



Contribution à la connaissance de l'ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde des Digènes

Abdoulaye Jacque Sacodou Bakhoum

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I PARASITOLOGIA SANITÀRIES

Contribution à la connaissance de
l'ultrastructure de la spermiogenèse
et du spermatozoïde des Digènes

Abdoulaye J.S. BAKHOUM

2012

À mes parents.

À ma très chère femme et ma « petite maman » Debo Bintou.

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I PARASITOLOGIA SANITÀRIES

TESIS DOCTORAL

**CONTRIBUTION À LA CONNAISSANCE DE
L'ULTRASTRUCTURE DE LA SPERMIOGENÈSE ET
DU SPERMATOZOÏDE DES DIGÈNES**

BAKHOUM (2012)

**UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA**

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I PARASITOLOGIA SANITÀRIES

**PROGRAMA DE DOCTORADO:
Investigación, Desarrollo y Control de Medicamentos**

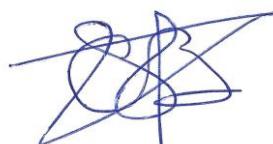
**Contribution à la connaissance de
l'ultrastructure de la spermiogenèse et du
spermatozoïde des Digènes**

Memoria presentada por: **ABDOULAYE JACQUE SACODOU BAKHOUUM**
Para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona

Los Directores:



Dr. Jordi Miquel Colomé
Departament de Microbiologia i
Parasitologia Sanitàries,
Universitat de Barcelona



Prof. Cheikh Tidiane Bâ
Département de Biologie animale,
Université Cheikh Anta Diop de Dakar

El Doctorando:



Abdoulaye Jacque Sacodou Bakhoum

Bakhoum (2012)

Remerciements

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la Collaboration entre les laboratoires :

- de Parasitologie du Département de Microbiologie et Parasitologie Sanitaires de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Barcelone, sous la tutelle de Monsieur le Docteur Jordi Miquel,
- et de Biologie Évolutive, Écologie et Gestion des Écosystèmes du Département de Biologie Animale de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD) dirigé par Monsieur le Professeur Cheikh Tidiane Bâ.

Cette Thèse a été subventionnée en partie par la bourse de la « Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo del Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación (MAEC-AECID) » (réfs. 2008-09 0000268861, 2009-10 0000448019, 2010-11 0000538055), le Projet de Coopération Interuniversitaire (PCI de la AECID) entre l'Espagne et le Sénégal (réfs. A/023428/09 et A/030039/10) et le Projet DURSI 2009-SGR-403.

Je souhaite exprimer tous mes sincères remerciements à mes deux directeurs de thèse :

Monsieur Jordi Miquel ou « Jordi » comme j'ai l'habitude de l'appeler. En nous demandant de vous appeler Jordi plusieurs barrières ont été du coup supprimées nous permettant de ne pas ressentir l'absence de nos proches. Je vous remercie plus que grandement de m'avoir enseigné, conseillé et guidé dans la découverte du monde fabuleux de l'ultrastructure. Je vous remercie pour votre confiance tout au long de ces années passées ensemble, de votre engagement inconditionnel, de votre patience suite à mon « espagnole d'ancien combattant » dont vous avez grandement participé à son amélioration, de votre courtoisie et bonne humeur permanente. N'ayant pas tous les mots nécessaires pour vous exprimer ma profonde gratitude, je ne pourrais terminer sans vous remercier d'avoir accepté de corriger cette thèse.

Monsieur Cheikh Tidiane Bâ pour m'avoir soutenu du début à la fin de cette aventure, pour avoir guidé mes premiers pas de chercheur et pour avoir corrigé ce manuscrit malgré le peu de temps dont vous disposez. Votre patience, rigueur et courtoisie marquera toujours mes démarches quotidiennes et scientifiques. C'est un grand honneur pour moi de vous avoir comme directeur de thèse.

Je souhaite exprimer mes profonds remerciements au personnel de la « Unitat de Microscòpia, Facultat de Medicina, Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB) ». À Núria Cortadellas, Almudena García et Eva Fernández. Merci d'avoir accepté de m'enseigner les connaissances basiques pour la Microscopie Électronique, de m'avoir conseillé, encouragé, bref, je ne saurais citer tous les bienfaits dont vous m'avez fait bénéficier.

Je remercie vivement le Docteur Catarina Eira pour avoir apporté des corrections judicieuses et des remarques utiles lors de la rédaction des différents articles en anglais.

Je ne saurais oublier toute l'équipe des Laboratoires des deux Universités citées antérieurement.

Merci spécial au Professeur Carlos Feliu « hasta aquí todo ha ido muy bien », c'est certain jusqu'ici tout s'est très bien passé. Merci pour m'avoir accueilli dans votre Département, je fais partie sans aucun doute de vos admirateurs.

Merci spécial au Docteur Jordi Torres et aux Docteurs Juan Matías Segovia, Joan Carles Casanova, María Soledad Gómez, Isabel Montoliu, Alexis Ribas... je ne saurais tous les citer car il y a un célèbre proverbe wolof qui dit : « Kou lim joum »; celui qui commence à citer, oubliera sans aucun doute. Merci pour votre hospitalité, vos sourires et votre soutien.

De l'autre coté de l'Atlantique, plus précisément à l'UCAD, je remercie mes collègues et amis du laboratoire.

Merci à Aminata Sène, Aïssatou Bâ, Diegane Sène, Ayatoulaye Dione, Pape Mbagnick Diagne... là aussi « kou lim joum ».

Merci à Adji Mama Marigo, nul doute que quelques lignes ne résumerait pas tout ce qu'on a vécu comme binôme, te voilà finaliste de la coupe du « turundo »; juste

encore, un petit effort. Je souhaiterais juste que le Bon Dieu puisse prendre soin de toi.

Je ne saurais terminer sans remercier du fond du cœur le Docteur Papa Ibnou Ndiaye, merci de m'avoir appris à poser mes premiers pas à Barcelone, de m'avoir soutenu et conseillé durant ces quatre ans. Sans aucun doute, l'empreinte de votre connaissance restera indélébile.

Je remercie tous mes amis et membres de « l'Associació Catalana de Residents Senegalesos ». Merci à Abdou Mawa Ndiaye et sa famille, Fodé Mané, Omar Diatta, Pauline Diouf, Amadou Bocar Sam...là aussi « kou lim jourm ».

Par le biais de cette thèse je remercie mes parents proches ou lointains.

Un Grand Merci, décollant de Saint-Louis, passant par Dakar et Fatick, et atterrissant à Ziguinchor où ma « petite vie » a vue le jour. Merci à mes frères et sœurs.

Merci Papa, Merci Maman, j'aurais beaucoup aimé qu'elle soit là pour voir son fils grandir. La volonté de Dieu étant ce qu'elle est, je ne peux que la dédier des *IKH-LASSI* et prier pour que le Miséricordieux l'accueille dans son Paradis. Merci pour l'éducation que j'ai reçue, qu'Allah vous accorde toute Sa Grâce et Sa Miséricorde.

Je souhaite également exprimer ma profonde gratitude aux rapporteurs et membres du Jury de cette thèse.

Je suis très honoré de votre présence à tous dans mon jury de thèse.

SOMMAIRE

| | |
|---------------|---|
| Remerciements | |
| Abstract..... | 5 |
| Resumen..... | 7 |

PREMIER CHAPITRE : INTRODUCTION

| | |
|--|----|
| I- Introduction générale..... | 43 |
| I-1 Pourquoi les caractères ultrastructuraux ?..... | 45 |
| I-2 Histoire de la classification chez les Digènes..... | 48 |
| I-2-1 Approches moléculaires dans la classification des Digènes..... | 49 |
| I-2-2 Approches ultrastructurales dans la classification des Digènes..... | 50 |
| I-3 État actuel des connaissances sur l'ultrastructure de la spermiogenèse et/ou du spermatozoïde des Digènes..... | 50 |
| I-4 Objectifs..... | 61 |

DEUXIÈME CHAPITRE : MATÉRIELS ET MÉTHODES

| | |
|---|----|
| II- Matériels et méthodes..... | 65 |
| II-1 Espèces étudiées..... | 65 |
| II-1-1 <i>Brachycoelium salamandrae</i> (Frölich, 1789)..... | 66 |
| II-1-1-1 Morpho-anatomie..... | 67 |
| II-1-1-2 Biogéographie..... | 67 |
| II-1-1-3 Cycle biologique..... | 68 |
| II-1-2 <i>Diplodiscus subclavatus</i> (Pallas, 1760)..... | 70 |
| II-1-2-1 Morpho-anatomie..... | 71 |
| II-1-2-2 Biogéographie..... | 71 |
| II-1-2-3 Cycle biologique..... | 72 |
| II-1-3 <i>Euryhelmis squamula</i> (Rudolphi, 1819)..... | 74 |
| II-1-3-1 Morpho-anatomie..... | 75 |
| II-1-3-2 Biogéographie..... | 75 |
| II-1-3-3 Cycle biologique..... | 75 |
| II-1-4 Les Mésométridés..... | 77 |
| II-1-4-1 Morpho-anatomie | 78 |
| II-1-4-1-1 <i>Elstia stossichianum</i> (Monticelli, 1892)..... | 78 |
| II-1-4-1-2 <i>Wardula capitellata</i> (Rudolphi, 1819)..... | 78 |
| II-1-4-2 Biogéographie..... | 79 |
| II-1-4-3 Cycle biologique..... | 79 |
| II-1-5 <i>Mediogonimus jourdanei</i> Mas-Coma & Rocamora, 1978..... | 81 |
| II-1-5-1 Morpho-anatomie..... | 82 |
| II-1-5-2 Biogéographie..... | 82 |
| II-1-5-3 Cycle biologique..... | 82 |
| II-1-6 <i>Rophildollfusium fractum</i> (Rudolphi, 1819)..... | 84 |
| II-1-6-1 Morpho-anatomie..... | 85 |
| II-1-6-2 Biogéographie..... | 85 |

| | |
|--|-----|
| II-1-6-3 Cycle biologique..... | 86 |
| II-1-7 <i>Rubenstrema exasperatum</i> (Rudolphi, 1819)..... | 87 |
| II-1-7-1 Morpho-anatomie..... | 88 |
| II-1-7-2 Biogéographie..... | 88 |
| II-1-7-3 Cycle biologique..... | 88 |
| II-2 Méthodologie..... | 90 |
| II-2-1 Méthodologie helminthologique..... | 90 |
| II-2-1-1 Extraction des helminthes..... | 90 |
| II-2-1-2 Fixation <i>in vivo</i> | 91 |
| II-2-1-3 Coloration et différentiation..... | 92 |
| II-2-1-4 Déshydratation..... | 93 |
| II-2-1-5 Montage entre lame et lamelle..... | 93 |
| II-2-1-6 Détermination spécifique..... | 93 |
| II-2-2 Protocole pour l'observation au microscope électronique à transmission (MET)..... | 94 |
| II-2-2-1 Fixation..... | 95 |
| II-2-2-2 Déshydratation et inclusion..... | 96 |
| II-2-2-3 Microtomie..... | 99 |
| II-2-2-4 Ultramicrotomie..... | 100 |
| II-2-2-5 Contraste et observation..... | 101 |
| II-2-2-6 Technique de Thiéry..... | 103 |
| II-2-3 Protocole pour l'observation au microscope électronique à balayage (MEB)..... | 104 |
| II-2-3-1 Fixation..... | 104 |
| II-2-3-2 Déshydratation et point critique..... | 106 |
| II-2-3-3 Montage et recouvrement..... | 107 |
| II-2-3-4 Observation..... | 107 |
| TROISIÈME CHAPITRE : RÉSULTATS | |
| III- Résultats..... | 111 |
| III-1 <i>Brachycoelium salamandrae</i> (Frölich, 1789) (Digenea : Brachycoeliidae) : étude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde..... | 113 |
| Résumé et mots clés..... | 113 |
| Article..... | 115 |
| III-2 Ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde de <i>Diplodiscus subclavatus</i> (Pallas, 1760) (Paramphistomoidea : Diplodiscidae), parasite intestinal de <i>Rana lessonae</i> (Amphibia : Anura)..... | 123 |
| Résumé et mots clés..... | 123 |
| Article..... | 125 |
| III-3 Caractères spermatologiques de <i>Elstia stossichianum</i> (Digenea : Mesometridae), parasite intestinal de <i>Sarpa salpa</i> de Dakar (Sénégal)..... | 137 |
| Résumé et mots clés..... | 137 |
| Article..... | 139 |

| | |
|--|-----|
| III-4 Ultrastructure du spermatozoïde de <i>Euryhelmis squamula</i> (Rudolphi, 1819) (Digenea : Opisthorchioidea : Heterophyidae), parasite intestinal de <i>Mustela vison</i> (Carnivora : Mustelidae)..... | 149 |
| Résumé et mots clés..... | 149 |
| Article..... | 151 |
| III-5 Spermiogenèse et spermatozoïde de <i>Mediogonimus jourdanei</i> (Microphalloidea : Prosthogonimidae), parasite de <i>Myodes glareolus</i> (Rodentia : Cricetidae)..... | 161 |
| Résumé et mots clés..... | 161 |
| Article..... | 163 |
| III-6 Ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde de <i>Robphildolfusium fractum</i> (Digenea : Gyliauchenidae), parasite intestinal de <i>Sarpa salpa</i> (Pisces : Teleostei)..... | 175 |
| Résumé et mots clés..... | 175 |
| Article..... | 177 |
| III-7 Caractères spermatologiques du digène <i>Rubenstrema exasperatum</i> (Rudolphi, 1819) (Plagiorchioidea : Omphalometridae)..... | 187 |
| Résumé et mots clés..... | 187 |
| Article..... | 189 |
| III-8 Ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde de <i>Wardula capitellata</i> (Digenea : Mesometridae), parasite intestinal du sparidé <i>Sarpa salpa</i> au Sénégal..... | 201 |
| Résumé et mots clés..... | 201 |
| Article..... | 203 |
| QUATRIÈME CHAPITRE : DISCUSSION | |
| IV- Discussion..... | 217 |
| IV-1 Analyse globale des données ultrastructurales de la spermiogenèse et du spermatozoïde des Digènes..... | 217 |
| IV-2 Particularités dans la spermiogenèse des espèces étudiées..... | 224 |
| IV-3 Particularités dans l'organisation ultrastructurale du spermatozoïde des espèces étudiées..... | 229 |
| IV-4 Principaux caractères ultrastructuraux d'intérêt phylogénétique..... | 240 |
| IV-5 Modélisation des spermatozoïdes chez les Digènes..... | 242 |
| CINQUIÈME CHAPITRE : CONCLUSIONS | |
| V- Conclusions..... | 253 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | |
| | 257 |

Contribution to the knowledge of spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon in the Digenea

Abstract

The present Thesis constitutes an important contribution to the knowledge of ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of digeneans. New spermatological data concerning eight species belonging to seven families and superfamilies of Digenea are presented. These species are *Brachycoelium salamandrae* (Gorgoderoidea: Brachycoeliidae), *Diplodiscus subclavatus* (Paramphistomoidea: Diplodiscidae), *Elstia stossichianum* and *Wardula capitellata* (Microscaphidioidea: Mesometridae), *Euryhelmis squamula* (Opisthorchioidea: Heterophyidae), *Mediogonimus jourdanei* (Microphalloidea: Prosthognomidae), *Robphildolfusium fractum* (Lepocreadioidea: Gyliauchenidae), and *Rubenstrema exasperatum* (Plagiorchioidea: Omphalometridae). The obtained results on spermiogenesis and/or the spermatozoon are compared with the available data on the remaining digeneans. Moreover, the importance of several ultrastructural characteristics is discussed in order to contribute to a better understanding of digenean phylogenetic relationships.

The process of spermiogenesis is quite homogeneous within the Digenea. However, some aspects such as the variability in the number of plates constituting the intercentriolar body and the angle of flagellar rotation are interesting features, which deserve particular attention.

After an accurate analysis of the available spermatological data, seven models of digenean spermatozoa are proposed. The most useful characteristics of the spermatozoon for the establishment of these models are: (i) the type of axoneme/es (9+'1' pattern of the Trepaxonemata, special 9+'1' and 9+0), (ii) the anterior spermatozoon extremity (one or two axonemes), (iii) the presence/absence of the association "lateral expansion+external ornamentations+cortical microtubules" or "external ornamentations+cortical microtubules", (iv) the presence or absence of external ornamentations and their location, (v) the pattern of cortical microtubules, either absent or distributed in one or two parallel fields, and (vi) the terminal character in the posterior spermatozoon extremity (nucleus, axoneme or cortical microtubules). Other characters such as the spinelike bodies or the newly described character "cytoplasmic ornamented buttons" can be of particular interest in certain taxa. In our opinion, the recent description of spinelike bodies entails a new look at some of the earliest studies, in which these characters could have been misinterpreted or considered artefacts. The cytoplasmic ornamented buttons are a new character found both in the mature spermatozoon

and during spermiogenesis of two mesometrids (*E. stossichianum* and *W. capitellata*). Another two mesometrids also exhibit this character and, thus, it is present in four out of the five genus of this family.

The spermatozoa of the studied species are included in the models 1, 2 or 3.

Model 1 is mainly characterized by the presence of the association “lateral expansion+external ornamentations+cortical microtubules”, being exhibited by *Diplodiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum* and *Wardula capitellata*. Moreover, most species belonging to the Echinostomatoidea, Paramphistomoidea and Pronocephaloidea also follow this model.

Model 2 is characterized by the association “external ornamentations+cortical microtubules” and by a posterior spermatozoon extremity containing the nucleus. It is present in *Brachycoelium salamandrae*, *Robphildolfusium fractum* and *Rubenstrema exasperatum*.

Finally, *Euryhelmis squamula* and *Mediogonimus jourdanei* present model 3 as occurs in the Opisthorchioidea and in some families such as: Allocreadiidae, Deropristidae, Lepocreadiidae and Troglotrematidae.

Model 3 differs from Model 2 in the posterior tip, containing the axoneme.

Model 4 is similar to models 2 and 3, but the posterior spermatozoon extremity contains only cortical microtubules. It is present in the families Opecoelidae and Opistholebetidae.

Model 5 exhibits a single field (ventral) of cortical microtubules and lacks the association “external ornamentations+cortical microtubules”. It is present in the Faustulidae, Hemiuridae and Lecithasteridae.

Model 6 is observed in schistosomes, with an aberrant spermatozoon, not filiform, with only an axoneme of the special 9+‘1’ pattern.

Finally, model 7 is established only for *Didymozoon* sp., being characterized by the presence of axonemes of the type 9+0 and by the absence of cortical microtubules.

Key words: Ultrastructure, TEM, SEM, Spermiogenesis, Spermatozoon, Taxonomy, Systematics, Phylogeny, Models of spermatozoa, Platyhelminthes, Digenea, *Brachycoelium salamandrae*, *Diplodiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum*, *Euryhelmis squamula*, *Mediogonimus jourdanei*, *Robphildolfusium fractum*, *Rubenstrema exasperatum*, *Wardula capitellata*, Gorgoderoidea, Lepocreadioidea, Microphalloidea, Microscaphidioidea, Opisthorchioidea, Paramphistomoidea, Plagiorchioidea, Brachycoeliidae, Diplodiscidae, Gyliauchenidae, Heterophyidae, Mesometridae, Omphalometridae, Prosthogonimidae.

Contribución al conocimiento de la ultraestructura de la espermiogénesis y del espermatozoide en los Digénidos

Palabras clave: Ultraestructura, MET, MEB, Espermiogénesis, Espermatozoide, Taxonomía, Sistemática, Filogenia, Modelos de espermatozoides, Platelmintos, Digenea, *Brachycoelium salamandrae*, *Diplodiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum*, *Euryhelmis squamula*, *Mediogonimus jourdanei*, *Robphildollfusium fractum*, *Rubenstrema exasperatum*, *Wardula capitellata*, Gorgoderoidea, Lepocreadioidea, Microphalloidea, Microscaphidioidea, Opisthorchioidea, Paramphistomoidea, Plagiorchioidea Brachycoeliidae, Diplodiscidae, Gyliauchenidae, Heterophyidae, Mesometridae, Omphalometridae, Prosthogonimidae.

Resumen

Introducción

La clasificación sistemática, la filogenia y la taxonomía de los Platelmintos, desde su inicio no ha dejado de ser un tema fascinante y lleno de controversias entre los distintos protagonistas implicados (taxonomistas, helmintólogos, etc.).

En los últimos años, la clasificación y la comprensión de la biodiversidad de los Platelmintos se hallan en un estado de revolución permanente, básicamente debido a los progresos en los estudios moleculares, a la utilización de los métodos cladísticos, en detrimento de la clasificación tradicional (basada únicamente en la morfología) y también a la incorporación de los caracteres ultraestructurales en general y espermatológicos en particular (Euzet *et al.*, 1981; Ehlers, 1984, 1985a, b, 1986; Świderski, 1986; Justine, 1991a, b, 1995, 1997, 1998a, b, c, 2001, 2003; Bâ & Marchand, 1995; Cribb *et al.*, 2001; Olson *et al.*, 2003; Levron *et al.*, 2010).

Hendelberg (1969), en los Turbellaria, fue uno de los primeros autores en proponer la incorporación de los caracteres ultraestructurales a los estudios filogenéticos. Quince años después, Ehlers (1984, 1985a, b, 1986) y algunos contemporáneos (Brooks *et al.* 1985; Brooks 1989a, b; Brooks & McLennan, 1993a, b)

establecieron un cladograma que marca “un antes” y un “después” en la historia de la utilización de los caracteres ultraestructurales. En este cladograma figura el taxón Trepaxonemata (Ehlers, 1984), término que significa “axonema torsionado” y hace referencia al aspecto, en secciones longitudinales, del elemento central de los axonemas de tipo 9+’1’ presentes en los espermatozoides de este grupo. Este tipo de axonema es sumamente importante, dado que sólo se ha visto en los Trepaxonemata, ya que en el espermatozoide de los demás Metazoos el patrón presente es el 9+2 clásico. Además, varios estudios inmunocitoquímicos han demostrado la ausencia de tubulina (presente en los microtúbulos centrales del patrón 9+2) en el elemento central de estos axonemas del patrón 9+’1’ (Iomini & Justine, 1997; Iomini *et al.*, 1997, 1998; Miquel & Marchand, 2001; Ndiaye *et al.*, 2003a).

Con posterioridad a los estudios pioneros mencionados con anterioridad, se han definido numerosas sinapomorfías (fusión próximo-distal, ausencia de mitocondria, presencia de microtúbulos corticales torsionados...) dentro de los Neodermata, en base a caracteres ultraestructurales de la espermiogénesis y/o del espermatozoide (Justine, 1991a, 1995, 1998a, 2001, 2003; Bâ & Marchand, 1995; Levron *et al.*, 2010). Así, este tipo de caracteres se han aplicado a diversos taxones y, en grupos como los Monogénidos o los Cestodos entre otros, la utilización de las fuentes espermatológicas es hoy en día incuestionable (Justine, 1991a, b, 1998a; Jamieson *et al.*, 1995; Hoberg *et al.*, 1997; Littlewood *et al.*, 1998; Littlewood & Bray, 2001; Olson *et al.*, 2001; Waeschenbach *et al.*, 2007, 2012; Levron *et al.*, 2010).

