. (Microsporidia) a new parasite of *Pityogenes calcaratus* Eichloff (Col., Scolitidae). Z. Angew. Entomol., 94 : 87-92.
- PUYTORAC P. de (1961). L'ultrastructure du filament polaire invaginé de la microsporidie *Mrazekia lumbriculi* Jirovec 1936. C.R.Acad. Sci., 253 : 2600-2602.
- PUYTORAC P. de (1962). Observations sur l'ultratructure de la microsporidie *Mrazekia lumbriculi* Jirovec. J. Microscopie, 1 : 39-46.
- RÜHL H. and KORN H. (1979). Ein Mikrosporidier, *Geusia gamocysti* n. gen., n. sp., als hyperparasit bei *Gamocystis ephemerae*. Arch. Protistenkunde, 121 :349-355.
- SAFTOIU A., COLOIANU-IORCHADEL M. (1978). New ultrastructural data on the development of the protozoan *Nosema lymantriae* (Weiser) (Microsporidia), intracellular parasite on *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera). Trav.Mus. Hist. Nat. "Grigore Antipa", 19 : 83-87.

- SAKITI N.G. et BOUIX G. (1987). *Nosemoides tilapiae* n. sp., microsporidie parasite de Poissons Cichlidae des eaux saumâtres du Bénin : implantation et caractères ultrastructuraux. *Parasitology Research*, 73 : 203-212.
- SATO R., KOBAYASHI M. and WATANABE H. (1982). Internal ultrastructure of spores of microsporidians isolated from the silkworm *Bombyx mori*. *J. Invertebrate Pathology*, 40 : 260-265.
- SCARBOROUGH-BULL A. and WEIDNER E. (1985). Some properties of discharged *Glugea hertwigi* (Microsporida) sporoplasms. *J. Protozoology*, 32 (2) : 284-289.
- SCHEER U. (1970). The ultrastructure of the nuclear envelope of amphibian oocytes : a reinvestigation. IV. Actinomycin-induced decrease in central granules within the pores. *J. Cell Biology*, 45 : 445-449.
- SCHOLTYSECK E. and DANNEEL R. (1962). Über die feinstruktur der spore von *Nosema apis*. *Deutsch. Entomol. Z.*, 9 : 471-476.
- SCHREVEL J. (1969). Biologie, cytologie, physiologie des grégarines parasites d'Annélides Polychètes. Thèse Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles, Lille I.
- SCHREVEL J. (1969). Recherches sur le cycle des Lecudinidae, grégarines parasites d'Annélides Polychètes. *Protistologica*, 5 (4) : 561-588.
- SCHREVEL J. et VIVIER E. (1966). Etude de l'ultrastructure et du rôle de la région antérieure (mucron et épimerite) de Grégarines parasites d'Annélides Polychètes. *Protistologica*, 2 (3) : 17-28.
- SCHUBERG A. (1910). Über Mikrosporidien aus dem Hoden der Barbe und durch sie Verursachte Hypertrophie der Kerne. *Arb. Kais. Gesundh.*, 33 : 401-434.
- SCHUBERT G. (1969). Ultracytologische untersuchungen an der spore der mikrosporidienart *Heterosporis finki*, gen. n., sp. n. *Z. Parasitenkunde*, 32 : 59-79.
- SHABANOV M.M. (1973). Studies on the biological cycle of development of *Nosema apis* Zander. *Comptes Rendus de l'Académie Bulgare des Sciences*, 26 (9) : 1243-1246.

- SPETH V. and WUNDERLICH F. (1970). The macronuclear envelope of *Tetrahymena pyriformis* GL in different physiological states. IV. Appearance of freeze-etched nuclear pore complexes. *J. Cell Biology*, 47 : 772-777.
- SPIRA M.E., PARNAS I. and BERGMANN F. (1969). Organization of the giant axons of the cockroach *Periplaneta americana*. *Journal of Experimental Biology*, 50 : 615-627.
- SPRAGUE V. (1970) . Taxonomy of Microsporidia. *J. Parasitology*, 56, Sec. II, Part I, 327.
- SPRAGUE V. (1972). Classification of the Microsporidia. Proc. 496th Meeting Helminth. Soc. Washington, College Park.
- SPRAGUE V. (1977). Classification and phylogeny of the Microsporidia. In *Comparative Pathobiology*, vol. 2, L.A. Bulla and T.C. Cheng editors, Plenum Press, New-York and London, 1-30.
- SPRAGUE V. (1977). Annotated list of species of Microsporidia. In *Comparative Pathobiology*, vol. 2, L.A. Bulla and T.C. Cheng editors, Plenum Press, New-York and London, 31-334.,
- SPRAGUE V. (1977). The zoological distribution of the Microsporidia. In *Comparative Pathobiology*, vol. 2, L.A. Bulla and T.C. Cheng editors, Plenum Press, New-York and London, 335-385.
- SPRAGUE V. (1978). Characterization and composition of the genus *Nosema*. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*, 11 (1) : 5-16.
- SPRAGUE V. (1982). Microspora. In *Synopsis and classification of Living Organisms*, S.P. Parker editor, McGraw-Hill Book Company, New-York, vol. 1 : 589-594.
- SPRAGUE V. and VERNICK S.H. (1969). Light and electron microscope observations on *Nosema nelsoni* Sprague, 1950 (Microsporida, Nosematidae) with particular reference to its Golgi complex. *J. Protozoology*, 16 (2) : 264-271.
- SPRAGUE V. and VERNICK S.H. (1971). The ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporida, Nosematidae) and its taxonomic significance. *J. Protozoology*, 18 (4): 560-569.

- SPRAGUE V. and VERNICK S.H. (1974). Fine structure of the cyst and some sporulation stages of *Ichthyosporidium* (Microsporida). J. Protozoology, 21 (5) : 667-677.
- SPRAGUE V., VERNICK S.H., LLOYD B.J.Jr. (1968). The fine structure of *Nosema* sp. Sprague, 1965 (Microsporida, Nosematidae) with particular reference to stages in sporogony. J. Invertebrate Pathology, 12, : 105-117.
- STAEHELIN L.A., KIERMAYER O. (1970). Membrane differentiation in the Golgi complex of *Micrasterias denticulata* Breb. visualized by freeze-etching. J. Cell Science, 7: 787-792.
- STECHE W. (1965) . Zur ontogenie von *Nosema apis* Zander im mitteldarm der arbeitsbiene. Bulletin Apicole, 8 : 181-212.
- STECHE W. und HELD T. (1981). Rasterelektronenmikroskopische untersuchungen über die ontogenie von *Nosema apis* Zander. Apidologie, 12 (2) : 185-207.
- STEMPELL W. (1909). Über *Nosema bombycis* Näegeli. Arch. ProtistenK., 16 : 281-358.
- STREETT D.A. and HENRY J.E. (1987). Ultrastructural investigation of the microsporidium *Nosema cuneatum* (Microspora : Nosematidae) in the grasshopper *Melanoplus sanguinipes* (Orthoptera Acrididae) with emphasis on mitosis. European Journal of Protistology, 23 (1) : 18-27.
- TAKIZAWA H., VIVIER E. et PETITPREZ A. (1975). Recherches cytochimiques sur la microsporidie *Nosema bombycis* au cours de son développement chez le ver à soie (*Bombyx mori*). J. Protozoology, 22 : 359-368.
- TAKVORIAN P.M. and CALI A. (1983). Appendages associated with *Glugea stephani* , a microsporidian found in flounder. J. Protozoology, 30 (2) : 251-256.
- TAKVORIAN P.M. and CALI A. (1986). The ultrastructure of spores (Protozoa : Microspoda) from *Lophius americanus* , the angler fish. Protozoology, 33 (4) : 570-575.
- THELOHAN P. (1892). Observations sur les Myxosporidies et essai de classification de ces oragnismes. Bull. Soc. Philom., Paris, 4 : 165-178.