En el caso de los Trematodos y, particularmente de los Digénidos, la utilidad de estos caracteres no se ha puesto de manifiesto hasta la fecha, debido probablemente al escaso número de estudios espermatológicos ultraestructurales.

Los Trematodos constan de las subclases Aspidogastrea, pequeño grupo con 12 géneros (Rohde, 2002) y Digenea, que representa uno de los mayores grupos de Platelmintos parásitos, con alrededor de 18000 especies descritas, repartidas en más de 150 familias y casi 2500 géneros (Gibson *et al.*, 2002; Olson *et al.*, 2003). Los Digénidos incluyen importantes especies parásitas de interés económico y sanitario (clonorquiosis, dicroceliosis, esquistosomosis, fasciolosis, paragonimosis...).

Respecto a la comprensión de la evolución de los Digénidos, durante las últimas décadas se han producido muchos avances (Galaktionov & Dobrovolskij, 2003). No obstante, su clasificación interna sigue siendo confusa, laboriosa, compleja y objeto de muchas aproximaciones y controversias por parte de los sistemáticos y helmintólogos (véase Justine, 1997; Cribb *et al.*, 2001; Olson *et al.*, 2003).

Con la finalidad de establecer una sistemática y una filogenia más robustas, diversos autores (Iomini, 1998; Ndiaye, 2003; Levron, 2004; Quilichini, 2007) iniciaron la exploración de los caracteres ultraestructurales de la espermogénesis y del espermatozoide en los Digénidos, considerando la necesidad de promulgar la utilidad e integración de este tipo de caracteres, tal y como se ha efectuado en otros Platelmintos como los Cestodos (véase Levron *et al.*, 2010). Así, desde que se publicaron los primeros estudios en los años sesenta (Gresson & Perry, 1961; Sato *et al.*, 1967) hasta la actualidad, se ha estudiado la espermogénesis y/o el espermatozoide de numerosas especies de Digénidos.

En la presente Memoria, se aportan por primera vez, datos ultraestructurales referentes a la espermogénesis y/o el espermatozoide de ocho especies pertenecientes a siete familias de Digénidos distintas: *Brachycoelium salamandrae*, *Diplodiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum*, *Euryhelmis squamula*, *Mediogonimus jourdanei*, *Robphildolfusium fractum*, *Rubenstrema exasperatum* y *Wardula capitellata*.

Objetivos

La presente Tesis doctoral ha sido planificada con la finalidad de asumir los siguientes objetivos:

1. Incrementar la base de datos ultraestructurales de la espermogénesis y del espermatozoide en los Digénidos, explorando taxones no estudiados hasta la fecha. Para ello se ha abordado el análisis de ocho especies pertenecientes a siete familias y superfamilias diferentes.
2. Comparar nuestros resultados con los existentes en base a los estudios previos.
3. Valorar el interés filogenético de los caracteres espermátológicos ultraestructurales, efectuando un análisis global y comparado de dichos

caracteres candidatos para los análisis filogenéticos en los Digénidos.

4. Establecer unos modelos de espermatozoides en los Digénidos en base a caracteres ultraestructurales.

Material y métodos

A. Material

Las especies de Digénidos estudiadas en la presente Memoria pertenecen a siete familias y superfamilias distintas:

| Especie (superfamilia: familia) | Micro hábitat parasitario | Hospedador (procedencia) |
|---|------------------------------|---|
| <i>Brachycoelium salamandrae</i> (Gorgoderoidea: Brachycoeliidae) | Intestino | <i>Salamandra salamandra</i> (Santa Fe del Montseny, Barcelona, España) |
| <i>Diplodiscus subclavatus</i> (Paramphistomoidea: Diplodiscidae) | Intestino | <i>Rana lessonae</i> (Reserva Natural de Bugskiy, Brest, Bielorrusia) |
| <i>Elstia stossichianum</i> <i>Wardula capitellata</i> (Microscaphidioidea: Mesometridae) | Intestino | <i>Sarpa salpa</i> (playas de Ouakam, Soumbédioune y bahía de Hann, Dakar, Senegal) |
| <i>Euryhelmis squamula</i> (Opisthorchioidea: Heterophyidae) | Intestino | <i>Mustela vison</i> (Saint-Gor, Landes, Francia) |
| <i>Mediogonimus jourdanei</i> (Microphalloidea: Prosthogonimidae) | Hígado | <i>Myodes glareolus</i> (Reserva Natural de Py, Pirineos orientales, Francia) |
| <i>Robphildolfusium fractum</i> (Lepocreadioidea: Gyliauchenidae) | Intestino | <i>Sarpa salpa</i> (playas de Ouakam, Soumbédioune y bahía de Hann, Dakar, Senegal) |
| <i>Rubenstrema exasperatum</i> (Plagiorchioidea: Omphalometridae) | Intestino | <i>Sorex araneus</i> (Reserva Natural de Bugskiy, Brest, Bielorrusia) |

B. Métodos

a) Métodos helmintológicos

Abarcan todas las técnicas que van desde la extracción de los helmintos hasta su determinación específica al microscopio óptico. Los procedimientos utilizados siguen los métodos clásicos descritos en la literatura (Langeron, 1949a, b; Nesemeri & Hollo, 1961; Melvin & Brooke, 1971; Feliu, 1980; Montoliu, 1984; Casanova, 1993;

Miquel, 1993).

En esta Memoria, nos hemos limitado a exponer los procesos que hemos aplicado a las especies estudiadas. En primer lugar, tras la disección de los hospedadores, se han aislado en placas de Petri con suero fisiológico los distintos órganos (hígado, intestino, riñón, etc.) susceptibles de contener parásitos. Durante este proceso se emplea material quirúrgico habitual (bisturís, pinzas, pinceles, agujas enmangadas, tijeras...) y diversos reactivos para la fijación de los vermes hallados.

La fijación “*in vivo*” se ha efectuado en alcohol de 70° caliente agitando en un vial o con el líquido fijador de Bouin entre porta y cubreobjetos (usado principalmente para la obtención de buenos especímenes destinados a su posterior identificación).

La tinción, diferenciación y deshidratación son los siguientes pasos. Para la tinción se ha empleado como colorante el carmín acético de Semichon. A continuación los helmintos se pasan a alcohol de 70° para eliminar la coloración superficial, antes de su diferenciación con ácido clorhídrico. Una vez diferenciados, los ejemplares se vuelven a pasar a alcohol de 70° antes de deshidratarlos mediante pases sucesivos por una batería de alcoholes de lipofilia creciente.

El montaje y la determinación específica cierran el apartado de esta metodología helmintológica. La primera etapa se efectúa utilizando como medio de montaje el bálsamo de Canadá. La preparación resultante, debidamente etiquetada, se coloca en la estufa para facilitar la polimerización del medio. La segunda etapa consiste en la identificación específica, con la ayuda del microscopio óptico y la bibliografía pertinente.

b) Metodología para microscopía electrónica

Los Digénidos estudiados han sido procesados según los protocolos habituales para su observación al microscopio electrónico de transmisión o de barrido.

Para el estudio al microscopio electrónico de transmisión, parte de los ejemplares, aislados vivos, se fijan con glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato sódico 0,1 M a pH 7,4, durante un mínimo de 2 h a 4°C. Seguidamente, se realizan

diversos lavados (3 x 15 min) con tampón cacodilato, antes de efectuar una segunda fijación con tetróxido de osmio al 1% en el mismo tampón, durante 1 h a 4°C. Tras los lavados posteriores (3 x 15 min) con el tampón, se procede a la deshidratación del material mediante pasos sucesivos por etanoles de lipofilia creciente (15 min en etanol de 50°, 70°, 80°, 90°, 96° y dos pasos de 30 min en etanol absoluto) y, finalmente, durante 1 h en óxido de propileno, todos ellos a 4°C.

Posteriormente, se realiza la infiltración en “Spurr” (resina empleada en este estudio), utilizando el óxido de propileno como disolvente. Para ello, se somete la muestra a concentraciones crecientes de mezclas “Spurr : óxido de propileno” en las proporciones de 1:3 (2 h), 2:2 (3 h), 3:1 (3-4 h) y finalmente en resina pura (4-5 h y una noche).

Tras la polimerización de los bloques dentro de moldes de silicona conteniendo la muestra debidamente etiquetada (48-72 h en estufa a 60°C), se pasa a la realización de cortes semifinos para localizar las zonas de interés para el presente estudio (testículo y vesícula seminal).

Una vez localizada la zona, se realizan los cortes ultrafinos, que se depositan sobre rejillas de cobre o de oro, pudiendo recubrirlas con una membrana de Formvar en caso de que el material sea frágil.

Las rejillas se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo según la metodología de Reynolds (1963).

Usando rejillas de oro, se ha aplicado la técnica citoquímica de Thiéry (1967) para evidenciar el glicógeno, según el siguiente protocolo: 30 min en ácido peryódico al 10%, lavados con agua Milli-Q, 24 h en tiocarbohidracida, lavados en soluciones de ácido acético y agua Milli-Q, 30 min en proteinato de plata, lavados con agua Milli-Q y, finalmente, secado sobre papel de filtro.

Las rejillas contrastadas se observan al microscopio electrónico de transmisión, en nuestro caso dotado de un sistema de digitalización que nos permite obtener imágenes en formato “tiff”.

En el caso de la microscopía electrónica de barrido, ésta se ha aplicado a una única especie. Se deposita el Digénido vivo en una cápsula embrionaria con solución Tyrode y una vez localizada la vesícula seminal bajo la lupa, se procede a aislarla, se

trocea y se mantiene unos 10-15 min a 37°C para obtener los gametos aislados.

Seguidamente, se procede a la fijación con glutaraldehído al 8% en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4, manteniendo la relación de volúmenes “muestra : fijador” 1:3. Se agita suavemente a fin de homogeneizar el contenido y se deja durante un mínimo de 15 min a 4°C.

Posteriormente, se centrifuga la muestra entre 500 y 1000 rpm para obtener un “pellet” y se procede a la posfijación directamente con glutaraldehído al 2% durante un mínimo de 2 h a 4°C.

A continuación, se realizan varios lavados en tampón fosfato (3 x 5 min) y en agua MilliQ (4 x 5 min), todos ellos a 4°C.

Tras depositar 100 µl de la muestra previamente homogeneizada sobre un cubre con poli-L-lisina durante unos 20-30 min, se procede a la deshidratación con etanoles de lipofilia creciente (10 min en etanol de 50°, 70°, 80°, 90°, dos pasos de 10 min en etanol de 96° y tres pasos de 10 min en etanol absoluto).

Con posterioridad, se realiza el secado de la muestra mediante la técnica del punto crítico o utilizando hexametildisilazane.

Finalmente, se efectúa el montaje y el recubrimiento de la muestra con una capa de oro de aproximadamente 15-20 nm de grosor.

La muestra así preparada y debidamente etiquetada se mira al microscopio electrónico de barrido, operando a 15 kV de aceleración y a una distancia de trabajo de 4 mm. Dicho microscopio está también dotado de un sistema de digitalización que nos permite obtener imágenes en formato “tiff”.

Resultados

En este apartado se expone un resumen conciso de cada una de las publicaciones que constituyen los resultados de esta Memoria, citadas por orden alfabético de las especies y destacando los aspectos más relevantes.

1. Bakhoum A.J.S., Ribas A., Eira C., Bâ C.T. & Miquel J. (en prensa). *Brachycoelium salamandrae* (Frölich, 1789) (Digenea: Brachycoeliidae): estudio ultraestructural de la espermogénesis y del espermatozoide. *Zoologischer Anzeiger*.

Palabras clave: *Brachycoelium salamandrae*, Brachycoeliidae, Gorgoderoidea, Digenea, Espermogénesis, Espermatozoide, Ultraestructura

El presente estudio aporta los primeros datos espermáticos ultraestructurales en *Brachycoelium salamandrae*, Digénido perteneciente a la familia Brachycoeliidae, no estudiada hasta la fecha.

La espermogénesis se inicia con la formación de una zona de diferenciación en la base de cada espermávida. En esta zona, delimitada por microtúbulos corticales y por un anillo de membranas arqueadas, destaca la presencia de un par de centriolos asociados cada uno a una raíz estriada y separados por un cuerpo intercentriolar que exhibe siete bandas densas a los electrones. Además, presenta el núcleo y diversas mitocondrias. Los dos centriolos desarrollan los respectivos flagelos perpendicularmente a una expansión citoplasmática mediana, que se desarrolla a partir de la zona de diferenciación. Tras sufrir una rotación de 90° (rotación flagelar) hacia la expansión citoplasmática mediana, los flagelos se disponen paralelos a dicha expansión. Con posterioridad, se produce la fusión próximo-distal de ambos flagelos con la expansión mediana. En los estadios más avanzados de la espermogénesis empieza la constrictión del anillo de membranas arqueadas, que termina por la liberación del espermatozoide recién formado.

Durante la espermogénesis de *B. salamandrae*, y después de la fusión próximo-distal, se ha observado un cuerpo piriforme denso a los electrones, que aparece como elemento central de cada centriolo. Además, estos cuerpos piriformes parecen estar presentes sólo durante una fase determinada, puesto que no se observan posteriormente en el espermatozoide.

El espermatozoide de *B. salamandrae* presenta los caracteres ultraestructurales clásicos descritos en los Digénidos: dos axonemas del tipo 9+'1' característico de los platelmintos Trepaxonemata, núcleo, mitocondria, microtúbulos corticales paralelos y gránulos de glicógeno. Adicionalmente, destaca la presencia de ornamentaciones

externas, cuerpos espinosos y el hecho que las dos mitocondrias existentes se solapan en una cierta porción del espermatozoide. Atendiendo a la organización ultraestructural de estos caracteres a lo largo del espermatozoide, desde su extremidad anterior hasta la posterior, se pueden establecer tres regiones.

La región I constituye la extremidad anterior del espermatozoide y se caracteriza por contener un axonema en su zona proximal, seguido de la aparición del segundo axonema y de una capa continua y submembranosa de microtúbulos corticales alrededor de ambos axonemas. En zonas más distales se aprecian las ornamentaciones externas localizadas alrededor de uno de los axonemas e interrumpidas por cuerpos espinosos. En esta región, cabe destacar la primera mitocondria, presente desde la zona donde los dos axonemas ya están formados.

La región II se caracteriza por la presencia de esta primera mitocondria, por la disposición de los microtúbulos corticales en dos campos paralelos, delimitados cada uno por dos puntos de fusión y por la aparición de la segunda mitocondria en zonas distales, área donde las dos mitocondrias son paralelas. La transición entre las regiones II y III se produce por la finalización de la primera mitocondria.

La región III es la parte posterior del espermatozoide y corresponde a la región nuclear. En ella, progresivamente desaparecen hacia su extremo distal: (a) el primer axonema, (b) la segunda mitocondria, (c) los microtúbulos corticales y (d) el segundo axonema. Finalmente, sólo queda el núcleo y unos pocos gránulos de glicógeno en la extremidad posterior del espermatozoide.

2. Bakhoum A.J.S., Torres J., Shimalov V.V., Bâ C.T. & Miquel J. (2011). Ultraestructura de la espermogénesis y del espermatozoide de *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) (Paramphistomoidea: Diplodiscidae), parásito intestinal de *Rana lessonae* (Amphibia: Anura). *Parasitology International*, **60**(1): 64-74.

Palabras clave: *Diplodiscus subclavatus*, Diplodiscidae, Paramphistomoidea, Digenea, Espermogénesis, Espermatozoide, Ultraestructura

En este estudio se describe por primera vez la espermogénesis y la organización ultraestructural del espermatozoide de *Diplodiscus subclavatus*,

perteneciente a la familia Diplodiscidae, no estudiada hasta la fecha. Esta familia representa la cuarta analizada dentro de la superfamilia Paramphistomoidea, que consta de 12 familias (véase Jones, 2005).

La espermiogénesis en *D. subclavatus* se inicia con la formación de la típica zona de diferenciación, delimitada por microtúbulos corticales y por el anillo de membranas arqueadas. Además, esta zona de diferenciación contiene un núcleo, mitocondrias, dos centriolos con raíces estriadas asociadas y un cuerpo intercentriolar que exhibe siete bandas densas a los electrones. De cada centriolo se desarrolla un flagelo que crece ortogonalmente respecto a la expansión citoplasmática mediana que emerge de la zona de diferenciación. Posteriormente, tiene lugar la rotación flagelar y la fusión próximo-distal, que es asincrónica. Antes de que se produzca la fusión próximo-distal, se aprecia la migración del núcleo y de varias mitocondrias a lo largo de la expansión mediana, donde aparecen unos puntos de fusión que marcan la zona de fusión entre los tres procesos. Cabe señalar la aparición de cuerpos espinosos en la expansión citoplasmática mediana antes de la fusión. En fases finales de la espermiogénesis, el anillo de membranas arqueadas empieza su constricción. Durante los estadios iniciales de dicha constricción, las raíces estriadas todavía son visibles en la espermávida, mientras que en fases más avanzadas desaparecen, observándose aún la mitocondria en migración. Finalmente, el espermatozoide recién formado se desprende del citoplasma residual.

El espermatozoide de *D. suclavatus* presenta las estructuras espermatológicas clásicas descritas previamente en los Digénidos, como son los dos axonemas de distinta longitud y del tipo 9+1', el núcleo, la mitocondria, dos haces de microtúbulos corticales paralelos y los gránulos de glicógeno. Adicionalmente, el espermatozoide de *D. subclavatus* consta de una ornamentación externa de la membrana citoplasmática, de una expansión lateral bien desarrollada y de cuerpos espinosos. Todos estos caracteres ultraestructurales permiten considerar tres regiones.

La región I o extremidad anterior del espermatozoide, afilada en su punta, contiene sólo un axonema. En zonas más distales de la extremidad aparecen el segundo axonema, los microtúbulos corticales y la expansión lateral asociada a

ornamentaciones externas y cuerpos espinosos.

La región II se caracteriza por la presencia de la mitocondria, por la aparición de gránulos de glicógeno y, distalmente, por la presencia de la parte anterior del núcleo.

La región III se caracteriza por la presencia de la parte posterior del núcleo. En la parte mediana desaparece en primer lugar uno de los axonemas, dejando el otro acompañado del núcleo, de microtúbulos corticales y de gránulos de glicógeno. Cuando el segundo axonema desaparece, cerca de la extremidad posterior, sólo se observa la presencia del núcleo, un número muy reducido de microtúbulos corticales y unos pocos gránulos de glicógeno.

3. Bakhoum A.J.S., Ndiaye P.I., Bâ C.T. & Miquel J. (en prensa). Caracteres espermatológicos de *Elstia stossichianum* (Digenea: Mesometridae), parásito de *Sarpa salpa* en Dakar (Senegal). *Journal of Helminthology*.

Palabras clave: *Elstia stossichianum*, Mesometridae, Microscaphidioidea, Digenea, Espermiogénesis, Espermatozoide, Ultraestructura, Botones citoplasmáticos ornamentados

Este trabajo constituye el primer estudio espermatológico ultraestructural del género *Elstia*, uno de los cinco que forman la familia Mesometridae y de una segunda especie, *Elstia stossichianum*, de las ocho que se ubican en esta familia (véase Jones & Blair, 2005; Pérez-del Olmo *et al.*, 2006). Además de ampliar la base de datos ultraestructurales de los Digénidos, se comparan los caracteres ultraestructurales de *E. stossichianum* con los de *Wardula capitellata*, la otra especie de la familia Mesometridae estudiada en la presente Memoria (véase página 24).

La espermiogénesis en *E. stossichianum* es similar a la descrita para *W. capitellata* y para la mayoría de los Digénidos. Tal y como acontece en *W. capitellata*, se ha observado la presencia de los botones citoplasmáticos ornamentados después de la fusión próximo-distal de los flagelos con la expansión citoplasmática mediana. Además, durante la espermiogénesis de *E. stossichianum*, se ha podido describir la formación de estos botones. Durante las fases iniciales de su formación, los botones

aparecen como protuberancias debajo de membrana citoplasmática. Estas protuberancias aumentan en tamaño a medida que va madurando la espermátila, hasta adquirir su aspecto definitivo observado en el espermatozoide, con una reducción notable de la masa citoplasmática.

A diferencia de *W. capitellata*, durante las fases finales de la espermiogénesis de *E. stossichianum* (después de la fusión próximo-distal) se aprecia la presencia de una sola expansión citoplasmática y de unas prominencias densas a los electrones, localizadas a nivel del anillo de membranas arqueadas. Dichas prominencias aumentan de tamaño y finalmente, tras la constricción total del anillo de membranas arqueadas, dan lugar a una extremidad anterior del espermatozoide bifurcada.

En cuanto a la organización ultraestructural del espermatozoide, ésta es similar a la de *W. capitellata*. La comparación entre los espermatozoides de ambas especies permite remarcar los siguientes aspectos. Ambas tienen en común una extremidad anterior que contiene dos axonemas, una mitocondria, la presencia de al menos una expansión lateral, las ornamentaciones externas, los cuerpos espinosos y los botones citoplasmáticos ornamentados. En segundo lugar, en *E. stossichianum* se observa la extremidad anterior del espermatozoide bifurcada, aspecto no apreciado en *W. capitellata*. Finalmente, el espermatozoide de *E. stossichianum* presenta una sola expansión lateral y no dos, como se ha mencionado para *W. capitellata*.

4. Bakhoum A.J.S., Bâ C.T., Fournier-Chambrillon C., Torres J., Fournier P. & Miquel J. (2009). Ultraestructura del espermatozoide de *Euryhelmis squamula* (Rudolphi, 1819) (Digenea: Opisthorchioidea: Heterophyidae), parásito intestinal de *Mustela vison* (Carnivora: Mustelidae). *Revista Ibero-latinoamericana de Parasitología*, **68**(1): 37-45.

Palabras clave: *Euryhelmis squamula*, Heterophyidae, Opisthorchioidea, Digenea, Espermatozoide, Ultraestructura

En el presente estudio se describe la organización ultraestructural del espermatozoide de *Euryhelmis squamula*. Se trata del segundo estudio de un género perteneciente a la familia Heterophyidae y del octavo de la superfamilia

Opistorchioidea.

El espermatozoide de *E. squamula* se caracteriza por la presencia de dos axonemas del tipo 9+'1', de distinta longitud y que están desplazados uno respecto al otro. Además, presenta dos haces de microtúbulos corticales paralelos, tres mitocondrias, núcleo y gránulos de glicógeno. La localización de estos caracteres en el espermatozoide permite describir cinco regiones.

La región I constituye la extremidad anterior del espermatozoide y presenta un solo axonema en su extremo proximal. Posteriormente, aparece el segundo axonema y, a este nivel, ambos axonemas están rodeados por un haz continuo de microtúbulos corticales.