- THIERY J.P. (1967). Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie*, 6 : 987-1018.
- THOMSON H.M. (1960). A list and brief description of the Microsporidia infecting insects. *J. Insect Pathology*, 2 : 346-385.
- TOGUEBAYE B.S. (1986). Contribution à la connaissance des Microsporidies : recherches ultrastructurales et biologiques sur les Microsporidies parasites d'insectes de la Sénégambie. Thèse de Doctorat d'Etat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 1-405.
- TOGUEBAYE B.S. et BOUIX G. (1983). *Nosema manierae* sp. n., microsporidie parasite de *Chilo zacconius* Blezinski, 1970 (Lepidoptera : Pyralidae), hôte naturel, et *Heliothis armigera* (Hübner 1808) (Lepidoptera : Noctuidae) hôte expérimental : cycle évolutif et ultrastructure. *Z. Parasitenkunde*, 69 : 191-205.
- TOGUEBAYE B.S., BOUIX G. (1989). *Nosema galerucellae* n. sp., microsporidian (Protozoa, Microspora), parasite of *Galerucella luteola* Müller (Chrysomelidae, Coleoptera) : development cycle and ultrastructure. *European Journal of Protistology*, 24 (4) : 346-353.
- TOGUEBAYE B.S. et MARCHAND B. (1983) : Développement d'une microsporidie du genre *Unikaryon* Canning, Lai et Lie 1974, chez un coléoptère Chrysomelidae, *Euryopa rubre* (Latreille 1807) : étude ultrastructurale. *Protistologica*, 19 : 371-383.
- TOGUEBAYE B.S. et MARCHAND B. (1984). Etude ultrastructurale des stades de développement et de la mitose sporogonique de *Nosema henosepilachnae* n. sp. (Microsporida, Nosematidae) parasite de *Henosepilachna elaterii* (Rossi, 1794) (Coleoptera, Coccinellidae). *Protistologica*, 20 (2) : 165-179.
- TOGUEBAYE B.S. and MARCHAND B. (1984). *Nosema couilloudi* n. sp., microsporidie parasite de *Nisotra* sp. (Coleoptera, Chrysomelidae) : cytopathologie et ultrastructure des stades de développement. *Protistologica*, 20 (3) : 357-365.

- TOGUEBAYE B.S. et MARCHAND B. (1984). Etude ultrastructurale de *Unikaryon mattei* n. sp. (Microsporida, Unikaryonidae) parasite de *Nisotra* sp. (Coleoptera, Chrysomelidae) et remarques sur la validité de certaines *Nosema* d'Insectes. J. Protozoology, 31 (2): 339-346.
- TOGUEBAYE B.S. et MARCHAND B. (1985). Pathogénie, cycle de développement et ultrastructure d'*Amblyospora cylicis* n. sp. (Protozoa, Microspora), parasite du moustique *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera, Culicidae). Can.J. Zool., 63 : 1797-1809.
- TOGUEBAYE B.S. et MARCHAND B. (1986) : Genèse des différents organites de la spore uninucléée d'*Amblyospora culicis* (Protozoa, Microspora). Arch. Protistenkunde, 132 : 231-244.
- TOGUEBAYE B.S. et MARCHAND B. (1986). Fusion entre deux cellules uninucléées, au cours du cycle de développement sexué d'*Amblyospora culicis* (Protozoa, Microspora) : un argument en faveur d'une fécondation chez les Microsporidies. Protistologica, 22 (4): 359-367.
- TOGUEBAYE B.S. et MARCHAND B. (1986). Etude d'une infection microsporidienne due à *Nosema birgii* n. sp. (Microsporida, Nosematidae) chez *Mesoplatys cincta* Olivier, 1790 (Coleoptera, Chrysomelidae). Z. Parasitenkunde, 72 : 723-737.
- TOGUEBAYE B.S. and MARCHAND B. (1987). Intracellular emergence of the microsporidian sporoplasm as revealed by electron microscopy in *Nosema couilloudi* (Microspora, Nosematidae). Arch. Protistenkunde, 134 : 397-407.
- TRAPPMAN W. (1923). Morphologie und Entwicklungsgeschichte von *Nosema apis* Zander. Arch. Bienenk., 5: 221-234.
- TUZET O., MAURAND J., FIZE A., MICHEL R., FENWICK B. (1971). Proposition d'un nouveau cadre systématique pour les Microsporidies. C.R. Acad. Sci. Paris, 172 : 1268-1271.
- VAVRA J. (1964). Some recent advances in the study of microsporidian spores. Proc. Intern. Congr. of Parasitology, 1st, Rome, Italy, 443-444.

- VAVRA J. (1965). Etude au microscope électronique de la morphologie et du développement de quelques microsporidies. C.R.Acad. Sci. Paris, 261 : 3467-3470.
- VAVRA J. (1967). Hydrolyse enzymatique des spores de microsporidies. J. Protozoology, 14 (Suppl.), 49.
- VAVRA J. (1968). Ultrastructural features of *Caudospora simulii* Weiser (Protozoa, Microsporidia). Folia Parasitol. (Praha), 15 : 1-9.
- VAVRA J. (1971). Ultrahistochemical detection of carbohydrates in microsporidian spores. J. Protozool., 18 (Suppl.), 179.
- VAVRA J. (1972). Detection of polysaccharides in microsporidian spores by means of the periodic acid-thio-semicarbazide-silver proteinase test. J. Microscopie, 14 : 357-360.
- VAVRA J. (1973). Morphogenetic events in the developmental cycles of Microsporidia. In "Progress in Protozoology" 4th International Congress on Protozoology, Clermont Ferrand.
- VAVRA J. (1976). Structure of the Microsporidia. In Comparative Pathobiology, vol 1, L.A. Bulla and T.C. Cheng editors, Plenum Press, New-York and London, 1-86.
- VAVRA J. (1976). Development of the Microsporidia. In Comparative Pathobiology, vol 1, L.A. Bulla and T.C. Cheng editors, Plenum Press, New-York and London, 87-110.
- VAVRA J. (1984). *Norlevinea* n. g., a new genus for *Glugea daphniae* (Protozoa : Microspora) a parasite of *Daphnia longispina* (Crustacea : Phyllopora). J. Protozoology, 31 (4) : 508-513.
- VAVRA J. and BARKER R.J. (1980). The observation of microsporidian spores using the scanning electron microscope : an evaluation of techniques. Folia Parasitologica (Praha), 27 : 97-102.
- VAVRA J., CANNING E.U., BARKER R.J. and DESPORTES I. (1981). Characters of microsporidian genera. Parasitology, 82 : 131-142.