La región II exhibe en su parte anterior, además de las estructuras ya citadas en la región I, una ornamentación externa y dos mitocondrias paralelas. La parte distal de la región II presenta solamente dos axonemas, microtúbulos corticales y gránulos de glicógeno. Finalmente, aparece la tercera mitocondria.

La región III corresponde a la zona con presencia simultánea del núcleo y la tercera mitocondria. En esta región destaca la desaparición del primer axonema.

La región IV ostenta el núcleo, acompañado del segundo axonema, microtúbulos corticales y gránulos de glicógeno.

La región V o extremidad posterior del espermatozoide se caracteriza por presentar sólo el segundo axonema.

5. **Bakhoum A.J.S., Feliu C., Bâ C.T. & Miquel J. (2012).** Espermogénesis y espermatozoide de *Mediogonimus jourdanei* (Microphalloidea: Prosthogonimidae), parásito hepático de *Myodes glareolus* (Rodentia: Cricetidae). *Folia Parasitologica*, **59**(1): 32-42.

Palabras clave: *Mediogonimus jourdanei*, Prosthogonimidae, Microphalloidea, Digenea, Espermogénesis, Espermatozoide, Ultraestructura, MET, MEB.

El presente estudio aporta los primeros resultados ultraestructurales de la espermogénesis y del espermatozoide de *Mediogonimus jourdanei*, gracias a la utilización de la microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB).

La espermiogénesis en *M. jordanei* sigue el patrón general descrito en los Digénidos. Se inicia con la formación de la zona de diferenciación, rodeada por microtúbulos corticales y delimitada en su base por el anillo de membranas arqueadas. Esta zona de diferenciación contiene dos centriolos con raíces estriadas asociadas y separados por un cuerpo intercentriolar constituido por siete bandas densas a los electrones. Ambos centriolos generan un flagelo libre, que crece perpendicularmente a una expansión citoplasmática mediana. Posteriormente, se produce la rotación flagelar (de 90°) y la fusión próximo-distal, que es asincrónica. Finalmente, se produce la constricción del anillo de membranas arqueadas y la liberación del espermatozoide.

El espermatozoide de *M. jordanei* es filiforme, afilado en las dos extremidades y con una longitud de aproximadamente 260 µm, evaluada mediante MEB. Mediante MET se observan dos axonemas del tipo 9+‘1’, dos haces de microtúbulos corticales paralelos, el núcleo, una mitocondria, ornamentaciones externas, cuerpos espinosos y gránulos de glicógeno. La localización de dichos caracteres permite distinguir tres regiones diferentes en el espermatozoide.

En la región I se observa una extremidad apical afilada, que contiene los dos centriolos correspondientes a los dos axonemas rodeados por un haz continuo de microtúbulos corticales. En partes más distales aparece una ornamentación externa alrededor de sólo uno de los axonemas y también los cuerpos espinosos, de distribución irregular. La zona de transición hacia la región II se singulariza por la presencia de los dos axonemas, los dos haces de microtúbulos corticales y gránulos de glicógeno.

La región II se caracteriza por la presencia simultánea de la mitocondria y el núcleo, así como de otros caracteres como los dos axonemas, los microtúbulos corticales y los gránulos de glicógeno. En zonas más posteriores se observa la desorganización del primer axonema, seguido de la desaparición de la mitocondria, dejando sólo núcleo y axonema acompañados de un número reducido de microtúbulos corticales y gránulos de glicógeno.

La región III constituye la región posterior del espermatozoide. Progresivamente acontece: (a) la desaparición de los microtúbulos corticales, (b) la

desaparición del núcleo, cuyo extremo posterior se ha observado mediante MEB y (c) finalmente, cerca de la extremidad posterior, la desorganización del segundo axonema en dobletes y singuletes.

6. **Bakhoum A.J.S., Sène A., Ndiaye P.I., Bâ C.T. & Miquel J. (2012).** Ultraestructura de la espermiogénesis y del espermatozoide de *Robphildolfusium fractum* (Digenea: Gyliauchenidae), parásito intestinal de *Sarpa salpa* (Pisces: Teleostei). *Comptes Rendus Biologies*, 335(7): 435-444.

Palabras clave: *Robphildolfusium fractum*, Gyliauchenidae, Lepocreadioidea, Digenea, Espermiogénesis, Espermatozoide, Ultraestructura

La presente contribución constituye la primera descripción de la espermiogénesis y del espermatozoide del Gyliauchenidae *Robphildolfusium fractum* y la cuarta en la superfamilia Lepocreadioidea.

El inicio de la espermiogénesis se caracteriza por la formación de una zona de diferenciación que contiene dos centriolos asociados a raíces estriadas, un núcleo, mitocondrias y un cuerpo intercentriolar con siete bandas densas a los electrones. De cada centriolo se origina un flagelo libre, que crece de forma externa y perpendicular a la expansión citoplasmática mediana. Con posterioridad, dichos flagelos sufren una rotación de 90° para disponerse paralelos a la expansión mediana y fusionar con ella. Tras esta fusión próximo-distal, se inicia el proceso de estrangulamiento del anillo de membranas arqueadas, que culmina con la liberación del espermatozoide recién formado.

El espermatozoide de *R. fractum* presenta dos axonemas del tipo 9+'1', dos mitocondrias, dos campos de microtúbulos corticales paralelos, el núcleo, un material denso a los electrones (en la parte anterior del espermatozoide), un material piriforme denso a los electrones (como elemento central de los centriolos), ornamentaciones externas, cuerpos espinosos y gránulos de glicógeno. La distribución de estos caracteres permite establecer tres regiones en el espermatozoide.

La región I corresponde a la extremidad anterior del espermatozoide, cuya parte proximal contiene los dos centriolos, que presentan un material piriforme denso a los electrones como elemento central. Adicionalmente, existe otro tipo de material denso a los electrones, que aparece rodeando el segundo axonema. En partes medianas de la región I, cuando los axonemas están ya formados, se aprecian los dos campos de microtúbulos corticales y la aparición de los cuerpos espinosos. En la parte distal de la región I también se observan dichos cuerpos espinosos en asociación con ornamentaciones externas. En esta parte distal aparece la primera mitocondria y los gránulos de glicógeno.

La región II se caracteriza por la presencia de los dos axonemas y de la segunda mitocondria, situada entre la desaparición del primer axonema y la aparición del núcleo.

La región III o región nuclear constituye la extremidad posterior del espermatozoide. Tras la desaparición de los microtúbulos corticales y del segundo axonema, la extremidad posterior exhibe sólo el núcleo. Durante la desorganización del segundo axonema, cabe remarcar la particular disposición de los dobletes alrededor del núcleo.

7. Bakhoum A.J.S., Bâ C.T., Shimalov V.V., Torres J. & Miquel J. (2011). Caracteres espermatológicos del digénido *Rubenstrema exasperatum* (Rudolphi, 1819) (Plagiorchioidea: Omphalometridae). *Parasitology Research*, **108**(5): 1283-1293.

Palabras clave: *Rubenstrema exasperatum*, Omphalometridae, Plagiorchioidea, Digenea, Espermatiogénesis, Espermatozoide, Ultraestructura

El presente estudio supone la primera descripción de la espermatiogénesis y del espermatozoide de una especie perteneciente a la familia Omphalometridae, *Rubenstrema exasperatum*.

La espermatiogénesis en *R. exasperatum* se inicia con la formación de la típica zona de diferenciación observada en otros Digénidos. Esta zona, delimitada por una capa submembranosa de microtúbulos corticales y el anillo de membranas arqueadas en su base, contiene un par de centriolos asociados a raíces estriadas y separados por un

cuerpo intercentriolar que exhibe siete bandas densas a los electrones. Cada centriolo desarrolla un flagelo que crece ortogonalmente a una expansión citoplasmática mediana. Tras efectuar una rotación de 90°, los dos flagelos se disponen paralelamente a la expansión mediana, donde se observan en sus partes distales cuerpos espinosos. Antes de la fusión próximo-distal entre flagelos y expansión citoplasmática mediana se observa la migración mitocondrial con anterioridad a la nuclear, contrariamente a lo que suele ocurrir en la mayoría de los Digénidos. La fusión próximo-distal viene seguida de la constricción del anillo de membranas arqueadas, finalizando con la liberación del espermatozoide recién formado.

En el espermatozoide de *R. exasperatum* destaca la presencia de dos mitocondrias, ornamentaciones externas y cuerpos espinosos, junto con el resto caracteres clásicos de los Digénidos. La organización ultraestructural de estos caracteres permite distinguir tres regiones de la extremidad anterior a la posterior.

La región I constituye la extremidad anterior del espermatozoide, caracterizada por tener dos centriolos correspondientes a los dos axonemas del tipo 9+'1' y una capa de microtúbulos corticales ocupando casi todo el perímetro celular. Una vez formados los dos axonemas, dicha capa de microtúbulos se aprecia continua alrededor de los dos axonemas. En partes más distales de la región I se observa la primera mitocondria, las ornamentaciones externas con cuerpos espinosos insertados de forma irregular y los gránulos de glicógeno.

En la región II desaparecen las ornamentaciones externas y los cuerpos espinosos, observándose los dos axonemas, microtúbulos corticales y gránulos de glicógeno. La gran frecuencia de estos cortes justifica la longitud más o menos larga de esta zona y su consideración como una región.

La región III o región nuclear se caracteriza por la presencia del núcleo. En zonas anteriores de esta región se observa el núcleo, los dos axonemas, los microtúbulos corticales y gránulos de glicógeno. Con posterioridad, se aprecia la desorganización del primer axonema y la aparición de la segunda mitocondria, que acompaña el núcleo y el resto de caracteres citados en esta región. La parte posterior de la región III se caracteriza por tener sólo el núcleo, tras producirse primero la desorganización del segundo axonema y, posteriormente, la desaparición de los

microtúbulos corticales.

8. Bakhoum A.J.S., Ndiaye P.I., Sène A., Bâ C.T. & Miquel J. (2012). Estudio ultraestructural de la espermiogénesis y del espermatozoide de *Wardula capitellata* (Digenea: Mesometridae), parásito intestinal de *Sarpa salpa* en Senegal. *Acta Parasitologica*, 57(1): 34-45.

Palabras clave: *Wardula capitellata*, Mesometridae, Microscaphidioidea, Digenea, Espermiogénesis, Espermatozoide, Ultraestructura, Botones citoplasmáticos ornamentados.

El presente trabajo aporta los primeros datos espermatológicos ultraestructurales en la familia Mesometridae con el estudio de *Wardula capitellata*, incluida en uno de los cinco géneros de esta familia (*Centroderma*, *Elstia*, *Mesometra*, *Parawardula* y *Wardula* -véase Jones & Blair, 2005).

La espermiogénesis en *W. capitellata* sigue un proceso similar al descrito para los otros Digénidos. Se inicia con la formación de una zona de diferenciación que contiene los dos centriolos, asociados cada uno de ellos con una raíz estriada y separados por un cuerpo intercentriolar constituido por seis bandas densas a los electrones. Después de crecer ortogonalmente a la expansión citoplasmática mediana, los dos flagelos libres, generados por cada centriolo, efectúan una rotación para devenir paralelos a dicha expansión. Antes de la fusión próximo-distal se aprecia en zonas distales de la expansión citoplasmática mediana la presencia de cuerpos espinosos. Tras la fusión de los tres procesos, se inicia la constricción del anillo de membranas arqueadas que, una vez completada, conlleva la liberación del espermatozoide.

No obstante, durante la espermiogénesis de *W. capitellata* y, precisamente cuando los dos flagelos ya han fusionado con la expansión citoplasmática mediana, se han observado expansiones citoplasmáticas asociadas a ornamentaciones externas. En esta zona, aparecen también en la espermávida, unas estructuras que por su aspecto las hemos denominado botones citoplasmáticos ornamentados.

El espermatozoide de *W. capitellata* presenta dos axonemas del tipo 9+1', núcleo, una mitocondria, microtúbulos corticales y gránulos de glicógeno. Adicionalmente a estos caracteres, el espermatozoide ostenta dos expansiones laterales, ornamentaciones externas, cuerpos espinosos y los botones citoplasmáticos ornamentados, estructura observada por primera vez. En función de la organización de estos caracteres, se han establecido tres regiones en el espermatozoide de *W. capitellata*.

La región I o extremidad anterior del espermatozoide contiene en su parte proximal los centriolos de los dos axonemas situados casi al mismo nivel, las dos expansiones laterales en direcciones opuestas y los microtúbulos corticales, dispuestos submembranarmente de forma continua. En partes medianas de la región I aparecen los botones citoplasmáticos ornamentados, los microtúbulos corticales organizados en dos campos y los cuatro puntos de fusión. Con posterioridad, aparece otra zona ornamentada en el extremo distal de esta región I.

En cuanto a la región II o región mitocondrial, se observa la presencia simultánea de la única mitocondria y del núcleo, junto al resto de caracteres (axonemas, microtúbulos corticales y gránulos de glicógeno).

La región III, que corresponde a la extremidad posterior del espermatozoide, se caracteriza por presentar sólo el núcleo y gránulos de glicógeno, después de la desaparición de los axonemas y los microtúbulos corticales.

Discusión

Espermiogénesis

La espermiogénesis en las especies estudiadas en la presente Memoria, así como en la gran mayoría de Digénidos, a excepción de los Schistosomatidae y Didymozoidae (Justine & Mattei, 1982a, 1983, 1984a; Justine *et al.*, 1993; Pamplona-Basilio *et al.*, 2001), sigue unas pautas generales que se pueden esbozar en cinco etapas principales:

- Etapa 1: es la formación de la zona de diferenciación, delimitada por microtúbulos corticales en la periferia y por el anillo de membranas arqueadas en su base. En esta zona destacan el núcleo, diversas mitocondrias y los dos centriolos separados por un cuerpo intercentriolar y asociados cada uno a una raíz estriada.
- Etapa 2: corresponde al crecimiento de los dos flagelos generados por cada centriolo y a la elongación de una expansión citoplasmática mediana. La posterior rotación de los flagelos describe un ángulo de 90° o mayor de 90°, según las especies. Tras sufrir esta rotación, los flagelos se disponen paralelamente a la expansión mediana.
- Etapa 3: se caracteriza por la migración nuclear/mitocondrial o mitocondrial/nuclear, así como por la elongación de los microtúbulos corticales en la expansión citoplasmática mediana.
- Etapa 4: representa la fusión próximo-distal y asincrónica de los flagelos con la expansión citoplasmática mediana.
- Etapa 5: es la constricción del anillo de membranas arqueadas, dando lugar a la liberación del espermatozoide recién formado, que se desprende del citoplasma residual.

Este proceso de espermiogénesis no sólo es característico de los Digenea, sino también de los Cercoemeridea en general y fue establecido como una sinapomorfía para este grupo (Justine, 1991a).

A pesar de la gran homogeneidad en la espermiogénesis en los Digénidos, se pueden destacar algunos caracteres de interés filogenético.

En primer lugar, la rotación flagelar, habitualmente de 90°, tal y como acontece en todas las especies estudiadas en esta Memoria y en muchos otros Digénidos de diversas familias, como los Deropristidae (Foata *et al.*, 2007), Notocotylidae (Ndiaye *et al.*, 2003b), Opecoelidae (Miquel *et al.*, 2000; Levron *et al.*, 2004a) o Apocreadiidae (Kacem *et al.*, 2010a), entre otras. Además, dicha rotación de 90° se ha descrito en los Aspidogastrea (grupo hermano de los Digénidos) (véase Levron *et al.*, 2009). Sin embargo, otros Digénidos exhiben una rotación flagelar estimada de 120° [*Helicometra fasciata*, *Monorchis parvus* (Levron *et al.*, 2003, 2004b), *Fasciola hepatica* (Ndiaye *et al.*,

2003a) o *Dicrocoelium hospes* (Agostini *et al.*, 2005)] o mayor de 90° [*Crepidostomum metoecus* o *Nicolla wisniewskii* (Quilichini *et al.*, 2007a, b)]. El posible interés filogenético de la rotación flagelar se pone de manifiesto cuando se efectúa una comparación entre los Digénidos y los Cestodos. Como ya se ha mencionado anteriormente, esta rotación flagelar es de 90° en la mayoría de los Digénidos, mientras que en los Cestodos, Bâ & Marchand (1995) describieron cuatro tipos de espermiogénesis en base a distintos caracteres, entre ellos, una rotación flagelar de 90° o bien de 0° en las especies pertenecientes al grupo más evolucionado, los Cyclophyllidea. Con posterioridad a este último escrito, se han descrito ángulos de rotación flagelar intermedios (entre 0° y 90°) en varios Cestodos del orden Cyclophyllidea (Hidalgo *et al.*, 2000; Ndiaye *et al.*, 2003c; Miquel *et al.*, 2009; Yoneva *et al.*, 2010) y rotaciones flagelares superiores a 90° en Cestodos de órdenes basales, como los Caryophyllidea y Spathebothriidea (véase Bruňanská *et al.*, 2006; Miquel *et al.*, 2008). Así, en los Cestodos, la reducción progresiva del ángulo de rotación flagelar parece tener una cierta polaridad desde los grupos menos evolucionados a los más evolucionados.

Un razonamiento similar a la variación del ángulo de rotación flagelar se puede aplicar a la del cuerpo intercentriolar o, mejor dicho, al número de bandas densas a los electrones que lo constituyen. En los Aspidogastrea se han descrito cuerpos intercentriolares constituidos por 11 bandas (Rohde *et al.*, 1991; Watson & Rohde, 1995; Levron *et al.*, 2009). En los Digénidos, la variabilidad en el número de bandas oscila entre 9 y 5. Así, en *Cryptocotyle lingua* (Rees, 1979) o *Monorchis parvus* (Levron *et al.*, 2004b) el cuerpo intercentriolar presenta 9 bandas, en la mayoría de Digénidos y de especies estudiadas en esta Memoria (*Brachycoelium salamandrae*, *Diplosdiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum*, *Mediogonimus jourdanei*, *Rubenstrema exasperatum* y *Robphildolfusium fractum*) ostenta 7 bandas, en *Deropristis inflata* (Foata *et al.*, 2007) 6 bandas o en *Helicometra fasciata* (Levron *et al.*, 2003) 5 bandas. Respecto a los Cestodos, se han descrito cuerpos intercentriolares de 5, 3 ó 1 bandas, o simplemente su ausencia (véase Levron *et al.*, 2010; Marigo, 2011).

Los puntos de fusión o “attachment zones” (cuatro en total) representan otro carácter de gran importancia. Éstos aparecen durante la espermiogénesis y se

mantienen en el espermatozoide recién formado y maduro. Estos puntos marcarían el área de fusión entre los flagelos y la expansión citoplasmática mediana. En este sentido, los cortes con una capa continua submembranosa de microtúbulos corticales procederían de una zona no implicada en la fusión (la parte proximal o basal de la zona de diferenciación o de la espermávida) (véase Miquel *et al.*, 2006). En otros cortes se pueden apreciar sólo dos puntos de fusión, los cuales corresponderían a regiones anteriores de la espermávida madura o del espermatozoide, como se ha observado en *Mediogonimus jordanei* y otros Digénidos (véase Bâ *et al.*, 2011; Ndiaye *et al.*, 2012a). En este caso, la explicación sería que ambos flagelos no se han fusionado al mismo nivel con la expansión mediana. Otra explicación de la presencia de dos puntos de fusión en los cortes sería que provienen de la región posterior del espermatozoide, donde generalmente está presente el núcleo. En efecto, cuando uno de los dos axonemas se desorganiza en partes posteriores del espermatozoide, el otro axonema aparece con el núcleo en cortes exhibiendo solamente dos puntos de fusión. En estas zonas sólo se ha fusionado el segundo flagelo con la expansión mediana. Así, los puntos de fusión representan elementos importantes para una correcta interpretación de la organización ultraestructural del espermatozoide.

Los botones citoplasmáticos ornamentados se han descrito por primera vez en este estudio durante la espermiogénesis de los Digenea. Estos botones, observados en *Eltia stossichianum* y *Wardula capitellata*, se formarían después de la fusión de los flagelos con la expansión citoplasmática mediana, puesto que se han visualizado únicamente en cortes con los dos flagelos ya fusionados. Además, durante la espermiogénesis de *E. stossichianum* se ha podido observar su formación. Empiezan en forma de protuberancias submembranosas, que aumentan de tamaño a medida que madura la espermávida, antes de aparecer en su forma definitiva en el espermatozoide, donde se aprecia una reducción notable del contenido citoplasmático en los cortes con los botones citoplasmáticos ornamentados.

Espermatozoide

La morfología general del espermatozoide de *Brachycoelium salamandrae*, *Diplodiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum*, *Euryhelmis squamula*, *Mediogonimus jourdanei*, *Robphildollfusium fractum*, *Rubenstrema exasperatum* y *Wardula capitellata* es similar a la descrita en otros Digénidos (excepto en los Schistosomatidae y ciertos Didymozoidae), con la presencia de caracteres clásicos y constantes como: los dos axonemas del patrón 9+'1' de los Trepaxonemata (Ehlers, 1984), un núcleo, una o varias mitocondrias, microtúbulos corticales paralelos y gránulos de glicógeno. Además de estos caracteres, muchas otras estructuras, presentes o ausentes según las especies, y la variabilidad de las extremidades anterior y posterior del espermatozoide se apuntan como caracteres de interés filogenético.

Los microtúbulos corticales representan uno de estos caracteres de interés filogenético. Su presencia se ha señalado en la mayoría de las especies de Digénidos estudiadas, a excepción de *Didymozoon* sp. (Justine & Mattei, 1983, 1984a). Respecto a esta última, se observaron microtúbulos corticales durante la espermiogénesis, aunque el espermatozoide maduro carece de estas estructuras (véase Justine & Mattei, 1984a). Los espermatozoides de todas las especies estudiadas en la presente Memoria exhiben dos campos (dorsal y ventral) de microtúbulos corticales paralelos, como en la mayoría de los Digénidos (véase Miquel *et al.*, 2000, 2006; Ndiaye, 2003; Levron, 2004; Quilichini, 2007; etc.). No obstante, en algunas especies se ha descrito la presencia de un solo campo de microtúbulos corticales en el espermatozoide. Este es el caso del Faustulidae *Pronoprymna ventricosa* (Quilichini *et al.*, 2007c) y los Hemiuroidea *Gonapodasmius* sp., *Aponurus laguncula* y *Lecithocladium excisum* (Justine & Mattei, 1982a; Quilichini *et al.*, 2010a; Ndiaye *et al.*, en prensa). Además, en el espermatozoide de otro Hemiuroidea, *Parahemiurus merus* (observaciones personales no publicadas), se ha observado también un solo campo (ventral) de microtúbulos corticales.