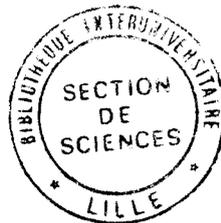
- VAVRA J. and SPRAGUE V. (1976). Glossary for the Microsporidia. In Comparative Pathobiology, vol. 1, L.A. Bulla and T.C. Cheng editors, Plenum Press, New-York and London, 341-363.
- VAVRA J., TORPIER G. et PORCHET E. (1982). The structure of microsporidian spores as revealed by freeze-fracture technique (FFT). J. Protozoology, 29 : 509 (abstract).
- VAVRA J. and UNDEEN A. (1970). *Nosema algerae* n. sp. (Cnidospora, Microsporida) a pathogen in a laboratory colony of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera, Culicidae). J. Protozoology, 17 : 240-249.
- VAVRA J., VINCKIER D., TORPIER G., PORCHET E., VIVIER E. (1986). A freeze-fracture study of Microsporidia (Protozoa : Microspora). I. The sporophorous vésicle, the spore wall, the spore plasma membrane. Protistologica, 22 (1) : 143-154.
- VERNICK S.H., SPRAGUE V., KRAUSE D. (1977). Some ultrastructural and functional aspects of the Golgi apparatus of *Thelohania* sp. (Microsporida) in the shrimp *Pandalus jordani* Rathbun. J. Protozoology, 24 (1) : 94-99.
- VERNICK S.H., TOUSIMIS A. and SPRAGUE V. (1969). Surface structure of the spores of *Glugea weissenbergi*. 27 th Ann. Proc. EMSA, 238-239.
- VINCKIER D. (1972). Sur le cycle et l'ultrastructure de la grégarine *Leucudina linei* n. sp., parasite du némete *Lineus viridis*. J. Protozoology, vol. 19 (suppl.), 225.
- VINCKIER D. (1975). *Nosemoides* gen. n., *N.vivieri* (Vinckier, Devauchelle et Prensier, 1970) comb.nov. (Microsporidie); Etude de la différenciation sporoblastique et genèse des différentes structures de la spore. J. Protozoology, 22 (2) : 170-184.
- VINCKIER D., DEVAUCHELLE G. et PRENSIER G. (1970). *Nosema vivieri* n.sp. (Microsporidie, Nosematidae) hyperparasite d'une grégarine vivant dans l'intestin d'un némete. C. R. Acad. Sci. Paris, 270 : 821-823.
- VINCKIER D., DEVAUCHELLE G. et PRENSIER G. (1971). Etude ultrastructurale du développement de la microsporidie *Nosema vivieri* (Vinckier, Devauchelle et Prensier 1970). Protistologica, 7 (2) : 273-287.

- VIVARES C. (1978). Gregarinoses et Microsporidioses de Brachyours (Crustacés Décapodes) de la Méditerranée occidentale : Aspects cytologiques, biochimiques et physiologiques. Thèse Doctorat d'Etat (Mention Sciences), Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- VIVARES C.P. (1980). Etude ultrastructurale de *Thelohania maenadis* Perez (Microspora, Microsporida) et données nouvelles sur le genre *Thelohania* Henneguy. Arch. Protistenkunde, 123 : 44-60.
- VIVARES C.P., BOUIX G. et MANIER J.F. (1977) : *Ormieresia carcini* n. sp. n., microsporidie du crabe méditerranéen *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky, 1884 : cycle évolutif et étude ultrastructurale. J. Protozoology, 24 (1) : 83-94.
- VIVARES C.P., LOUBES C. et BOUIX G. (1976) : Recherches cytochimiques approfondies sur les microsporidies parasites du crabe vert de la Méditerranée *Carcinus mediterraneus* Czerniavsky, 1884. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée (Paris), 51 (1) : 1-14.
- VIVARES C.P. and SPRAGUE V. (1979). The fine structure of *Ameson pulvis* (Microspora, Microsporida) and its implications regarding classification and chromosome cycle. J. Invertebrate Pathology, 33 : 40-52.
- VIVIER E. (1965). Etude au microscope électronique de la spore de *Metchnikovella hovasei* n. sp.; appartenance des Metchnikovellidae aux Microsporidies. C.R.Acad. Sci. Paris, 260: 6982-6984.
- VIVIER E. (1965). Présence de microtubules intranucléaires chez *Metchnikovella hovassei* Vivier. J. Microscopie, 4 (4) : 559-562.
- VIVIER E. (1968). L'organisation ultrastructurale corticale de la grégarine *Lecudina pellucida* ; ses rapports avec l'alimentation et la locomotion. J. Protozoology, 15 : 230-246.
- VIVIER E. (1973). Aspects variés de la division nucléaire chez les Sporozoaires et les Microsporidies. Progress in Protozoology, 4th Int. Cong. Protozoology, Clermont Ferrand, 425.
- VIVIER E. (1975). The Microsporidia of the Protozoa. Protistologica, 11 (3) : 345-361.

- VIVIER E. (1975). Etude comparative faite en microscopies photonique et électronique de trois espèces de microsporidies appartenant au genre *Thelohania* Henneguy, 1892, parasites de crustacés décapodes marins. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.*, 17 : 141-178.
- VIVIER E. (1979). Données nouvelles sur les Microsporidies. Ultrastructure - Cycles - Systématique. *Bull. Soc. Zool. France*, 104 (4) : 381-396.
- VIVIER E., DEVAUCHELLE G., PETITPREZ A., PORCHET-HENNERE E., PRENSIER G., SCHREVEL J. et VINCKIER D. (1970). Observations de cytologie comparée chez les Sporozoaires. I. Les structures superficielles chez les formes végétatives. *Protistologica*, 6 (1) : 127-150.
- VIVIER E. et SCHREVEL J. (1973). Etude en microscopie photonique et électronique de différents stades du cycle de *Metchnikovella hovassei* et observations sur la position systématique des Metchnikovellidae. *Protistologica*, 9 (1) : 95-118.
- VIVIER E., VICKERMAN K. (1974). Divisions nucléaires chez les Protozoaires. *Actualités Protozoologiques*, 161-177. Université de Clermont Ferrand, P. de PUYTORAC, J. Grain, eds.
- WALKER M.H., HINSCH C.W. (1975). Ultrastructural observations of a microsporidian protozoan parasite in *Libinia dubia* (Decapoda). II. Structure of the mature spore. *J. Parasitology*, 61 : 1074-1080.
- WEIDNER E. (1970). Ultrastructural study of microsporidian development. I. *Nosema* sp. Sprague, 1965 in *Callinectes sapidus* Rathbun. *Z. Zellforsch.*, 105 : 33-54.
- WEIDNER E. (1972). Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. *Z. Parasitenkunde*, 40 : 227-242.
- WEIDNER E. (1975). Interactions between *Encephalitozoon cuniculi* and macrophages. *Z. Parasitenkunde*, 47 : 1-9.

- WEIDNER E. (1976). The microsporidian invasion tube. I. The ultrastructure, isolation and characterization of the protein comprising the tube. *The Journal of Cell Biology*, 71 : 23-34.
- WEIDNER E. (1976). Some aspects of microsporidian physiology. In *Comparative Pathobiology*, vol I, L.A. Bulla and T.C. Cheng editors, Plenum Press, New-York and London, 111-126.
- WEIDNER E. (1982) : The microsporidian spore invasion tube. III. Tube extrusion and assembly. *The Journal of Cell Biology*, 93 : 976-979.
- WEIDNER E. and BYRD W. (1982). The microsporidian spore invasion tube. II. Role of calcium in the activation of invasion tube discharge. *The Journal of Cell Biology*, 93 : 970-975.
- WEIDNER E., BYRD W., SCARBOROUGH A., PLESHINGER J. and SIBLEY D. (1984). Microsporidian spore discharge and the transfer of polaroplast organelle membrane into plasma membrane. *J. Protozoology*, 31 (2) : 195-198.
- WEIDNER E. and TRAGER W. (1973). Adenosine triphosphate in the extracellular survival of an intracellular parasite (*Nosema michaelis*, Microsporidia). *J. Cell Biology*, 57 : 586-591.
- WEISER J. (1959). *Nosema laphygmae* n. sp. and the internal structure of the microsporidian spore. *J. Insect Pathology*, 1 : 52-59.
- WEISER J. (1961). Die Mikrosporidien als Parasiten der Insekten. Monographien zur Angew. Entomol., 17 : 1-149.
- WEISER J. (1977). Contribution to the classification of Microsporidia. *Vestník Československé Společnosti Zoologické, Svazek XLI, Číslo 4, Str. 308-320.*
- WEISER J. (1978). Morphological differences of *Nosema apis* and *Nosema bombi*. *Progress in Invertebrate Pathology, Proceedings of the International Colloquium on Invertebrate Pathology and XIth Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology, Prague 11-17 September 1978, 241-242.*