La variabilidad en el número de microtúbulos corticales a lo largo del espermatozoide es también otro carácter que podría tener una importancia en filogenia en los Digénidos. Asimismo, la zona del espermatozoide que presenta el

mayor número de microtúbulos corticales puede variar según las especies. En el caso de espermatozoides con expansión lateral, el número máximo de microtúbulos se hallaría en zonas donde está la expansión, tal y como sucede en *Elstia stossichianum* (unos 44 microtúbulos), *Wardula capitellata* (unos 53), *Diplodiscus subclavatus* (unos 73), y en otros Digénidos como *Echinostoma caproni* (unos 45 -Iomini & Justine, 1997) o *Fasciola gigantica* (unos 44 -Ndiaye *et al.*, 2004). Por su parte, otros espermatozoides exhiben el máximo de microtúbulos corticales en cortes conteniendo los dos axonemas rodeados de una capa continua o casi continua de microtúbulos. Este es el caso de *Brachycoelium salamandrae* (unos 37 microtúbulos), *Euryhelmis squamula* (unos 28), *Mediogonimus jourdanei* (unos 40), *Rubenstrema exasperatum* (unos 34), y de otras especies como *Postorchigenes gymnesicus* (unos 36 -Gracenea *et al.*, 1997) o *Diphterostomum brusinae* (unos 39 -Levron *et al.*, 2004c). En otros Digénidos, el máximo de microtúbulos se describe en la cara ventral de los cortes de la zona mitocondrial. Este es el caso de *Opecoeloides furcatus* (unos 12 microtúbulos -Miquel *et al.*, 2000), *Nicolla testiobliquum* (unos 15 -Quilichini *et al.*, 2007d) o *Aphallus tubarium* (unos 8 -Foata *et al.*, 2012). De todo ello se deriva la complejidad en la evaluación del número de microtúbulos corticales.

La extremidad anterior del espermatozoide ofrece cierta variabilidad en los Digénidos. Algunas especies presentan sólo un axonema, como *Brachycoelium salamandrae*, *Diplodiscus subclavatus*, *Euryhelmis squamula*, *Robphildolfusium fractum* y la mayoría de Digénidos (véase Cifrian *et al.*, 1993; Ndiaye *et al.*, 2003a, 2004; Levron *et al.*, 2004c; Agostini *et al.*, 2005). En otros espermatozoides se ha observado la presencia de dos axonemas. Esta morfología ha sido citada para *Elstia stossichianum*, *Mediogonimus jourdanei*, *Rubenstrema exasperatum* y *Wardula capitellata*, a la vez que para *Haematoloechus* sp. (Justine & Mattei, 1982b), *Microphallus primas* (Castilho & Barandela, 1990) o *Pleurogonius truncatus* (Ndiaye *et al.*, 2012a), entre otras especies. En este tipo de extremidad anterior cabe destacar, en general, la presencia de una capa continua o casi continua de microtúbulos corticales o “microtúbulos corticales apicales”.

Por otra parte, en ciertos espermatozoides se ha revelado la presencia de un material denso a los electrones que aparece rodeando el segundo axonema. Ello se ha

observado en *Robphildolfusium fractum*, así como en *Holorchis micracanthum* (Bâ *et al.*, 2011), *Gyliauchen* sp. (Quilichini *et al.*, 2011a), *Cricocephalus albus* (Ndiaye *et al.*, 2011) e *Hypocreadium caputvadum* (Kacem *et al.*, 2012).

Las ornamentaciones externas representan otra particularidad observada en el espermatozoide de la mayoría de Digénidos. Estas ornamentaciones se han descrito en todas las especies estudiadas en la presente Memoria. En cuanto a la importancia filogenética de dichas ornamentaciones, Quilichini *et al.* (2007c) propusieron utilizarlas para clasificar los espermatozoides de los Digénidos, definiendo dos grupos. Con posterioridad, Quilichini *et al.* (2011a) añadieron un tercer grupo.

El primer grupo (grupo 1) se caracteriza por la presencia de ornamentaciones externas en las áreas más proximales del espermatozoide. El segundo grupo (grupo 2) alberga los espermatozoides cuyas ornamentaciones externas están situadas en áreas distales de la región anterior, donde generalmente se observa la presencia de una mitocondria. Respecto a tercer grupo (grupo 3), éste se caracteriza por la ausencia de ornamentaciones externas. Todas las especies abordadas en esta Memoria, a excepción de *Wardula capitellata*, se incluyen en el grupo 2. En el espermatozoide de esta última, las ornamentaciones externas están presentes en zonas proximales y distales. Por su parte, otros autores también han descrito este tipo de ornamentaciones, en *Neoapocreadium chabaudi* (Kacem *et al.*, 2010a), *Cricocephalus albus* (Ndiaye *et al.*, 2011) y *Pleurogonius truncatus* (Ndiaye *et al.*, 2012a). Así, se podría añadir un cuarto grupo a la clasificación propuesta por Quilichini *et al.* (2007c, 2011a).

Además de la localización de las ornamentaciones externas, en todas las especies estudiadas en esta Memoria destaca la asociación entre los microtúbulos corticales y las ornamentaciones externas. Sin embargo, cabe remarcar que en algunas especies se han observado las ornamentaciones externas en zonas que carecen de microtúbulos corticales. Este es el caso de *Pronoprymna ventricosa*, *Aponurus laguncula* y *Lecithocladium excisum* (Quilichini *et al.*, 2007c, 2010a; Ndiaye *et al.*, en prensa), así como de *Parahemiurus merus* (observaciones personales no publicadas).

Una particularidad presente en el espermatozoide de ciertas especies de Digénidos es la expansión lateral. Esta denominación puede variar según los estudios

y los autores. Así, en la literatura se encuentran nombres como expansión citoplasmática o expansión dorso-lateral para referirse a esta estructura. Las expansiones laterales descritas en la presente Memoria se caracterizan por ser unas prominencias (más o menos desarrolladas) que emergen más allá del plano formado por los dos axonemas y que están asociadas a microtúbulos corticales, ornamentaciones externas y, a veces, a cuerpos espinosos. La asociación “expansión lateral+ornamentaciones externas+microtúbulos corticales” así descrita, estaría presente en los espermatozoides de *Elstia stossichianum*, *Diplodiscus subclavatus* y *Wardula capitellata*. Además de estas especies, varios Digénidos exhiben esta asociación: *Echinostoma caproni*, *Fasciola hepatica*, *F. gigantica*, *Troglotrema acutum*, *Basidiodiscus ectorchis*, *Sandonia sudanensis*, *Paramphistomum microbothrium*, *Cotylophoron corylophorum* o *Carmyerius endopapillatus* (Iomini & Justine, 1997; Ndiaye *et al.*, 2003a, 2004; Miquel *et al.*, 2006; Ashour *et al.*, 2007; Seck *et al.*, 2007, 2008a, b), entre otros. Sin embargo, es importante mencionar que la expansión lateral, tal y como se ha descrito en esta Memoria, no se ha observado en otras especies como *Poracanthium furcatum*, *Helicometra epinepheli*, *H. fasciata* o *Holorchis micracanthum* (Levron *et al.*, 2003, 2004a; Bâ *et al.*, 2011; Quilichini *et al.*, 2011b). En éstas, propondríamos el término “dilatación citoplasmática” en lugar de expansión lateral, por no estar asociadas ni a microtúbulos corticales, ni a ornamentaciones externas. La presencia o ausencia de la asociación “expansión lateral+ornamentaciones externas+microtúbulos corticales” puede tener su importancia a distintos niveles taxonómicos y también en la elaboración de los modelos de espermatozoides en los Digénidos.

Recientemente, se ha descrito en varios espermatozoides los denominados cuerpos espinosos. Desde su primera descripción en *Opecoeloides furcatus* (Miquel *et al.*, 2000), muchos estudios posteriores han mencionado su presencia. De hecho, Miquel *et al.* (2006) sugirieron la posibilidad de una omisión o mala interpretación de estas estructuras en estudios previos. Respecto a las especies estudiadas en esta Memoria, los cuerpos espinosos han sido observados en todas ellas, con la excepción de *Euryhelmis squamula*. Sin embargo, se pueden destacar algunas particularidades. Así, *Brachycoelium salamandrae*, *Diplodiscus suclavatus*, *Elstia stossichianum*, *Mediogonimus jourdanei*, *Rubenstrema exasperatum* y *Wardula capitellata* exhiben

cuerpos espinosos en zonas ornamentadas, como en la mayoría de Digénidos que presentan estas estructuras (véase Ndiaye, 2003; Levron, 2004; Agostini *et al.*, 2005; Quilichini, 2007; Ternengo *et al.*, 2009; Foata *et al.*, 2012; Ndiaye *et al.*, 2012b). En el espermatozoide de *Rophildollfusium fractum* se observan los cuerpos espinosos, tanto en zonas ornamentadas como en no ornamentadas. La presencia de cuerpos espinosos en zonas no ornamentadas se ha mencionado, recientemente, en el espermatozoide de *Gyliauchen* sp. (Gyliauchenidae) (Quilichini *et al.*, 2011a) y de *Neoapocreadium chabaudi* (Apocreadiidae) (Kacem *et al.*, 2010a), pertenecientes a la superfamilia Lepocreadioidea. Cabe remarcar que, hasta la fecha, los cuerpos espinosos sólo se han descrito en el espermatozoide de los Digénidos, lo que confirma su importancia como carácter de interés filogenético.

Tal y como se ha mencionado durante la discusión referente a la espermogénesis, los botones citoplasmáticos ornamentados se describen, también por primera vez, en la región anterior del espermatozoide en *Elstia stossichianum* y *Wardula capitellata*. Dada la presencia de expansiones laterales en ambas especies, se podría opinar sobre una posible relación entre los botones y las expansiones. En *W. capitellata*, donde se aprecian dos expansiones laterales, se podría pensar que una reducción o degeneración de las expansiones daría lugar a los botones. Sin embargo, la observación de una única expansión en *E. stossichianum* y dos botones (como en *W. capitellata*), combinado con la observación de su formación durante la espermogénesis, representan argumentos sólidos para considerar estos botones citoplasmáticos ornamentados como estructuras independientes de las expansiones laterales. Además de estos dos géneros (*Elstia* y *Wardula*), los botones citoplasmáticos se han observado en un estudio preliminar en *Mesometra orbicularis* (Bakhoum & Miquel, 2011) y también en *Centroderma spinosissima* (observaciones personales no publicadas). Teniendo en cuenta que estos botones citoplasmáticos ornamentados se han observado, pues, en cuatro de los cinco géneros que forman la familia Mesometridae (*Centroderma*, *Elstia*, *Mesometra*, *Parawardula* y *Wardula*), cabe pensar que representarían un carácter importante para distinguir los Mesometridae de otros Digénidos. Sin embargo, sería importante el estudio del género restante (*Parawardula*), así como de representantes de la familia Microscaphididae (la más

cercana de los Mesometridae) para valorar si la presencia de este carácter se podría extender a nivel de superfamilia y considerar la presencia de este carácter como una autapomorfía para este grupo.

El número de mitocondrias es variable en los espermatozoides de los Digénidos y, actualmente, es complejo evaluar claramente el número exacto de mitocondrias. Sin embargo, lo aceptado por todos los autores es que al menos existe una mitocondria, en comparación con la ausencia de dicha estructura en los Ecestoda. Esta consideración explica la importancia de este carácter para la comprensión de la evolución de los Digénidos. En las especies estudiadas en esta Memoria se ha descrito una mitocondria en los espermatozoides de *Diplodiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum*, *Mediogonimus jourdanei* y *Wardula capitellata*, dos mitocondrias en *Brachycoelium salamandrae*, *Rubenstrema exasperatum* y *Robphildollfusium fractum*, y tres en caso del espermatozoide de *Euryhelmis squamula*. Además, la observación de dos mitocondrias paralelas y solapadas en los espermatozoides de *B. salamandrae* y *E. squamula*, como ya se mencionó en *Dicrocoelium hospes* (Agostini *et al.*, 2005), es una prueba irrefutable de la presencia de más de una mitocondria.

La extremidad posterior del espermatozoide en los Digénidos presenta una cierta variabilidad según las especies. Por ello, varios autores sostienen su importancia en filogenia (Levron, 2003; Agostini *et al.*, 2005; Miquel *et al.*, 2006; Quilichini *et al.*, 2010b; Foata *et al.*, 2012). Quilichini *et al.* (2010b) fueron los primeros en distinguir diversos tipos de extremidades posteriores en los espermatozoides de los Digénidos en base a la secuencia de desaparición de caracteres ultraestructurales hacia el extremo posterior. Así, distinguieron tres tipos de extremidades posteriores en los Digénidos. En cuanto la extremidad posterior de la especies abordadas en esta Memoria, se ha considerado solamente el último carácter ultraestructural presente, como en la mayoría de estudios (véase Miquel *et al.*, 2000, 2006; Ndiaye, 2003; Levron, 2004).

Sin embargo, en los dos casos, es decir, considerando secuencias de caracteres o caracteres terminales, se establecen tres tipos de morfologías:

- Espermatozoides caracterizados por la presencia del núcleo en la parte posterior del espermatozoide. Éste es el caso de *Brachycoelium salamandrae*, *Diplodiscus*

subclavatus, *Elstia stossichianum*, *Rubenstrema exasperatum*, *Robphildollfusium fractum* y *Wardula capitellata*, además de muchos otros Digénidos, como *Mesocoelium monas* (Iomini *et al.*, 1997), *Diphterostomum brusinae* (Levron *et al.*, 2004c), *Fasciola hepatica* (Ndiaye *et al.*, 2003a), *Dicrocoelium hospes* (Agostini *et al.*, 2005) o *Neoapocreadium chabaudi* (Kacem *et al.*, 2010a), entre otros.

- Espermatozoides que exhiben en su extremidad posterior un solo axonema. Éste es el caso de *Euryhelmis squamula* y *Mediogonimus jourdanei*, así como de otras especies como, por ejemplo, *Deropristis inflata*, *Notocotylus neyrai* o *Troglotrema acutum* (Ndiaye *et al.*, 2003b; Miquel *et al.*, 2006; Foata *et al.*, 2007). Cabe apuntar, en este tipo de morfología, la descripción en el espermatozoide de *Aponurus laguncula* (Quilichini *et al.*, 2010a) de una extremidad terminada por un axonema, pero conteniendo una mitocondria posterior al núcleo.
- Espermatozoides con microtúbulos corticales en su extremidad posterior. Esta morfología se ha descrito hasta la fecha en dos familias de Digénidos: los Opecoelidae (véase Miquel *et al.*, 2000; Levron *et al.*, 2004a; Quilichini *et al.*, 2007b, d, 2011b) y los Opistholebetidae (véase Quilichini *et al.*, 2010b).

Modelos de espermatozoides

En base a algunos de los caracteres o asociaciones de caracteres ultraestructurales analizados anteriormente, hemos establecido unos modelos de espermatozoides. Ciertos caracteres que presentan una gran variabilidad, como es el caso del número de mitocondrias o de microtúbulos a lo largo del espermatozoide, no se han utilizado. Otros caracteres, como los cuerpos espinosos y los botones citoplasmáticos ornamentados, no se han incorporado en los modelos debido a su reciente descripción. Así, los caracteres retenidos para establecer estos modelos son los siguientes:

- 1- El patrón de axonema, que puede ser del tipo 9+'1', 9+'1' especial o 9+0.
- 2- La extremidad anterior del espermatozoide, que puede contener uno o dos axonemas.

- 3- La asociación “expansión lateral+ornamentaciones externas+microtúbulos corticales” o “ornamentaciones externas+microtúbulos corticales” en el caso de la ausencia de expansión lateral.
- 4- La presencia/ausencia y, en su caso, la posición de las ornamentaciones en el espermatozoide (pertenencia al grupo 1, 2, 3 ó 4).
- 5- La presencia/ausencia de microtúbulos corticales y, en su caso, su distribución en uno o dos campos.
- 6- La morfología de la extremidad posterior del espermatozoide, que puede exhibir núcleo, axonema o microtúbulos corticales.

Considerando estos caracteres, hemos establecido siete modelos de espermatozoides para los Digénidos.

- El modelo 1 caracteriza los espermatozoides que exhiben: (a) uno o dos axonemas en su extremidad anterior, (b) la asociación “expansión lateral+ornamentaciones externas+microtúbulos corticales”, (c) dos campos de microtúbulos corticales paralelos, (d) ornamentaciones externas del grupo 2 ó 4, y, finalmente, (e) el núcleo en la extremidad posterior del espermatozoide. En este modelo figuran los espermatozoides descritos en *Diplosdiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum* y *Wardula capitellata*, así como los de otros Digénidos de las superfamilias Echinostomatoidea, Paramphistomoidea o Pronocephaloidea (véase Iomini & Justine, 1997; Ndiaye *et al.*, 2003a, 2004, 2012a; Seck *et al.*, 2008a, b).
- El modelo 2 incluye los espermatozoides que presentan: (a) uno o dos axonemas en su extremidad anterior, (b) la asociación “ornamentaciones externas+microtúbulos corticales”, (c) ornamentaciones externas generalmente del grupo 2, (d) dos campos paralelos de microtúbulos corticales y (e) una extremidad posterior con núcleo. De las especies abordadas en esta Memoria, *Brachycoelium salamandrae*, *Robphildolfusium fractum* y *Rubenstrema exasperatum* exhiben este modelo. Este modelo se observa también en el espermatozoide del Apocreadiidae *Neoapocreadium chabaudi* (Kacem *et al.*, 2010a), del Zoogonidae *Diphterostomum brusinae* (Levron *et al.*, 2004c) o del Plagiorchiidae *Enodiotrema reductum* (Ndiaye *et al.*, 2012b).

- El modelo 3 se caracteriza por ostentar: (a) uno o dos axonemas en su extremidad anterior, (b) la asociación “ornamentaciones externas+microtúbulos corticales”, (c) ornamentaciones externas del grupo 1, 2, 3 ó 4, (d) dos campos de microtúbulos corticales paralelos y (e) una extremidad posterior con axonema. Los espermatozoides de *Euryhelmis squamula* y *Mediogonimus jourdanei* presentan este modelo, así como los de otras especies pertenecientes a las familias Allocreadiidae (Quilichini *et al.*, 2007a), Deropristidae (Foata *et al.*, 2007), Lepocreadiidae (Bâ *et al.*, 2011) o Troglotrematidae (Miquel *et al.*, 2006), entre otras.
- El modelo 4 se caracteriza por la presencia de: (a) uno o dos axonemas en su extremidad anterior, (b) la asociación “ornamentaciones externas+microtúbulos corticales”, (c) ornamentaciones externas generalmente del grupo 2, (d) dos campos de microtúbulos corticales paralelos y (e) una extremidad posterior que se acaba con microtúbulos corticales. En la actualidad, solamente dos familias figuran en este modelo. Se trata de los Opecoelidae y los Opistholebetidae. A excepción de *Helicometra fasciata* (Levron *et al.*, 2003), todas la especies descritas en estas dos familias exhiben este modelo.
- El modelo 5 presenta varias particularidades respecto a los anteriores modelos. En primer lugar destaca la presencia de un solo axonema en la extremidad anterior y la ausencia de la asociación “ornamentaciones externas+microtúbulos corticales”, puesto que las ornamentaciones externas aparecen en zonas donde no están los microtúbulos corticales. Dichas ornamentaciones pertenecerían al grupo 1. Por otro lado, el modelo 5 exhibe un único campo de microtúbulos corticales y la extremidad posterior contiene un axonema. De los Digénidos estudiados hasta la fecha, solamente tres especies exhiben este modelo: el Faustulinidae *Pronoprymna ventricosa* (Quilichini *et al.*, 2007c), el Hemiuridae *Lecithocladium excisum* (Ndiaye *et al.*, en prensa) y el Lecithasteridae *Aponurus laguncula* (Quilichini *et al.*, 2010a). Además, otro Hemiuridae, *Parahemiurus merus* (observaciones personales no publicadas), presenta todos estos aspectos que caracterizan el modelo 5.

Cabe mencionar que todos los modelos presentados anteriormente, es decir del 1 al 5, exhiben los dos axonemas con el patrón 9+'1' típico de los platelmintos Trepaxonemata (Ehlers, 1984).

- El modelo 6 agrupa los espermatozoides de las especies del género *Schistosoma*. Todos los *Schistosoma* estudiados presentan un espermatozoide similar, cuya morfología "aberrante" ha sido detallada por Justine (1982, 1995, 2003) y Justine *et al.* (1993). El espermatozoide es piriforme y exhibe en su extremidad anterior un acúmulo de mitocondrias localizadas encima del núcleo. Se aprecian microtúbulos corticales alrededor del núcleo y del único axonema presente. Respecto a este último, se ha descrito como de tipo 9+'1' especial, diferente del 9+'1' de los Trepaxonemata por el aspecto del elemento central, poco denso a los electrones. Los espermatozoides del modelo 6 carecen de ornamentaciones externas (grupo 3) y tienen una extremidad posterior acabada con el único axonema.
- Finalmente, el modelo 7 está formado por el espermatozoide particular de una única especie: *Didymozoon* sp. (Justine & Mattei, 1983, 1984a). La extremidad anterior del espermatozoide presentaría dos axonemas del tipo 9+0 (no hay elemento central). Posteriormente a esta zona, se ha descrito la presencia de una mitocondria, núcleo y los dos axonemas. No se han observado microtúbulos corticales ni ornamentaciones externas (grupo 3). Por otro lado, no hemos podido valorar la morfología de la extremidad posterior del espermatozoide debido a que las únicas micrografías disponibles (núcleo y dos axonemas) no permiten establecer el último carácter ultraestructural.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta Memoria y el análisis global de los estudios ultraestructurales de la espermiogénesis y/o del espermatozoide en los Digénidos, nos ha permitido elaborar las siguientes conclusiones:

- 1- Se ha contribuido a la ampliación de la base de datos ultraestructurales en los Digénidos con el estudio de ocho especies (*Brachycoelium salamandrae*, *Diplodiscus*

subclavatus, Elstia stossichianum, Euryhelmis squamula, Mediogonimus jourdanei, Robphildolfusium fractum, Rubenstrema exasperatum y *Wardula capitellata*) pertenecientes a siete familias y siete superfamilias diferentes.

- 2- La espermiogénesis de las especies abordadas en esta Memoria sigue el patrón general ya descrito en la mayoría de los Digénidos, con la presencia de un cuerpo intercentriolar (constituido generalmente por siete bandas densas a los electrones) y de una rotación flagelar de 90°.
- 3- La variabilidad del ángulo de rotación flagelar, así como la del número de bandas del cuerpo intercentriolar se muestran como dos caracteres de interés filogenético, especialmente cuando se comparan los Digénidos con otros Neodermata, en particular los Aspidogastrea y los Cestoda.
- 4- El estudio de la espermiogénesis, aunque presenta cierta homogeneidad, permitiría, además de la descripción de estructuras de interés filogenético, la mejor comprensión de las estructuras que aparecen en el espermatozoide.
- 5- Los espermatozoides estudiados exhiben los elementos clásicos y constantes descritos en la mayoría de Digénidos: dos axonemas del tipo 9+'1' característico de los platelmintos Trepaxonemata, un núcleo, una o varias mitocondrias y microtúbulos corticales paralelos.
- 6- Diversos caracteres adicionales, también presentes en el espermatozoide, como las expansiones laterales, las ornamentaciones externas, los cuerpos espinosos y la variabilidad morfológica de las extremidades anterior y posterior, ofrecen un espectro de caracteres ultraestructurales interesantes para una mejor comprensión de la filogenia de los Trematodos en general y de los Digénidos en particular.
- 7- Los botones citoplasmáticos ornamentados constituyen un nuevo carácter descrito por primera vez en *Elstia stossichianum* y *Wardula capitellata*, especies pertenecientes a la familia Mesometridae.
- 8- El análisis minucioso de todos los caracteres, candidatos para análisis filogenéticos, nos permite establecer siete modelos de espermatozoides en los Digénidos, a pesar de que algunos estudios, considerados como incompletos, no han sido considerados.

- 9- Los espermatozoides de las especies *Diplosdicus subclavatus*, *Elstia stossichianum* y *Wardula capitellata* siguen el modelo 1. En el modelo 2 figuran los espermatozoides de *Brachycoelium salamandrae*, *Robphildolfusium fractum* y *Rubenstrema exasperatum*. En cuanto a las especies *Euryhelmis squamula* y *Mediogonimus jourdanei*, éstas presentan espermatozoides del modelo 3.
- 10- En el marco de la presente contribución, se apuntan diversas perspectivas de cara al futuro como investigaciones prioritarias:
 - (a) proseguir con este tipo de estudios para incrementar la base datos espermátologicos ultraestructurales en los Digénidos, abordando el análisis de los taxones inexplorados hasta la fecha;
 - (b) incrementar los esfuerzos para establecer una matriz de datos en base a caracteres ultraestructurales procedentes de la espermogénesis y/o del espermatozoide;
 - (c) incorporar dichos caracteres ultraestructurales, junto con el resto de datos, particularmente los moleculares, a las matrices para la elaboración de los árboles filogenéticos; y
 - (d) potenciar el estudio de la biología de la fecundación, con la finalidad de aportar información sobre el papel biológico de las diversas estructuras observadas en el espermatozoide.

PREMIER CHAPITRE :

INTRODUCTION

I- Introduction générale

Les Plathelminthes ou vers plats forment un Phylum ou un ensemble d'organismes présentant un type morphologique similaire. Ils font partie actuellement des Platyzoa formant avec les Trochozoa le groupe des Lophotrochozoa ou Lophotrochozoaires, qui est défini sur la base de données moléculaires (Aguinaldo *et al.*, 1997 ; Philippe *et al.*, 2005) et caractérisé par la présence de lophophores ou d'un cycle de développement passant par la forme larvaire de type trochophore. Cependant, la définition des Lophotrochozoa ne fait pas l'unanimité et est sujette à de nombreuses controverses (Bleidorn, 2008). En ce qui concerne le caractère monophylétique/polyphylétique des Plathelminthes, là aussi les opinions divergent. Bien que des synapomorphies soient élaborées à l'intérieur des clades Acoelomorpha, Catenulida, et Rhabditophora où se situent les Plathelminthes parasites, le manque de caractères « robustes », unissant ces clades majeurs, questionne la monophylie des Plathelminthes (Smith *et al.*, 1986). De ceci, découle l'éminente question de Baguñà & Riutort (2004), qui supporte le caractère polyphylétique des Plathelminthes : Pourquoi croire que les Plathelminthes sont monophylétiques, si on ne peut pas démontrer leur monophylie ?

Dans la classification traditionnelle des Plathelminthes figurent la classe des Turbellariés, des Monogènes, des Cestodes et des Trématodes. Ces trois dernières, à savoir les Monogènes (ecto-parasites), les Trématodes et Cestodes (endo-parasites) forment le groupe des Neodermata ou Plathelminthes parasites, qui se caractérisent par l'abandon du tégument larvaire et se singularisent par leur intérêt sanitaire, vétérinaire, économique et leur grande diversité.

Les Trématodes comprennent les Aspidogastres et les Digènes. Ces derniers, objet de notre étude, selon plusieurs auteurs, représentent l'un des groupes les plus importants d'endoparasites de Métazoaires en termes de nombre d'espèces décrites. Ainsi, la sous-classe Digenea comprend près de 18.000 espèces (Olson *et al.*, 2003) reparties en plus de 2.500 genres et 150 familles (Gibson *et al.*, 2002), contrairement aux Aspidogastres qui regroupent 12 genres (Rohde, 2002). De ce fait, dans plusieurs ouvrages, l'appellation de Trématode faisait référence aux Digènes (Galaktionov & Dobrovolskij, 2003). L'extraordinaire biodiversité des Digènes, combinée avec leur importance, sanitaire et vétérinaire (clonorchiose, fasciolose, dicrocoeliase, opisthorchiase, paragonimose, schistosomose...) et économique fait de cette sous-classe l'objet d'une attention particulière pour les helminthologues.

La compréhension de l'évolution et de la biodiversité des Digènes a reçu d'importantes avancées à ce jour. Cependant, leur classification interne reste compliquée, laborieuse, et est à l'origine de nombreuses controverses entre les systématiciens et taxonomistes.

Dans le souci d'une bonne compréhension et de l'élaboration de la phylogénie interne des Digènes, nous apportons à travers les études de l'ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde, une autre approche classificatrice.

Ainsi, à titre introductif, nous rappellerons brièvement l'intérêt de l'introduction des caractères ultrastructuraux dans la compréhension de la phylogénie des Digènes. Puis, nous tenterons de résumer les grandes lignes de l'histoire de la classification des Digènes, en mentionnant de façon succincte les différentes approches utilisées, en particulier celles moléculaires et ultrastructurales. Ensuite, nous ferons une actualisation sur l'état actuel des connaissances concernant les études ultrastructurales de la spermiogenèse et/ou du spermatozoïde chez les Digènes. Finalement, nous exposerons les objectifs de notre travail.

Dans un deuxième chapitre nous exposerons la « fiche technique » de chacune des espèces étudiées ainsi que les protocoles expérimentaux utilisés pour la préparation des dites espèces en vue de leur identification et ultérieure observation de leurs caractères spermatologiques au microscope électronique à transmission (MET) ou à balayage (MEB).

Au troisième chapitre nous présenterons les résultats obtenus sous forme de compilation des différentes publications qui ont été réalisées durant la préparation de ce Mémoire.

Dans la quatrième partie nous tenterons de résumer dans un tableau l'ensemble des caractères ultrastructuraux qui ont été utilisés et/ou proposés pour étayer la phylogénie des Digènes. De ceci, découlera une discussion globale de l'ensemble de nos résultats avec à l'appui une schématisation des modèles de spermatozoïdes qui pourraient s'appliquer aux Digènes.

Ensuite, pour clore ce Mémoire des conclusions qui découlent de l'analyse de tous les résultats seront présentées.

Et finalement, toute la bibliographie citée dans ce travail sera répertoriée dans la dernière partie de ce Mémoire.

I-1 Pourquoi les caractères ultrastructuraux ?

Durant ces dernières décennies, la classification chez les Plathelminthes en général et les Digènes en particulier a fait l'objet de profonds changements avec l'utilisation des méthodes cladistiques et l'apport des données moléculaires et ultrastructurales y comprises celles de la reproduction (spermio-génèse et spermatozoïde) (Justine, 1997 ; Cribb *et al.*, 2001 ; Olson *et al.*, 2003). De plus, l'ultrastructure de la spermio-génèse et du spermatozoïde constitue une source de caractères phylogénétiques, aujourd'hui universellement acceptés et utilisés régulièrement pour comprendre la phylogénie des Plathelminthes parasites ou Neodermata (Euzet *et al.*, 1981 ; Ehlers, 1984, 1985a, b, 1986 ; Świderski, 1986 ; Justine, 1991a, b, 1995, 1997, 1998a, b, c, 2001, 2003 ; Bâ & Marchand, 1995 ; Levron *et al.*, 2010).

Les caractères ultrastructuraux de la spermio-génèse et du spermatozoïde ont été considérés comme indépendants de la spécificité parasite-hôte (Justine, 1998a). En d'autres termes, le facteur hôte n'aurait pas d'influence sur la structure des spermatozoïdes chez les Plathelminthes. La portée d'une telle indépendance ferait que le spermatozoïde d'un trématode parasite d'une espèce de poisson, par exemple, serait identique au spermatozoïde de ce même trématode parasitant un autre hôte différent.

A cette spécificité, s'ajoute l'absence de fossilisation chez les Plathelminthes qui a poussé un grand nombre d'auteurs à étudier leur phylogénie par des critères morphologiques et/ou ultrastructuraux des espèces actuelles (Brooks *et al.*, 1989 ; Justine, 1991a ; Brooks & McLennan, 1993a ; Boeger & Kritsky, 1997).

En plus, Ehlers (1984) a établi par le biais des caractères ultrastructuraux, le taxon Trepaxonemata, terme qui signifie « axonème torsadé » (figure 1), faisant allusion à la structure hélicoïdale du cylindre central de l'axonème 9+'1', observée en coupe longitudinale au niveau des spermatozoïdes de ce groupe. La particularité de cette structure vient du fait qu'elle n'a été observée que chez ce taxon, contrairement aux spermatozoïdes des autres métazoaires qui présentent des axonèmes de type 9+2. De plus, il a été observé avec la réalisation de tests immunocytochimiques (Iomini & Justine, 1997 ; Iomini *et al.*, 1997, 1998 ; Miquel & Marchand, 2001 ; Ndiaye *et al.*, 2003a) que l'élément central de l'axonème de type 9+'1' ne renferme pas la tubuline, retrouvée dans les deux microtubules centraux des axonèmes de type 9+2. Par ailleurs, une coexistence des axonèmes de type 9+'1' des spermatozoïdes et de type 9+2 des cils des cellules somatiques et excrétrices a été observée

chez le même individu. Cette coexistence a été décrite comme unique dans son genre chez les Trepaxonemata.

Outre ces particularités, les Trématodes en général et les Digènes en particulier présentent une variabilité dans leurs caractères ultrastructuraux spermatologiques qui sont nombreux et informatifs, justifiant ainsi les propositions de leur utilisation pour comprendre leur phylogénie à l'image de celle d'un grand nombre de taxons des Plathelminthes (Justine, 1991a, b, 1998a ; Jamieson *et al.*, 1995 ; Hoberg *et al.*, 1997 ; Littlewood *et al.*, 1998 ; Littlewood & Bray, 2001 ; Olson *et al.*, 2001 ; Waeschenbach *et al.*, 2007, 2012 ; Levron *et al.*, 2010).

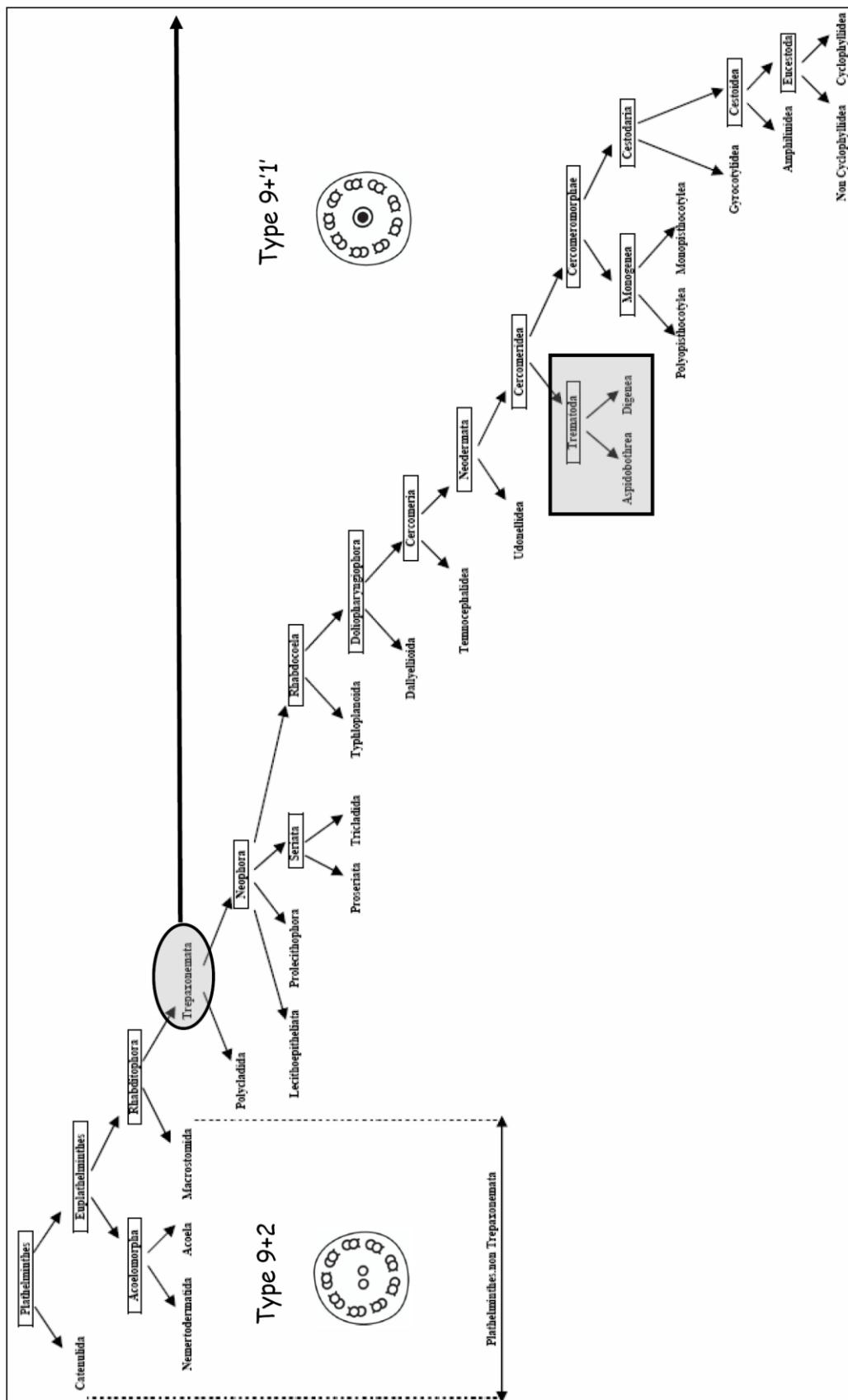


Figure 1. Schéma montrant les principaux groupes de Plathelminthes selon Ehlers (1984, 1985a, b, 1986, 1988), Brooks *et al.* (1985), Ax (1987) et Brooks (1989a, b). Les types 9+1' et 9+2 se réfèrent aux axonèmes ou flagelles des spermatozoïdes.

I-2 Histoire de la classification chez les Digènes

Le nom de « *Digenea* » fut utilisé pour la première fois par Carus en 1863 pour regrouper l'ensemble des espèces de la sous-classe du même nom appartenant à la classe des Trématodes. On ne saurait parler des Digènes sans mentionner leur cycle de vie, car le mot « *Digènes* » même fait référence à leur biologie et plus particulièrement à la présence d'une alternance de générations (sexuées et asexuées) au cours du cycle de vie. Les Digènes parasitent les Vertébrés en tant que hôte définitif, les Mollusques en tant que premier ou unique hôte intermédiaire et de nombreux autres groupes en tant que deuxième hôte intermédiaire (Olson *et al.*, 2003).

L'histoire de la classification des Digènes, à l'image de celle des Plathelminthes, fut et reste toujours un sujet fascinant et plein de retournements pour les helminthologues.

Jean de Brie en 1379 fut le premier à mentionner le terme de « *liver fluke* » (Digène du foie) et l'une des premières espèces décrites fut *Hirudinella ventricosa*, appelée autrefois *Hirudinella marina*. Linnaeus en 1758 décrivit deux espèces du genre *Fasciola*, dont seulement *Fasciola hepatica* a été retenue comme appartenant au *Digenea* (Cribb *et al.*, 2001).

Quant aux premières tentatives majeures de classifications, elles furent l'œuvre de van Beneden (1858) qui, en utilisant le cycle de vie caractéristique des Trematoda (nom introduit par Rudolphi en 1808), divisa ce groupe en deux clades majeurs dénommés « Monogénèses » et « Digénèses », initiant ainsi l'utilisation du cycle de vie dans la classification. Plus tard, Poche (1926) reconnaîtra deux groupes majeurs chez les Digènes à savoir, les Gasteronemata (incluant seulement la famille Bucephalidae) et les Prosostomata (regroupant le reste de Digènes). La Rue (1957) utilisa plusieurs des premiers stades de développement dans sa classification des Digènes soulignant l'importance de l'utilisation du cycle de vie dans la classification. Cependant, compte tenu de la complexité dans l'identification des différentes phases qui interviennent dans le cycle de vie des Digènes, réputé complexe, la classification résulte encore plus laborieuse avec plusieurs approximations et controverses. C'est ainsi que très vite, des auteurs comme Powell (1972, 1973, 1975) vont remettre en cause ces classifications basées uniquement sur les cycles et les données morphologiques.

Aujourd'hui, suite aux avancées technologiques, la classification des Digènes a connu un regain d'intérêt avec l'utilisation du cycle de vie, des caractères ultrastructuraux et des données moléculaires (Cribb *et al.*, 2001 ; Olson *et al.*, 2003 ; Bray *et al.*, 2009), et les

nombreuses propositions de l'incorporation des caractères ultrastructuraux originaires de la spermiogenèse et/ou du spermatozoïde (Miquel *et al.*, 2000 ; Ndiaye, 2003 ; Levron, 2004 ; Foata *et al.*, 2007 ; Quilichini, 2007).

I-2-1 Approches moléculaires dans la classification des Digènes

Les caractères moléculaires, « cadets » dans la classification, ont apportés d'importants changements dans la phylogénie des Digènes. Depuis leur entrée dans la classification, ils ont permis la confirmation de certaines questions, telle que celle de la monophylie des Trématodes avec les Aspidogastres comme groupe-frère des Digènes.

Cependant, pour ce qui est des relations internes entre les différents taxa ainsi que celles entre taxa d'échelles taxonomiques différentes, de nombreuses polytomies et incongruences sont apparues dans les arbres phylogénétiques.

Cribb *et al.* (2001) furent parmi les premiers à tenter l'utilisation d'un nombre important de données moléculaires combinées avec celles morphologiques. Ils étudièrent l' « *ssrDNA* » de 75 espèces de Digènes provenant de 55 familles, et 56 caractères morphologiques. Par la suite, le travail d'Olson *et al.* (2003) apporta encore plus de données (avec 170 taxa étudiés, provenant de 77 familles de Digènes et 3 d'Aspidogastres) en vue de bien estimer les relations phylogénétiques entre les Digènes. En plus de ces études, plusieurs auteurs ont tenté une phylogénie partielle des Digènes à différentes échelles taxonomiques (voir Tkach *et al.*, 2000, 2001 ; Bray *et al.*, 2009).

Cependant, la majorité de ces études moléculaires se confrontent à des manquements ou déficiences « *in toto* » rencontrés dans la plupart des arbres phylogénétiques. Il s'agit entre autres : (1) du nombre limité d'échantillons ; (2) de l'insuffisance du nombre de caractères due à l'utilisation de séquences partielles ; (3) du pourcentage inégal d'évolution moléculaire entre les différents taxa, donnant naissance à l'attraction des longues branches communément appelé « *Long Branch Attraction* » ou *LBA* d'après Felsenstein (1978) ; (4) de l'effet de la saturation des mutations ; ou (5) des modèles évolutifs utilisés (Baguñà & Riutort, 2004).

I-2-2 Approches ultrastructurales dans la classification des Digènes

Dans le souci de bien comprendre les relations internes entre les différents taxa chez les Plathelminthes en général et les Trématodes en particulier, plusieurs auteurs ont exploré le domaine de l'ultrastructure de la reproduction.

Les premiers à se lancer dans l'ultrastructure chez les Digènes furent Sato *et al.* (1967), chez *Paragonimus miyazakii*, mais c'est à Hendelberg (1969) que l'on doit la proposition de l'utilisation des caractères ultrastructuraux du spermatozoïde comme outils phylogénétiques. Quinze ans après les travaux de Hendelberg (1969), Ehlers (1984) publia la première véritable étude qui va incorporer les données ultrastructurales dans la classification et la taxonomie des Plathelminthes.

Les travaux de Ehlers (1984, 1985a, b, 1986), et ceux d'autres contemporains (Brooks *et al.*, 1985 ; Brooks, 1989a, b et Brooks & McLennan, 1993b) ont permis l'établissement d'un cladogramme (figure 1) qui marque un « avant » et un « après » dans l'histoire de l'utilisation des caractères ultrastructuraux de la reproduction en l'occurrence ceux de la spermiogenèse et du spermatozoïde.

Dans ce cladogramme dichotomique les Aspidogastres ensemble avec les Digènes forment le groupe des Trématodes. Ce regroupement est aujourd'hui accepté et confirmé par l'ensemble des études morphologiques (incluant les données ultrastructurales) et moléculaires (Littlewood *et al.*, 1999 ; Litvaitis & Rohde, 1999 ; Rohde, 2002).

Cependant, concernant la systématique interne des Digènes, à ce jour une approche phylogénétique basée sur les caractères ultrastructuraux de la spermiogenèse et/ou du spermatozoïde proprement dit n'a pas été élaborée.

I-3 État actuel des connaissances sur l'ultrastructure de la spermiogenèse et/ou du spermatozoïde des Digènes

Depuis les premières études dans les années 1960, environ une centaine de publications ont été effectuées concernant l'ultrastructure de la spermiogenèse et/ou du spermatozoïde chez les Digènes. Ainsi, après plus d'un demi-siècle, le bilan est « maigre » comparé au nombre d'espèces, de familles et de superfamilles encore inexplorées. Cependant, nous avons assisté ces vingt dernières années à une augmentation notable du nombre de publications faisant référence à l'étude ultrastructurale de la spermiogenèse et/ou du spermatozoïde chez les

Digènes, comme le montre la figure 2 où nous avons exprimé le nombre de publications en fonction d'un intervalle de dix ans allant de 1960 à nos jours.

De plus, au niveau du tableau 1 nous avons tenté de répertorier l'ensemble des espèces de Digènes dont la spermiogenèse et/ou le spermatozoïde ont été étudiés.