- WEISER J. (1985). Phylum Microspora Sprague, 1969. In An illustrated guide to the Protozoa, J.J. Lee, S.H. Hunter and E.C. Bovee editors. Society of Protozoologists, Lawrence.
- WILDFÜHR W. and FRITZSCH W. (1969). Die feinstruktur der sporen von *Nosema apis*. Angew. Parasitol., 10 : 39-52.
- YOUSSEF N.N. and HAMMOND D.M. (1971). The fine structure of the developmental stages of the microsporidian *Nosema apis* Zander. Tissue & Cell, 3 : 283-294.
- XIE W.D. and CANNING E.U. (1986). *Pyrotheca hydropsychaeae* n. sp. a microsporidian parasite of caddis fly larvae *Hydropsyche siltalai* Döhler, 1963 (Trichoptera, Hydropsychidae). J. Protozoology, 33 (4) : 462-467.
- ZANDER E. (1909). Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. Leipziger Bienenzeitung, 24 : 147-150, 164-166.
- ZHDANOV S.V. (1960). *Nosema* disease and morphological changes in the honey bee. Work. Soc. Naturalists, 120 : 209-270 (Transl. from Russian).



RESUME

Les microsporidies *Nosemoides vivieri* et *Nosema apis* sont des protozoaires parasites intracellulaires obligatoires, dont tous les stades du cycle sont en contact direct avec le cytoplasme de la cellule-hôte. Ce cycle est caractérisé par l'alternance de deux phases : une phase végétative (ou mérogonie) à structure cellulaire non spécialisée pendant laquelle le parasite croît et se multiplie activement, et une phase sporogonique (ou sporogonie) aboutissant à la formation de la spore qui montre une structure complexe hautement différenciée. En effet celle-ci contient le germe infectieux ou sporoplasme, mais aussi tout l'appareil nécessaire à son inoculation dans la cellule-hôte.

L'étude ultrastructurale des différents stades du cycle : mérontes, sporontes, sporoblastes et spores montre le rôle primordial des vésicules golgiennes et du réticulum endoplasmique dans la genèse des différents organites de la spore : sac polaire, filament polaire, polaroplaste, vacuole postérieure. La cryofracture confirme, chez *Nosema apis*, les résultats obtenus en ultrastructure classique et met en évidence l'évolution des systèmes membranaires tout au long du cycle du parasite, en particulier les modifications intervenant au niveau de la membrane plasmique au cours de la transformation sporoblastique.

MOTS - CLES : Microsporidie, Différenciation Cellulaire, Ultrastructure, Transformation Sporoblastique, Spore, Cryofracture, Systèmes Membranaires.

SUMMARY

The two microsporidian species *Nosemoides vivieri* V.D. et P. 1970 and *Nosema apis* Zander 1909 are obligatory intracellular protozoan parasites whose developmental stages are directly in contact with the host-cell cytoplasm. The life cycle is specially characterized by the alternation of two distinct phases : the vegetative phase (merogony) with a nonspecialized cellular structure, during which the parasite grows and rapidly divides by schizogony, and sporulation (sporogony) when many spores are formed, showing a complicated highly differentiated structure. In fact the spore, surrounded by a protective envelope, contains the infective germ (sporoplasm) of the microsporidian and the extrusion apparatus necessary to its transmission into the host-cell.

Whith ultrastructural investigations of the developmental stages : meronts, sporonts, sporoblasts and spores, the primordial role of Golgi-type vesicles and endoplasmic reticulum in the formation of several specialized spore organelles : polar sac, polar filament, polaroplast, posterior vacuole, has been demonstrated. The freeze-fracture technique corroborates, in *Nosema apis* developmental stages, the previous results obtained with conventional electron microscopy, and reveals the evolution of membrane systems in the different stages of the life cycle of the parasite, emphasizing particularly the modifications that occur at the level of the plasma membrane during the sporogonial transformation.