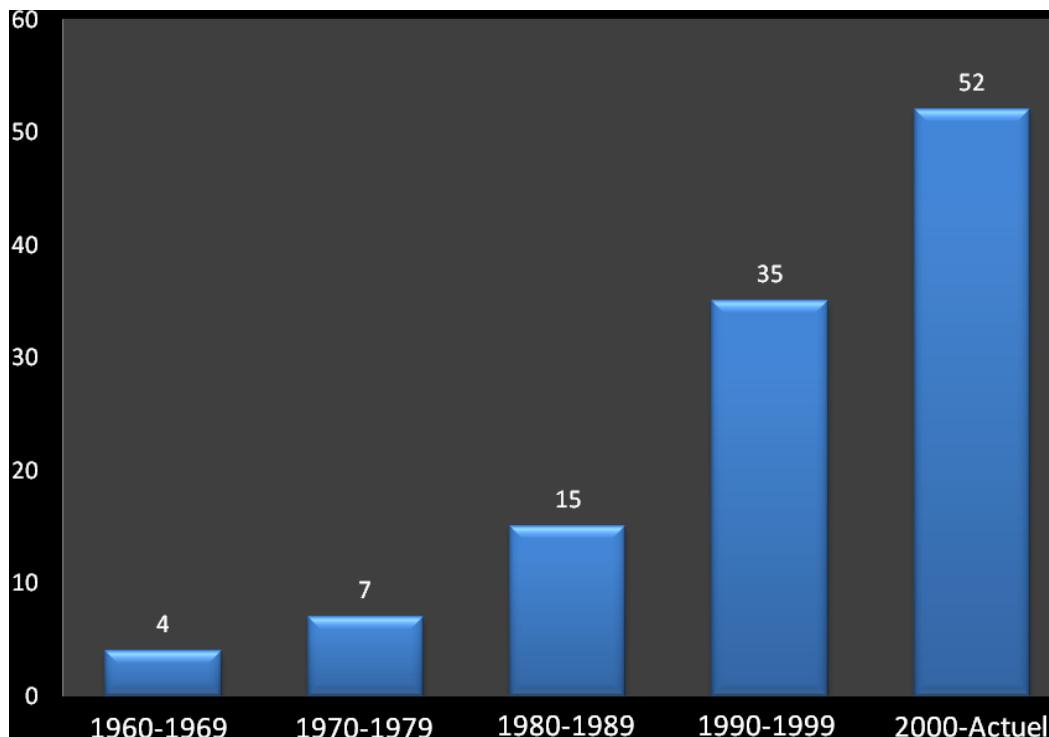


Figure 2. Evolution du nombre de publications chez les Digènes
sur un intervalle de 10 ans de 1960 à nos jours

Tableau 1. Digènes dont l'ultrastructure de la spermiogenèse et/ou du spermatozoïde est connue. Les espèces étudiées dans ce Mémoire sont surlignées en gris. Spg : spermiogenèse, Spz : spermatozoïde

| Taxa | | Études | | Références |
|--------------|---|--------|-----|---|
| | | Spg | Spz | |
| Règne | Animalia Linnaeus, 1758 | | | |
| Phylum | Plathelminthes (Schneider, 1873) | | | |
| Sous-phylum | Neodermata Ehlers, 1985 | | | |
| Classe | Trematoda Rudolphi, 1808 | | | |
| Sous-classe | Digenea Carus, 1863 | | | |
| Ordre | Echinostomida La Rue, 1957 | | | |
| Superfamille | Echinostomatoidea Looss, 1899 | | | |
| Famille | Echinostomatidae Looss, 1899 | | | |
| Sous-famille | Echinostomatinae Looss, 1899 | | | |
| Genre | <i>Echinostoma</i> Rudolphi, 1809 <i>Echinostoma caproni</i> (Richard, 1964) | + | + | Iomini & Justine (1997), Iomini (1998), Iomini <i>et al.</i> (1998), Justine <i>et al.</i> (1998), Justine (1999) Iomini <i>et al.</i> (1995) |
| | <i>Echinostoma liei</i> Jeyarasasingam, Heyneman, Lim & Mansour, 1972 | | | |
| | <i>Echinostoma togoensis</i> Jourdane & Kulo, 1978 | | + | Justine (1985, 1995) |
| Genre | <i>Hypoderaeum</i> Dietz, 1909 <i>Hypoderaeum conoideum</i> (Bloch, 1782) | | | Chen <i>et al.</i> (1996) |
| Famille | Fasciolidae Railliet, 1895 | | | |
| Sous-famille | Fasciolinae Railliet, 1895 | | | |
| Genre | <i>Fasciola</i> Linnaeus, 1758 <i>Fasciola gigantica</i> Cobbold, 1856 | + | + | Ndiaye <i>et al.</i> (2001, 2004), Ndiaye (2003), Miquel <i>et al.</i> (2004) |
| | <i>Fasciola hepatica</i> Linnaeus, 1758 | + | + | Gresson & Perry (1961), Stitt & Fairweather (1990, 1992), Stitt <i>et al.</i> (1991), Ndiaye (2003), Ndiaye <i>et al.</i> (2003a, d), Miquel <i>et al.</i> (2004) |
| | <i>Fasciola</i> sp. | | | Gong <i>et al.</i> (1992) |
| Superfamille | Haploporoidea Nicoll, 1914 | | | |
| Famille | Haploporidae Nicoll, 1914 | | | |
| Sous-famille | Chalcinotrematinae Overstreet & Curran, 2005 | | | |
| Genre | <i>Haploporus</i> Nicoll, 1914 <i>Haploporus benedenii</i> (Stossich, 1887) | + | | Sampour (2004) |
| Genre | <i>Saccocoelioides</i> Szidat, 1954 <i>Saccocoelioides godoyi</i> Kohn & Froes, 1986 | + | + | Baptista-Farias <i>et al.</i> (2001) |

Tableau 1 : suite

| Superfamille Microscaphidioidea Looss, 1900 | | | | | |
|---|--|---|---|---|--|
| Famille | Mesometridae Poche, 1926 | | | | |
| Genre | <i>Elstia</i> Bray, 1984 | + | + | Bakhoum & Miquel (2011), Bakhoum <i>et al.</i> (2011a, sous presse a) | |
| | <i>Elstia stossichianum</i> (Monticelli, 1892) | | | | |
| Genre | <i>Mesometra</i> Lühe, 1901 | | | Bakhoum & Miquel (2011) | |
| | <i>Mesometra brachycoelia</i> Lühe, 1901 | | + | | |
| Genre | <i>Wardula</i> Poche, 1926 | | + | Bakhoum & Miquel (2011), Bakhoum <i>et al.</i> (2012a) | |
| | <i>Wardula capitellata</i> (Rudolphi, 1819) | + | + | | |
| Superfamille Paramphistomoidea Fischhoeder, 1901 | | | | | |
| Famille | Cladorchidae Fischhoeder, 1901 | | | | |
| Sous-famille | <i>Sandoniinae</i> Ukoli, 1972 | | | | |
| Genre | <i>Basidioidiscus</i> Fischthal & Kuntz, 1959 | + | + | Ashour <i>et al.</i> (2007) | |
| | <i>Basidioidiscus ectorchis</i> Fischthal & Kuntz, 1959 (= <i>Basidioidiscus ectorchus</i>) | | | | |
| Genre | <i>Sandonia</i> McClelland, 1957 | | | | |
| | <i>Sandonia sudanensis</i> McClelland, 1957 | + | + | Ashour <i>et al.</i> (2007) | |
| Famille | Diplodiscidae Cohn, 1904 | | | | |
| Genre | <i>Diplodiscus</i> Diesing, 1836 | | | | |
| | <i>Diplodiscus subclavatus</i> (Pallas, 1760) | + | + | Bakhoum <i>et al.</i> (2009a, 2011b) | |
| Famille | Gastrothylacidae Stiles & Goldberger, 1910 | | | | |
| Genre | <i>Carmyerius</i> Stiles & Goldberger, 1910 | | | | |
| | <i>Carmyerius endopapillatus</i> (Dollfus, 1962) | + | + | Seck <i>et al.</i> (2008a) | |
| Genre | <i>Fischederius</i> Stiles & Goldberger, 1910 | | | | |
| | <i>Fischederius elongatus</i> (Poirier, 1883) | | | Liu <i>et al.</i> (1993) | |
| Famille | Paramphistomidae Fischhoeder, 1901 | | | | |
| Sous-famille | <i>Paramphistominae</i> Fischhoeder, 1901 | | | | |
| Genre | <i>Cotylophoron</i> Stiles & Goldberger, 1910 | + | + | Hershenov <i>et al.</i> (1966), Seck <i>et al.</i> (2008b) | |
| | <i>Cotylophoron corylophorum</i> (Fischhoeder, 1901) | | | | |
| Genre | <i>Orthocoelium</i> Stiles & Goldberger, 1910 (syn <i>Ceynocoyle</i> Näsmark, 1937) | | | | |
| | <i>Orthocoelium scoliocoelium</i> (Fischhoeder, 1904) (= <i>Ceylonocotyle scoliocoelium</i>) | + | | Li & Wang (1997), Swarnakar (2010) | |
| Genre | <i>Paramphistomum</i> Fischhoeder, 1901 | | | | |
| | <i>Paramphistomum microbothrium</i> (Fischhoeder, 1901) | + | + | Seck <i>et al.</i> (2007) | |
| Superfamille Pronocephaloidea Looss, 1899 | | | | | |
| Famille | Notocytidae Lühe, 1909 | | | | |
| Genre | <i>Notocotylus</i> Diesing, 1839 | + | + | Ndiaye (2002, 2003), Ndiaye <i>et al.</i> (2003b) | |
| | <i>Notocotylus neyrai</i> González Castro, 1945 | | | | |
| Genre | <i>Quinqueserialis</i> Skvortsov, 1935 | | | | |
| | <i>Quinqueserialis quinqueserialis</i> (Barker & Laughlin, 1911) | | | Wittrock (1976) | |

Tableau 1 : suite

| | | | | |
|--------------|--|---|---|--|
| Famille | Pronocephalidae Looss, 1899 | | | |
| Genre | <i>Cricocephalus</i> Looss, 1899 | | + | Ndiaye <i>et al.</i> (2011) |
| | <i>Cricocephalus albus</i> (Kuhl & van Hasselt, 1822) | | + | |
| Genre | <i>Pleurogonius</i> Looss, 1901 | | + | Ndiaye <i>et al.</i> (2012a) |
| | <i>Pleurogonius truncatus</i> Prudhoe, 1944 | | + | |
| Ordre | Plagiorchiida La Rue, 1957 | | | |
| Superfamille | Allocreadioidea Looss, 1902 | | | |
| Famille | Allocreadiidae Looss, 1902 | | | |
| Genre | <i>Crepidostomum</i> Braun, 1900 | | + | |
| | <i>Crepidostomum metoecus</i> (Braun, 1900) | + | + | Quilichini <i>et al.</i> (2007a) |
| Famille | Opecoelidae Ozaki, 1925 | | | |
| Sous-famille | <i>Opecoelinae</i> Ozaki, 1925 | | | |
| Genre | <i>Opecoeloides</i> Odhner, 1928 | | + | |
| | <i>Opecoeloides furcatus</i> (Bremser in Rudolphi, 1819) | + | + | Miquel & Marchand (2000), Miquel <i>et al.</i> (2000) |
| Genre | <i>Poracanthium</i> Dollfus, 1948 | | + | |
| | <i>Poracanthium furcatum</i> Dollfus, 1948 | + | + | Levron <i>et al.</i> (2004a) |
| Sous-famille | <i>Plagioporinae</i> Manter, 1947 | | | |
| Genre | <i>Helicometra</i> Odhner, 1902 | | + | |
| | <i>Helicometra epinepheli</i> Yamaguti, 1934 | + | + | Quilichini <i>et al.</i> (2011b) |
| | <i>Helicometra fasciata</i> (Rudolphi, 1819) | + | + | Levron <i>et al.</i> (2003) |
| Genre | <i>Nicolla</i> Wisniewski, 1933 | | + | |
| | <i>Nicolla testiobliquum</i> (Wisniewski, 1932) | + | + | Quilichini <i>et al.</i> (2007d) |
| | <i>Nicolla wisniewskii</i> (Slusarski, 1958) | + | + | Quilichini <i>et al.</i> (2007b) |
| Genre | <i>Podocotyle</i> (Dujardin, 1845) | | + | |
| | <i>Podocotyle</i> sp. | | + | Gibson (1971) |
| Famille | Opistholebetidae Fukui, 1929 | | | |
| Genre | <i>Heterolebes</i> Ozaki, 1935 | | + | |
| | <i>Heterolebes maculosus</i> Ozaki, 1935 | + | | Quilichini <i>et al.</i> (2010b) |
| Superfamille | Gorgoderoidea Looss, 1899 | | | |
| Famille | Brachycoeliidae Looss, 1899 | | | |
| Genre | <i>Brachycoelium</i> Dujardin, 1845 | | + | |
| | <i>Brachycoelium salamandrae</i> (Frölich, 1789) | + | + | Martínez (2012), Bakhoum <i>et al.</i> (sous presse b) |
| Famille | Collyriclidae Ward, 1917 | | | |
| Genre | <i>Collyricloides</i> Vaucher, 1969 | | + | |
| | <i>Collyricloides massanae</i> Vaucher, 1969 | | + | Justine (1985) |
| Famille | Dicrocoeliidae Looss, 1899 | | | |
| Sous-famille | <i>Dicrocoeliinae</i> Looss, 1899 | | | |
| Genre | <i>Corrigia</i> Shtrom, 1940 | | + | |
| | <i>Corrigia vitta</i> (Dujardin, 1845) | + | + | Robinson & Halton (1982) |
| Genre | <i>Dicrocoelium</i> Dujardin, 1845 | | + | |
| | <i>Dicrocoelium chinensis</i> Sudarikov & Ryjikov, 1951 | + | + | Tang (1996), Tang & Li (1996) |
| | <i>Dicrocoelium dendriticum</i> (Rudolphi, 1819) | + | + | Morseth (1969), Cifrian <i>et al.</i> (1993) |
| Sous-famille | <i>Dicrocoelium hospes</i> Looss, 1907 | + | + | Agostini <i>et al.</i> (2004, 2005) |
| Genre | <i>Leipertermatinae</i> Yamaguti, 1958 | | | |
| | <i>Eurytrema</i> Looss, 1907 | | + | |
| | <i>Eurytrema pancreaticum</i> (Janson, 1889) | | + | Fujino <i>et al.</i> (1977) |

Tableau 1 : suite

| | | | | |
|--------------|---|---|---|--|
| Famille | Gorgoderidae Looss, 1899 | | | |
| Sous-famille | <i>Gorgoderinae</i> Looss, 1899 | | | |
| Genre | <i>Gorgodera</i> Looss, 1899 <i>Gorgodera amplicava</i> Looss, 1899 <i>Gorgodera</i> sp. | | | Hershenov <i>et al.</i> (1966) Iomini <i>et al.</i> (1995), Iomini (1998) |
| Famille | Mesocoeliidae Dollfus, 1929 | | | |
| Genre | <i>Mesocoelium</i> Odhner, 1910 <i>Mesocoelium monas</i> Rudolphi, 1819 | + | + | Iomini <i>et al.</i> (1997), Iomini (1998) |
| Famille | Paragonimidae Dollfus, 1939 | | | |
| Genre | <i>Paragonimus</i> Braun, 1899 <i>Paragonimus miyazakii</i> Kamo, Nishida, Hatsushika & Tomimura, 1961 <i>Paragonimus ohrnai</i> Miyazaki, 1939 <i>Paragonimus pulmonalis</i> (Baelz, 1880) <i>Paragonimus westermani</i> (Kerbert, 1878) <i>Paragonimus</i> sp. | | | Sato <i>et al.</i> (1967) Fujino <i>et al.</i> (1977), Orido (1988), Hirai & Tada (1991) Fujino & Ishii (1982) Zhao & Huang (1989) Mehlhorn (1988) |
| Famille | Troglotrematidae Odhner, 1914 | | | |
| Genre | <i>Troglotrema</i> Odhner, 1914 <i>Troglotrema acutum</i> (Leuckart, 1842) | + | + | Miquel <i>et al.</i> (2006) |
| Superfamille | Lepocreadioidea Odhner, 1905 | | | |
| Famille | Apocreadiidae Skrjabin, 1942 | | | |
| Sous-famille | <i>Apocreadiinae</i> Skrjabin, 1942 | | | |
| Genre | <i>Neoapocreadium</i> Siddiqi & Cable, 1960 <i>Neoapocreadium chabaudi</i> Kohn & Fernandes, 1982 | + | + | Bakhoum <i>et al.</i> (2010a), Kacem <i>et al.</i> (2010a, b) |
| Famille | Deropristidae Cable & Hunninen, 1942 | | | |
| Genre | <i>Deropristis</i> Odhner, 1902 <i>Deropristis inflata</i> (Molin, 1859) | + | + | Foata <i>et al.</i> (2007) |
| Famille | Gyliauchenidae Fukui, 1929 | | | |
| Sous-famille | <i>Gyliaucheninae</i> Fukui, 1929 | | | |
| Genre | <i>Gyliauchen</i> Nicoll, 1915 <i>Gyliauchen</i> sp. | | | Quilichini <i>et al.</i> (2011a) |
| Sous-famille | <i>Robphildolfusiinae</i> Paggi & Orecchia, 1963 | | | |
| Genre | <i>Robphildolfusium</i> Paggi & Orecchia, 1963 <i>Robphildolfusium fractum</i> (Rudolphi, 1819) | + | + | Bakhoum <i>et al.</i> (2012b) |
| Famille | Lepocreadiidae Odhner, 1905 | | | |
| Sous-famille | <i>Lepidapedinae</i> Yamaguti, 1958 | | | |
| Genre | <i>Holorchis</i> Stossich, 1901 <i>Holorchis micracanthum</i> (Stossich, 1888) | | | Bâ <i>et al.</i> (2011) |
| Sous-famille | <i>Lepocreadiinae</i> Odhner, 1905 | | | |
| Genre | <i>Hypocreadium</i> Ozaki, 1936 <i>Hypocreadium caputvadum</i> Kacem, Derbel & Neifar, 2011 | | | Kacem <i>et al.</i> (2012) |

Tableau 1 : suite

| Superfamille | Microphalloidea Ward, 1901 | | | |
|--------------|--|---|---|--|
| Famille | Faustulidae Poche, 1926 | | | |
| Genre | <i>Pronoprymna</i> Poche, 1926 | | | |
| | <i>Pronoprymna ventricosa</i> (Rudolphi, 1819) | + | | Quilichini <i>et al.</i> (2007c) |
| Famille | Gyrabascidae Macy, 1935 | | | |
| Genre | <i>Allassogonoporus</i> Olivier, 1938 | | | |
| | <i>Allassogonoporus amphoraeformis</i> (Mödlinger, 1930) | | | Podvyaznaya (1996) |
| Famille | Lecithodendriidae Lühe, 1901 | | | |
| Genre | <i>Ganeo</i> Klein, 1905 | | | |
| | <i>Ganeo tigrinum</i> Mehra & Negi, 1928 | + | | Sharma & Rai (1995) |
| Genre | <i>Pycnoporus</i> Looss, 1899 | | | |
| | <i>Pycnoporus magnoporus</i> Kung, 1964 | | | Liu <i>et al.</i> (1993) |
| Famille | Microphallidae Ward, 1901 | | | |
| Sous-famille | <i>Gynaecotylinae</i> Guschanskaya, 1952 | | | |
| Genre | <i>Gynaecotyla</i> Yamaguti, 1939 | | | |
| | <i>Gynaecotyla adunca</i> (Linton, 1905) | | | Coil (1990) |
| Sous-famille | <i>Maritrematinae</i> Nicoll, 1907 | | | |
| Genre | <i>Maritrema</i> Nicoll, 1907 | + | + | Hendow & James (1988) |
| | <i>Maritrema linguilla</i> Jägerskiöld, 1908 | | | |
| Sous-famille | <i>Microphallinae</i> Ward, 1901 | | | |
| Genre | <i>Microphallus</i> Cable, Connor & Balling, 1960 | + | + | Castilho & Barandela (1990) |
| | <i>Microphallus primas</i> (Jägerskiöld, 1908) | | | Davies (1975) |
| | <i>Microphallus similis</i> (Jägerskiöld, 1900) | | | |
| Famille | Phaneropsidae Mehra, 1935 | | | |
| Genre | <i>Postorchigenes</i> Tubangui, 1928 | | | |
| | <i>Postorchigenes gymnesicus</i> Mas-Coma, Bargues & Esteban, 1981 | + | + | Gracenea <i>et al.</i> (1997) |
| Famille | Prosthogonimidae Lühe, 1909 | | | |
| Genre | <i>Mediogonimus</i> Woodhead & Malewitz, 1936 | | | |
| | <i>Mediogonimus jourdanei</i> Mas-Coma & Rocamora, 1978 | + | + | Bakhoum (2010), Bakhoum <i>et al.</i> (2010b, 2012c) |
| Famille | Zoogonidae Odhner, 1902 | | | |
| Sous-famille | <i>Zoogoninae</i> Odhner, 1902 | | | |
| Genre | <i>Diphterostomum</i> Stossich, 1903 | | | |
| | <i>Diphterostomum brusinae</i> (Stossich, 1888) | + | + | Levron <i>et al.</i> (2004c) |
| Superfamille | Monorchioidea Odhner, 1911 | | | |
| Famille | Monochiidae Odhner, 1911 | | | |
| Sous-famille | <i>Monochiinae</i> Odhner, 1911 | | | |
| Genre | <i>Monorchis</i> Looss, 1902 | + | + | Levron <i>et al.</i> (2004b) |
| | <i>Monorchis parvus</i> Looss, 1902 | | | |

Tableau 1 : suite

| Superfamille | Opisthorchioidea Looss, 1899 | | | |
|--------------|---|---|---|---|
| Famille | Cryptogonimidae Ward, 1917 | | | |
| Genre | <i>Acanthostomum</i> Looss, 1899 | + | | Mansour (2012) |
| Genre | <i>Acanthostomum spiniceps</i> Looss, 1899 <i>Adlardia</i> Miller, Bray, Goiran, Justine & Cribb, 2009 (syn <i>Siphoderina</i> Manter, 1934) <i>Adlardia novaecaledoniae</i> Miller, Bray, Goiran, Justine & Cribb, 2009 (= <i>Siphoderina elongata</i>) | + | | Quilichini <i>et al.</i> (2009) |
| Genre | <i>Anisocoelium</i> Lühe, 1900 <i>Anisocoelium capitellatum</i> (Rudolphi, 1819) | + | | Ternengo <i>et al.</i> (2009) |
| Genre | <i>Aphalloides</i> Dollfus, Chabaud & Golvan, 1957 <i>Aphalloides coelomicola</i> Dollfus, Chabaud & Golvan, 1957 | + | | Justine (1995) |
| Genre | <i>Aphallus</i> Poche, 1926 <i>Aphallus tubarium</i> (Rudolphi, 1819) | + | | Foata <i>et al.</i> (2012) |
| Genre | <i>Neochasmus</i> Van Cleave & Mueller, 1932 <i>Neochasmus</i> sp. | + | + | Jamieson & Daddow (1982), Daddow & Jamieson (1983) |
| Famille | Heterophyidae Leiper, 1909 | | | |
| Genre | <i>Cryptocotyle</i> Lühe, 1899 | + | | |
| Genre | <i>Cryptocotyle lingua</i> (Creplin, 1825) | + | + | Rees (1979) |
| Genre | <i>Euryhelmis</i> Poche, 1926 <i>Euryhelmis squamula</i> (Rudolphi, 1819) | + | | Bakhoum <i>et al.</i> (2009b) |
| Genre | <i>Metagonimus</i> Katsurada, 1912 <i>Metagonimus yokogawai</i> Katsurada, 1912 | + | | Ahn <i>et al.</i> (1991) |
| Famille | Opisthorchiidae Looss, 1899 | | | |
| Sous-famille | <i>Metorchinae</i> Lühe, 1909 | | | |
| Genre | <i>Metorchis</i> Looss, 1899 | | | |
| | <i>Metorchis orientalis</i> Tanabe, 1920 | + | | Liu & Pan (1990) |
| Sous-famille | <i>Opisthorchiinae</i> Looss, 1899 | | | |
| Genre | <i>Clonorchis</i> Looss, 1907 <i>Clonorchis sinensis</i> (Cobbold, 1875) | | | Jeong <i>et al.</i> (1976), Jeong & Rim (1984), Mehlhorn (1988), Huang <i>et al.</i> (1998, 1999) |
| Superfamille | Plagiorchioidea Lühe, 1901 | | | |
| Famille | Haematoloechidae Freitas & Lent, 1939 | | | |
| Genre | <i>Haematoloechus</i> Looss, 1899 <i>Haematoloechus medioplexus</i> Stafford, 1902 <i>Haematoloechus</i> sp. | + | + | Burton (1972) |
| | | + | + | Justine & Mattei (1982b), Justine (1983, 1995), Iomini <i>et al.</i> (1995) |
| Famille | Omphalometridae Looss, 1899 | | | |
| Genre | <i>Rubenstrema</i> Dollfus, 1949 <i>Rubenstrema exasperatum</i> (Rudolphi, 1819) | + | + | Bakhoum <i>et al.</i> (2011c) |

Tableau 1 : suite

| | | | | |
|--------------|--|---|---|--|
| Famille | Plagiorchiidae Lühe, 1901 | | | |
| Genre | <i>Enodiotrema</i> Looss, 1900 | | + | Ndiaye <i>et al.</i> (2012b) |
| | <i>Enodiotrema reductum</i> Looss, 1901 | | | |
| Ordre | Strigeida Poche, 1926 | | | |
| Superfamille | Brachylaimoidea Joyeux & Foley, 1930 | | | |
| Famille | Brachylaimidae Joyeux & Foley, 1930 | | | |
| Sous-famille | Brachylaiminae Joyeux & Foley, 1930 | | | |
| Genre | <i>Brachylaima</i> Dujardin, 1843 | | | |
| | <i>Brachylaima aequans</i> (Looss, 1899) | | + | Ždárská <i>et al.</i> (1991) |
| | <i>Brachylaima mascomai</i> Gracenea & González-Moreno, 2002 | | + | Ferrer <i>et al.</i> (2000), Gracenea <i>et al.</i> (2000), González-Moreno (2002) |
| Genre | <i>Postharmostomum</i> Witenberg, 1923 | | | |
| | <i>Postharmostomum gallinum</i> Witenberg, 1923 | | | Liu <i>et al.</i> (1993), Chen & Lu (1994) |
| Sous-famille | Ityogoniminae Yamaguti, 1958 | | | |
| Genre | <i>Scaphiostomum</i> Braun, 1901 | | | |
| | <i>Scaphiostomum palaearcticum</i> Mass-Coma, Esteban & Valero, 1986 | + | + | Ndiaye <i>et al.</i> (2002), Ndiaye (2003) |
| Superfamille | Bucephaloidea Poche, 1907 | | | |
| Famille | Bucephalidae Poche, 1907 | | | |
| Sous-famille | Bucephalinae Poche, 1907 | | | |
| Genre | <i>Prosorhynchoides</i> Dollfus, 1929 (syn <i>Bucephaloïdes</i> Hopkins, 1954) | | | |
| | <i>Prosorhynchoides gracilescens</i> (Rudolphi, 1819) (= <i>Bucephaloïdes gracilescens</i>) | + | + | Erwin & Halton (1983) |
| Genre | <i>Pseudorhipidocotyle</i> Wang & Pan, 1964 | | | |
| | <i>Pseudorhipidocotyle elpichthys</i> Long & Lee, 1964 | + | + | Tang <i>et al.</i> (1998) |
| Superfamille | Diplostomoidea Poirier, 1886 | | | |
| Famille | Diplostomidae Poirier, 1886 | | | |
| Sous-famille | Alariinae Hall & Wigdor, 1918 | | | |
| Genre | <i>Alaria</i> Schrank, 1788 | | | |
| | <i>Alaria arisaemoides</i> Augustine & Uribe, 1927 | | | Hershenov <i>et al.</i> (1966) |
| | <i>Alaria mustelae</i> Bosma, 1931 | | | Hershenov <i>et al.</i> (1966) |
| Genre | <i>Fibricola</i> Dubois, 1932 | | | |
| | <i>Fibricola seoulensis</i> Seo, Rim & Lee, 1964 | | | Sohn & Lee (1993) |
| Genre | <i>Pharyngostomoides</i> Harkema, 1942 | | | |
| | <i>Pharyngostomoides procyonis</i> Harkema, 1942 | + | + | Grant <i>et al.</i> (1976) |
| Famille | Strigeidae Railliet, 1919 | | | |
| Sous-famille | Strigeinae Railliet, 1919 | | | |
| Genre | <i>Apatemon</i> Szidat, 1928 | | | |
| | <i>Apatemon graciliformis</i> Szidat, 1928 | + | + | Justine (1985, 1995) |

Tableau 1 : suite

| | | | | |
|---------------------|---|---|---|---|
| Superfamille | Gymnophalloidea Odhner, 1905 | | | |
| Famille | Felodistomidae Nicoll, 1909 | | | |
| Sous-famille | Felodistominae Nicoll, 1909 | | | |
| Genre | <i>Proctoeces</i> Odhner, 1911 <i>Proctoeces maculatus</i> (Looss, 1901) | + | + | Justine (1985, 1995) |
| Famille | Gymnophallidae Odhner, 1905 | | | |
| Genre | <i>Parvatrema</i> Cable, 1953 (syn <i>Meiogymnophallus</i> Ching, 1965) <i>Parvatrema minutus</i> (Cobbold, 1859) (= <i>Meiogymnophallus minutus</i>) | | | Davies (1975) |
| Superfamille | Hemairoidea Looss, 1899 | | | |
| Famille | Didymozoidae Monticelli, 1888 | | | |
| Sous-famille | Didymozoinae Monticelli, 1888 | | | |
| Genre | <i>Didymocystis</i> Ariola, 1902 <i>Didymocystis wedli</i> Ariola, 1902 | | + | Pamplona-Basilio <i>et al.</i> (2001) |
| Genre | <i>Didymozoon</i> Taschenberg, 1879 <i>Didymozoon</i> sp. | | + | Justine & Mattei (1983, 1984a) |
| Sous-famille | Gonapodasmiiinae Ishii, 1935 | | | |
| Genre | <i>Gonapodasmius</i> Ishii, 1935 <i>Gonapodasmius</i> sp. | + | + | Justine (1981, 1983), Justine & Mattei (1982a, 1984b) |
| Famille | Hemuiridae Looss, 1899 | | | |
| Sous-famille | Elytrophallinae Skrjabin & Guschanskaja, 1954 | | | |
| Genre | <i>Lecithocladium</i> Lühe, 1901 <i>Lecithocladium excisum</i> (Rudolphi, 1819) | | + | Ndiaye <i>et al.</i> (sous presse) |
| Famille | Lecithasteridae Odhner, 1905 | | | |
| Sous-famille | Lecithasterinae Odhner, 1905 | | | |
| Genre | <i>Aponurus</i> Looss, 1907 <i>Aponurus laguncula</i> Looss, 1907 | | + | Quilichini <i>et al.</i> (2010a) |
| Famille | Sclerodistomidae Odhner, 1927 | | | |
| Sous-famille | Prosorchiinae Yamaguti, 1934 | | | |
| Genre | <i>Prosorchis</i> Yamaguti, 1934 <i>Prosorchis ghanensis</i> Fischthal & Thomas, 1972 | + | | Justine (1995) |
| Superfamille | Schistosomatoidea Stiles & Hassall, 1898 | | | |
| Famille | Sanguinicolidae von Groff, 1907 | | | |
| Genre | <i>Aporocotyle</i> Odhner, 1900 <i>Aporocotyle simplex</i> Odhner, 1900 <i>Aporocotyle spinosicanalis</i> Williams, 1958 | + | + | Thulin (1981, 1982) Justine (1985, 1995) |
| Famille | Schistosomatidae Stiles & Hassall, 1898 | | | |
| Sous-famille | Bilharziellinae Price, 1929 | | | |
| Genre | <i>Trichobilharzia</i> Skrjabin & Zakharow, 1920 <i>Trichobilharzia regenti</i> Horak, Kolarova & Dvorak, 1998 | | | Justine (2001) |

Tableau 1 : suite

| | | | | |
|--------------|--|---|---|--|
| Sous-famille | <i>Schistosomatinae</i> Stiles & Hassall, 1898 | | | |
| Genre | <i>Schistosoma</i> Weinland, 1858 | | | |
| | <i>Schistosoma bovis</i> (Sonsino, 1876) | + | + | Justine (1980), Justine <i>et al.</i> (1993) |
| | <i>Schistosoma curassoni</i> (Brumpt, 1931) | + | + | Justine <i>et al.</i> (1993) |
| | <i>Schistosoma intercalatum</i> Fisher, 1934 | + | + | Justine <i>et al.</i> (1993) |
| | <i>Schistosoma japonicum</i> Katsurada, 1904 | + | + | Justine & Mattei (1981), Enriquez <i>et al.</i> (1989), Yang <i>et al.</i> (1998, 2003) |
| | <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon, 1907 | + | + | Kitajima <i>et al.</i> (1976), Otubanjo (1980, 1981a, b), Justine & Mattei (1981), Irie <i>et al.</i> (1983), Justine <i>et al.</i> (1993) |
| | <i>Schistosoma margrebowiei</i> (Le Roux, 1933) | + | + | Justine & Mattei (1981), Awad & Probert (1989), Justine <i>et al.</i> (1993) |
| | <i>Schistosoma mattheei</i> Veglia & Le Roux, 1929 | + | | Świderski & Tsinonis (1986) |
| | <i>Schistosoma rodhaini</i> Brumpt, 1931 | + | + | Justine <i>et al.</i> (1993) |
| | <i>Schistosoma</i> sp. | + | + | Justine (1982, 1991c), Erasmus (1987), Jetton & Bogitsh (1987), Combes (1991) |
| Famille | Spirorchiidae Stunkard, 1921 | | | |
| Genre | <i>Spirorchis</i> MacCallum, 1919 | | | |
| | <i>Spirorchis</i> sp. | + | + | Justine (1985, 1995) |

I-4 Objectifs

Les objectifs fixés pour la réalisation de ce travail sont les suivants :

- augmenter la base de données spermatologiques ultrastructurales chez les Digènes. Pour cela, nous avons choisi d'inclure dans ce Mémoire des espèces non étudiées appartenant à sept superfamilles et sept familles différentes ;
- comparer nos résultats avec ceux provenant des études précédentes ;
- évaluer l'intérêt phylogénétique des caractères ultrastructuraux, en effectuant une analyse globale et comparative de l'ensemble des dits caractères candidats pour la phylogénie des Digènes ;
- et établir des modèles de spermatozoïdes chez les Digènes sur la base des caractères ultrastructuraux.

DEUXIÈME CHAPITRE :

MATÉRIELS ET MÉTHODES

II- Matériels et méthodes

II-1 Espèces étudiées

Dans le présent Mémoire nous avons étudié huit espèces de Digènes appartenant à sept superfamilles et sept familles différentes. Ces espèces sont les suivantes :

- *Brachycoelium salamandrae* (Gorgoderoidea : Brachycoeliidae),
- *Diplodiscus subclavatus* (Paramphistomoidea : Diplodiscidae),
- *Euryhelmis squamula* (Opisthorchioidea : Heterophyidae),
- *Elstia stossichianum* et *Wardula capitellata* (Microscaphidioidea : Mesometridae),
- *Mediogonimus jourdanei* (Microphalloidea : Prosthognomidae),
- *Robphildolfusium fractum* (Lepocreadioidea : Gyliauchenidae) et
- *Rubenstrema exasperatum* (Plagiorchioidea : Omphalometridae).

Ces différentes espèces sont présentées en faisant abstraction de l'étude détaillée de leurs hôtes. Ainsi, pour chacune des espèces de parasites étudiées, nous présentons brièvement sa « fiche technique » en mentionnant particulièrement les aspects liés à sa morpho-anatomie générale, mais aussi à sa biogéographie et son cycle biologique.

II-1-1 *Brachycoelium salamandrae* (Frölich, 1789)

Hôte : la salamandre commune, tachetée ou de feu, *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758)

Lieu de capture : Santa Fe del Montseny (Barcelona, Espagne)

Microhabitat parasitaire : intestin



Figure 3. *Salamandra salamandra* (Amphibia, Caudata, Salamandridae)
(photo cédée par le Dr. A. Ribas)



Figure 4. Forêt de *Fagus sylvatica* à Santa Fe del Montseny, biotope de *Salamandra salamandra* (photo cédée par le Dr. A. Ribas)

Systématique

Phylum : Plathelminthes

Classe : Trematoda

Sous-classe : Digenea

Ordre : Plagiorchiida

Superfamille : Gorgoderoidea

Famille : Brachycoeliidae

Genre : *Brachycoelium*

Espèce : *Brachycoelium salamandrae*

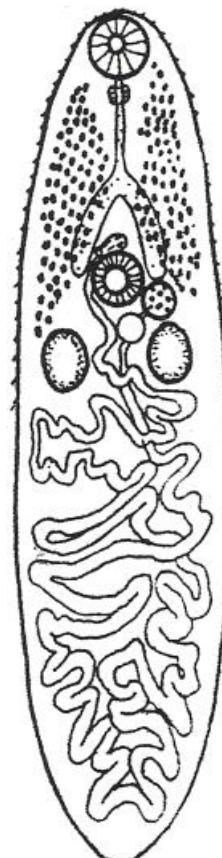


Figure 5. *Brachycoelium salamandrae*
(extrait de Pojmańska, 2008)

II-1-1-1 Morpho-anatomie

Brachycoelium salamandrae présente un corps allongé mesurant 3-5 mm de large et 0,8-1,2 mm de long. Son tégument est épineux, plus spécialement dans sa partie antérieure où est localisée la ventouse orale (0,26-0,31 mm) légèrement plus grande que l'acétabulum (0,20-0,26 mm) qui est situé à environ un tiers de la longueur du ver. Le prépharynx et le pharynx sont courts, et l'œsophage, de longueur moyenne, vient avant la bifurcation des cæcums qui sont très courts et atteignent rarement le niveau de la ventouse ventrale. La poche du cirre, relativement petite, est située antérieurement à l'acétabulum de même que le pore génital, légèrement positionné devant la ventouse ventrale. Les testicules (au nombre de deux) sont arrondis, opposés et localisés légèrement en arrière de l'acétabulum. L'ovaire est situé devant le testicule gauche à proximité de la ventouse ventrale. Les follicules vitellins sont confinés dans la partie antérieure du ver comprise entre les testicules et la ventouse orale. Quant à l'utérus, il occupe la partie postérieure aux testicules et renferme des œufs de taille légèrement différente (0,045-0,050 x 0,032-0,036 mm) (Dawes, 1968).

II-1-1-2 Biogéographie

L'adulte de *Brachycoelium salamandrae* est largement répertorié chez plusieurs genres d'amphibiens (*Acris*, *Ambystoma*, *Amphiuma*, *Bufo*, *Desmognathus*, *Dicamptodon*, *Ensatina*, *Eurycea*, *Euproctus*, *Gyrinophilus*, *Hemidactylum*, *Mertensiella*, *Notophthalmus*, *Phaeognathus*, *Plethodon*, *Pseudacris*, *Pseudotriton*, *Rana*, *Salamandra*, *Speleomantes*, *Taricha*, *Triturus*, *Typhlotriton*) et de reptiles (*Anguis*, *Anolis*, *Barisia*, *Gerrhonotus*, *Opheodrys*, *Ophisaurus*, *Scincella*, *Storeria*, *Terrapene*) procédant de diverses régions des continents européen, américain et asiatique (Catalano *et al.*, 1982 ; Moravec, 1984 ; Bertman, 1986 ; Ricci, 1987 ; Knoepffler & Combes, 1988 ; McAllister *et al.*, 1995 ; Bolek & Coggins, 1998 ; Goldberg *et al.*, 1999 ; Yldrmhan *et al.*, 2005 ; Dusen & Oz, 2006) (voir figure 6 pour la répartition européenne).

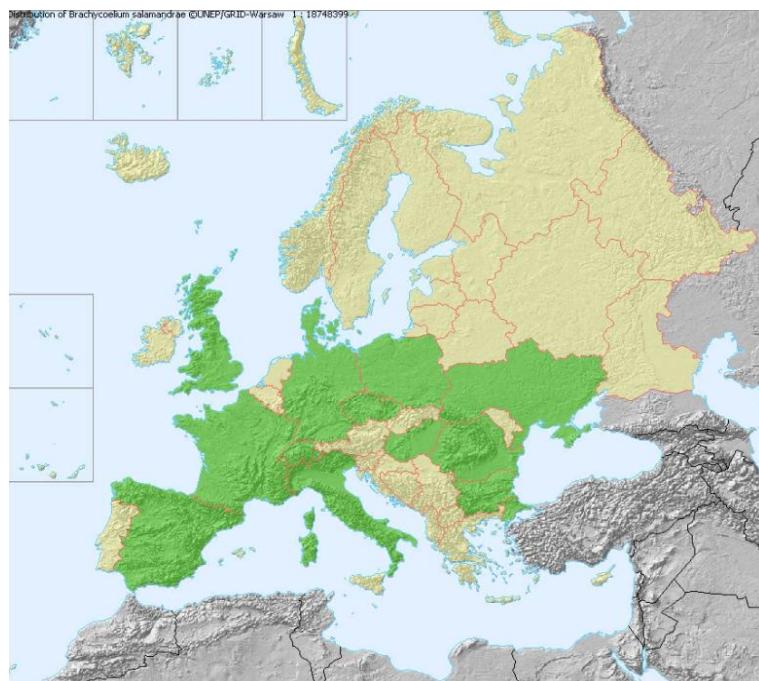


Figure 6. Distribution de *Brachycoelium salamandrae* en Europe
(extrait de : <http://www.faunaeur.org>)

II-1-1-3 Cycle biologique

Dans un bref apport concernant le cycle biologique de *Brachycoelium mesorchium* (synonyme de *Brachycoelium salamandrae*), Denton (1962) a mentionné que les cercaires sont libérées par *Practicallela berlandieriana*, *Agriolimax agrestis* et *Mesodon thyroidus*, qui serviraient de premier hôte intermédiaire. Comme second hôte intermédiaire, en plus des deux premiers mollusques cités antérieurement, d'autres espèces comme *Anguispira alternata*, *Bulimulus alternatus mariae* et *Polygyra texasiana* pourraient également jouer ce rôle.

Des résultats similaires ont été trouvés par Jordan & Byrd (1967) lors de leur expérience sur le cycle de vie de *B. mesorchium*. Utilisant huit espèces de mollusques (*Anguispira alternata crassa*, *Deroceras laeve*, *Gastrocopta contracta*, *Mesodon inflectus*, *Philomycus carolinianus*, *Triodopsis caroliniensis*, *Stenotrema barbigerum* et *Zonitoides arboreus*) ces auteurs ont constaté que :

- bien que des opercules des œufs de *B. mesorchium* soient ouvertes durant leur passage dans l'intestin de chacune des huit mollusques infectés, seulement *T. caroliniensis* et *M. inflectus* effectuent une production de cercaires, et serviraient comme premier hôte intermédiaire.

- chacune des huit espèces de mollusques citées antérieurement pourrait contenir des métacercaires enkystées. Ainsi donc, ces espèces serviraient de second hôte intermédiaire.

En définitive, les espèces adultes de *B. mesorchium* sont obtenues expérimentalement après infestation des stades larvaires aquatiques de *Desmognathus fusca fusca* et *Eurycea bislineata cirrigera* par des métacercaires.

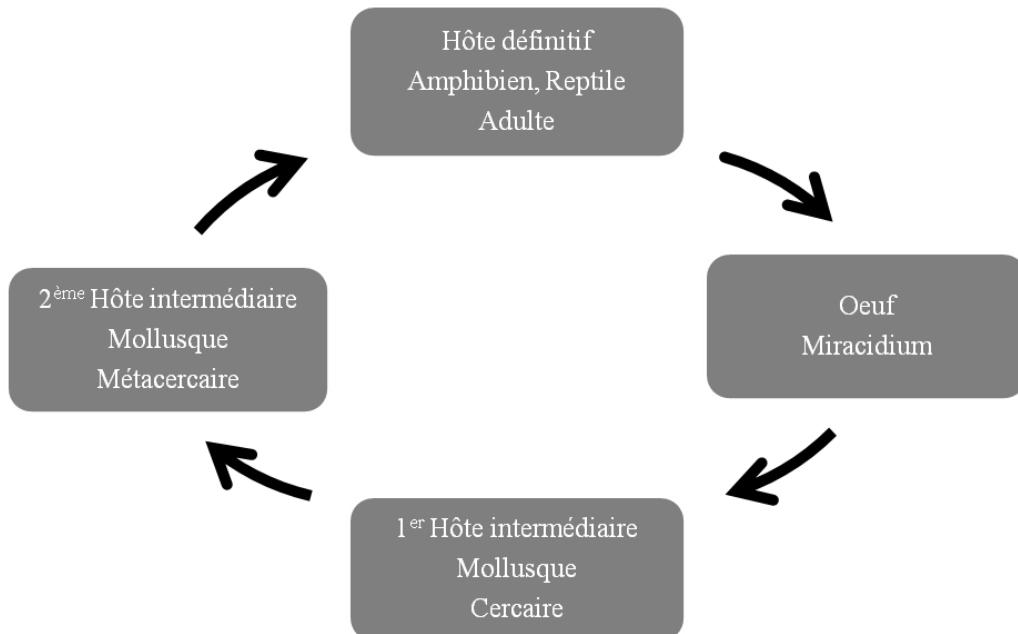


Figure 7. Cycle biologique de *Brachycoelium salamandrae*

II-1-2 *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760)

Hôte : la petite grenouille verte, *Rana lessonae* (Camerano, 1882)

Lieu de capture : Réserve Naturelle de Bugskiy (Brest, Biélorussie)

Microhabitat parasitaire : intestin



Figure 8. *Rana lessonae*
(Amphibia, Anura, Ranidae)
(photo cédée par le Dr. V.V. Shimalov)



Figure 9. Biotope de *Rana lessonae* (Réserve
Naturelle de Bugskiy, Biélorussie)
(photo cédée par le Dr. V.V. Shimalov)

Systématique

Phylum : Plathelminthes

Classe : Trematoda

Sous-classe : Digenea

Ordre : Echinostomida

Superfamille : Paramphistomoidea

Famille : Diplodiscidae

Genre : *Diplodiscus*

Espèce : *Diplodiscus subclavatus*

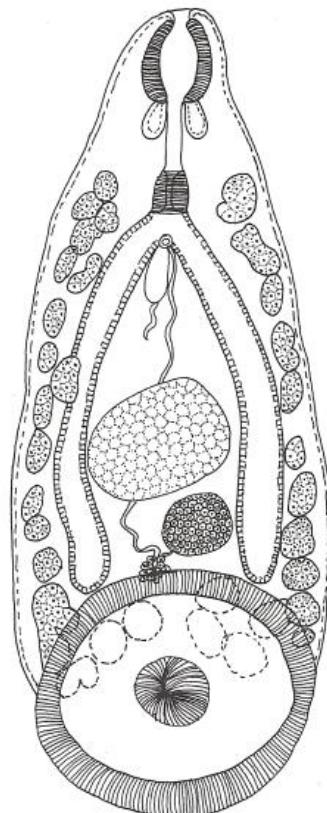


Figure 10. *Diplodiscus subclavatus*
(extrait de Jones, 2005)

II-1-2-1 Morpho-anatomie

Diplodiscus subclavatus mesure environ 6 mm de long et 3 mm de large et présente un corps plus ou moins fusiforme, effilé antérieurement et arrondi postérieurement, avec un tégument dépourvu d'épines. La ventouse orale est petite (un sixième à un dixième de la longueur du corps) et présente deux petites poches positionnées postéro-dorsalement ; tandis que l'acétabulum, large, proéminent, postérieurement situé, occupe la largeur entière du ver. Le pharynx est absent et l'œsophage, long et musculaire, arrive à la bifurcation des cæcums qui s'étendent jusqu'à la partie postérieure du ver, légèrement en avant de l'acétabulum. Quant au pore génital, il est médian et situé légèrement en arrière de la bifurcation des cæcums intestinaux, à environ un tiers du corps du ver. La poche du cirre est absente et la vésicule séminale, de petite taille, est pyriforme. Concernant l'ovaire, il est arrondi, légèrement en position latérale et postérieur au testicule. Les follicules vitellins, situés latéralement aux cæcums sur chaque côté du ver, s'étendent légèrement au delà du plan médian des cæcums et antérieurement à l'acétabulum. L'utérus, formé de légers plis, est garni d'œufs très larges (0,128-0,137 x 0,082-0,090 mm) mais peu nombreux (Dawes, 1968).

II-1-2-2 Biogéographie

Diplodiscus subclavatus présente un large spectre d'hôtes définitifs et aussi une ample distribution géographique.

Cette espèce a été répertoriée chez des reptiles, comme les genres *Elaphe*, *Emys*, *Lacerta* ou *Natrix* (Lewin, 1992 ; Ivanov & Semenova, 2000), mais aussi chez des amphibiens appartenant à des nombreux genres (*Aubria*, *Bufo*, *Cassina*, *Dicroglossus*, *Hyla*, *Leptopelis*, *Pelophylax*, *Phrynobatrachus*, *Ptychadena*, *Rana*, *Triturus*, *Xenopus* -Gassmann, 1975 ; Bourgat *et al.*, 1976 ; Salami-Cadoux & De Gregorio, 1976 ; Getsevichyute, 1978 ; Pike, 1979 ; Ginetsinskaya & Golubeva, 1991 ; Galeano *et al.*, 1996 ; Vashetko & Siddikov, 1999 ; Yldrmhan *et al.*, 2012).

Concernant sa répartition, *D. subclavatus* a été citée en Afrique : au Bénin (Bourgat *et al.*, 1976), au Cameroun (Gassmann, 1975), au Soudan (Pike, 1979), au Togo (Salami-Cadoux & De Gregorio, 1976), etc. Elle a été répertoriée aussi en Asie : en Ouzbékistan (Vashetko & Siddikov, 1999), en Turquie (Yldrmhan *et al.*, 2012), au Vietnam (Ha & Nguyen, 1995). En Europe le Diplodiscidé a été trouvé dans différents pays comme la Biélorussie (Shimalov *et*

al., 2001), l'Espagne (Galeano *et al.*, 1996), la Lituanie (Getsevichyute, 1978), la Pologne (Popioek *et al.*, 2011), la Russie (Ginetsinskaya & Golubeva, 1991), la Yougoslavie (Lees & Hristovski, 1976), entre autres (voir figure 11).

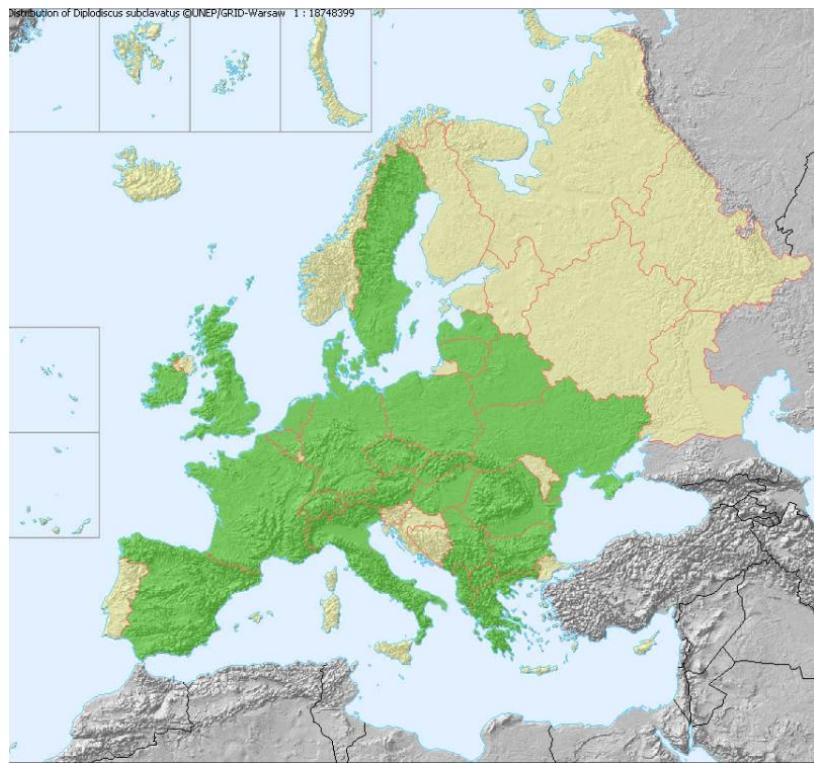


Figure 11. Distribution européenne de *Diplodiscus subclavatus*
(extrait de : <http://www.faunaeur.org>)

II-1-2-3 Cycle biologique

Les rédies et les cercaires de *Diplodiscus subclavatus* ont été observées chez les Gastéropodes *Planorbis planorbis* en Europe (Grabda-Kazubska, 1980) ou *Bulinus forskalii* et *Segmentorbis kanisaensis* en Afrique (Togo) (Bourgat & Kulo, 1977). Après leur libération dans le milieu extérieur, les cercaires s'enkystent en métacercaires sur des végétaux avant d'être ingérées par l'adulte ou le têtard (cas rare) de l'hôte définitif (amphibien du genre *Bufo*, *Rana*, *Triturus*...). Cet hôte définitif peut être également un reptile du genre *Larcerta* (Lewin, 1992), *Elaphe*, *Emys* ou *Natrix* (Ivanov & Semenova, 2000). Une fois dans l'hôte définitif ces métacercaires gagnent l'intestin où le développement des adultes aura lieu. La libération des œufs donnera naissance aux miracidiums, refermant ainsi le cycle.

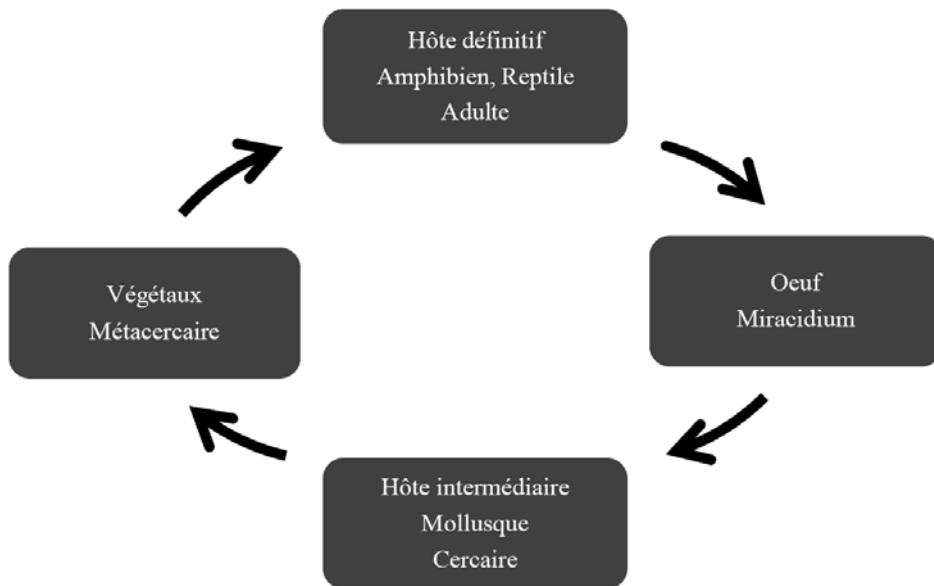


Figure 12. Cycle biologique de *Diplodiscus subclavatus*

II-1-3 *Euryhelmis squamula* (Rudolphi, 1819)

Hôte : le vison américain, *Mustela vison* Schreber, 1777

Lieu de capture : Saint-Gor (Landes, France)

Microhabitat parasitaire : intestin



Figure 13. *Mustela vison* (Mammalia, Carnivora, Mustelidae)

Systématique

Phylum : Plathelminthes

Classe : Trematoda

Sous-classe : Digenea

Ordre : Plagiorchiida

Superfamille : Opisthorchioidea

Famille : Heterophyidae

Genre : *Euryhelmis*

Espèce : *Euryhelmis squamula*

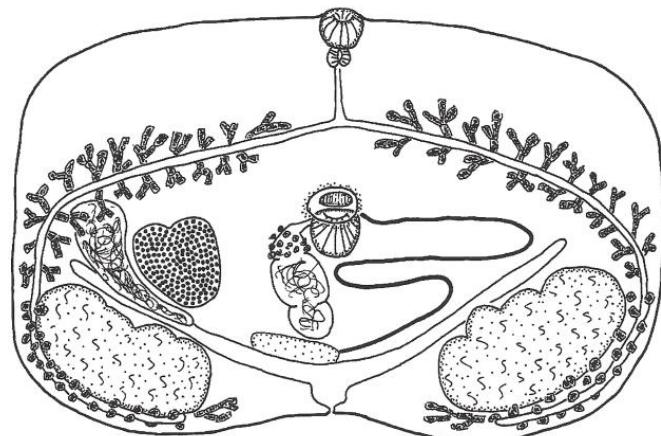


Figure 14. *Euryhelmis squamula*
(extrait de Pearson, 2008)

II-1-3-1 Morpho-anatomie

Euryhelmis squamula présente un corps aplati, plus large que long, plus ou moins rectangulaire, mesurant 0,6 mm de long et 1,45 mm de large. La ventouse orale, petite, a un diamètre de l'ordre de 0,07 mm, alors que celle ventrale est encore plus petite et localisée approximativement au milieu du corps. Le prépharynx est très court et le pharynx, encore plus petit que l'acétabulum, est suivie d'un œsophage assez long qui s'étend jusqu'à la bifurcation des cæcums. Ces derniers, longs, s'étendent plus ou moins parallèlement aux marges latérales du corps du ver et se terminent postérieurement. Quant aux testicules, ils sont lobés, opposés et largement séparés au niveau postérieur du ver. L'ovaire est positionné devant le testicule droit, de même que la poche du cirre qui est longue et mince (parfois « *club-shaped* ») et encerclant une partie de la ventouse ventrale. Les follicules vitellins, très développés, sont disposés latéralement aux cæcums intestinaux, atteignant l'œsophage antérieurement et entourant presque les organes reproducteurs. L'utérus, formé de plis transversaux entre les testicules et l'acétabulum, contient des œufs bruns et petits (0,028-0,032 x 0,012-0,014) (Dawes, 1968).

II-1-3-2 Biogéographie

Euryhelmis squamula est présente, à notre connaissance, aux États-Unis chez les carnivores *Procyon lotor* et *Martes americana* (Cole & Shoop, 1987 ; Hoberg *et al.*, 1990) et surtout en Europe, où sa distribution est amplement documentée chez des insectivores comme *Neomys fodiens*, mais particulièrement chez des carnivores Mustelidae comme *Lutra lutra*, *Martes foina*, *Meles meles*, *Mustela erminea*, *M. lutreola*, *M. nivalis*, *M. putorius*, *M. vison* (Combes *et al.*, 1974 ; Jourdane, 1977 ; Jancev, 1987 ; Feliu *et al.*, 1989 ; Torres *et al.*, 1996, 2001, 2003, 2008 ; Klupiek, 2001 ; Millan *et al.*, 2004 ; Segovia *et al.*, 2007) (voir figure 15 pour la répartition européenne).

II-1-3-3 Cycle biologique

Le cycle biologique de *Euryhelmis squamula* est aquatique, trihétéroxène, et fut expérimenté par Combes *et al.* (1974) et Jourdane (1977). Le premier hôte intermédiaire est un mollusque Prosobranche du genre *Bythinella*, d'où sortent les cercaires. Ces dernières s'enkystent et

donnent des métacercaires au niveau du tissu sous-cutané d'un amphibiens. Selon Jourdane (1977), *E. squamula* utilise l'adulte de *Rana temporaria* comme second hôte intermédiaire et *Neomys fodiens* comme hôte définitif. En plus de cet hôte, plusieurs autres mammifères ont été décrits comme hôtes définitifs naturels de *Euryhelmis squamula* (voir biogéographie).

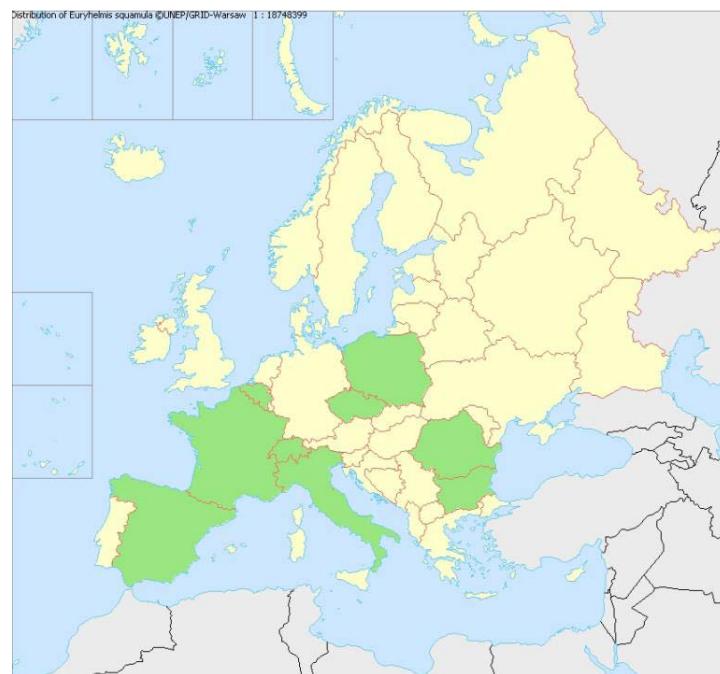


Figure 15. Distribution de *Euryhelmis squamula* en Europe
(extrait de : <http://www.faunaeur.org>)

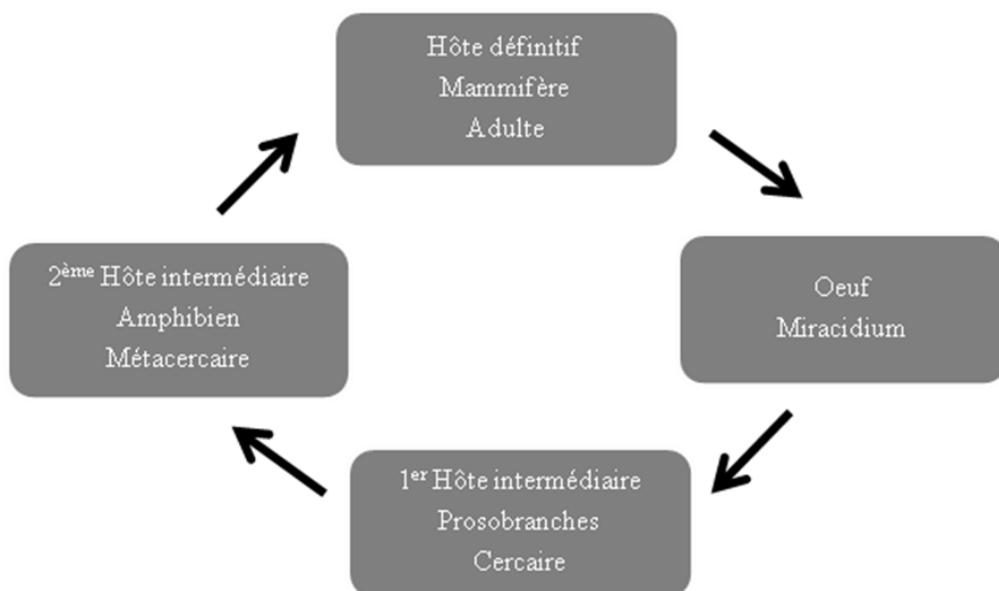


Figure 16. Cycle biologique de *Euryhelmis squamula*

II-1-4 Les Mésométridés

Hôte : la saupe, *Sarpa salpa* (Linnaeus, 1758)

Lieu de capture : plages de Ouakam, Soumbédioune et de la Baie de Hann (Dakar, Sénégal)

Microhabitat parasitaire : intestin



Figure 17. *Sarpa salpa*
(Pisces, Teleostei, Sparidae)



Figure 18. Plage de Ouakam (Dakar, Sénégal)

Systématique

Phylum : Plathelminthes

Classe : Trematoda

Sous-classe : Digenea

Ordre : Echinostomida

Superfamille : Microscaphidioidea

Famille : Mesometridae

Genre : *Elstia*

Espèce : *Elstia stossichianum*

Genre : *Wardula*

Espèce : *Wardula capitellata*

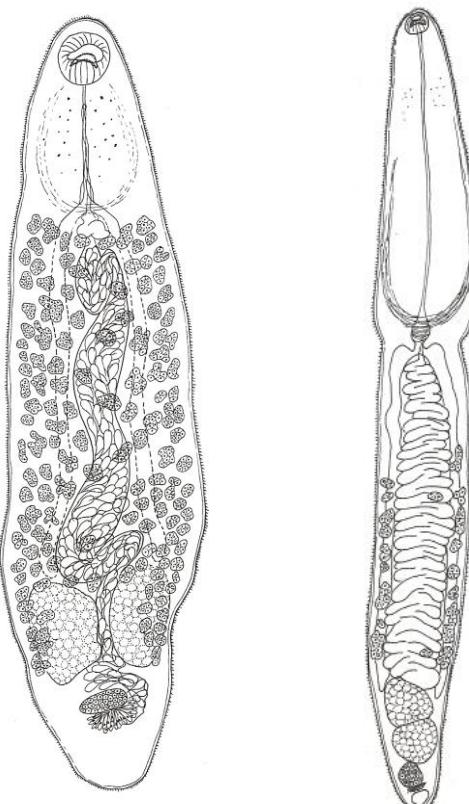


Figure 19. *Elstia stossichianum* (extrait de Jones & Blair, 2005)

Figure 20. *Wardula capitellata* (extrait de Jones & Blair, 2005)

II-1-4-1 Morpho-anatomie

II-1-4-1-1 *Elstia stossichianum* (Monticelli, 1892)

Elstia stossichianum présente un corps aplati, élancé, mesurant 2996-3081 µm de long et 807-1041 µm de large, légèrement étranglé à la hauteur du pharynx, divisant le ver en deux parties : (a) une partie antérieure, en avant du pharynx, déprimée sur sa face ventrale et (b) une autre, uniformément aplatie, située en arrière du pharynx. Le tégument est épineux dorsalement et ventralement. La ventouse orale (240-245 µm x 266-272 µm) est arrondie et subterminale, avec une ouverture ventrale. Le prépharynx, long, présente à son extrémité postérieure des fibres musculaires transversales s'ajoutant à d'autres longitudinales pour constituer une sorte de pharynx. Les deux cæcums, parallèles, atteignent la partie antérieure des testicules sans s'effiler ni s'immiscer entre les testicules et la paroi du corps. Les testicules, opposés et symétriques, sont situés presque au niveau de l'extrémité postérieure. La vésicule séminale, contournée, tubulaire, est située légèrement en arrière de la bifurcation des cæcums. L'ovaire est ovale et situé proche de l'extrémité postérieure, après les testicules. Les follicules vitellins, extensifs, sont situés entre la bifurcation des cæcums et la partie médiane ou légèrement postérieure des testicules. L'utérus, situé entre les cæcums, est garni d'œufs (195-310 µm x 33-41 µm) pourvus d'un long filament polaire plus ou moins recourbé à son extrémité (Bartoli, 1987).

II-1-4-1-2 *Wardula capitellata* (Rudolphi, 1819)

Wardula capitellata (6481-8713 µm x 744-999 µm) exhibe un corps très allongé et effilé à ses deux extrémités, avec une constriction plus ou moins accusée des parois latérales située à la hauteur du pharynx qui divise le ver en deux régions : (a) une région antérieure à la bifurcation des cæcums, qui est concave et en forme de ventouse et (b) une région postérieure, constituée par le reste du corps. Le tégument est armé d'épines, aussi bien dans la face dorsale que ventrale. La ventouse orale, arrondie et terminale, est suivie d'un prépharynx très long et d'un pharynx très évident, constitué de quelques fibres musculaires longitudinales et d'un grand nombre de fibres musculaires transversales. Le bulbe oesophagien est petit, mais très développé. Les cæcums digestifs, à parois épaisses, parfois sinuueuses, cheminent jusqu'à la partie antérieure du premier testicule. Les testicules sont disposés en tandem et situés proche de l'extrémité postérieure. La vésicule séminale, tubulaire et sinuueuse, se rétrécit et termine en

forme de canal ejaculateur. L'ovaire, sphérique, dextre et à contour entier, est situé tout à fait à l'extrémité postérieure du corps. Les follicules vitellins, peu nombreux, occupent principalement les cotés du corps dans les deux faces (ventrale et dorsale). L'utérus, intercæcal et régulier, contient des œufs operculés, dépourvus de filament polaire et de taille variable ($72\text{-}85 \mu\text{m} \times 30\text{-}43 \mu\text{m}$) (Bartoli, 1987).

II-1-4-2 Biogéographie

Les Mésométridés *Elstia stossichianum* et *Wardula capitellata* sont répertoriées, outre la mer Méditerranée, au niveau de la côte atlantique africaine et même sur une partie de celle de l'océan Indien (Bartoli, 1987). Leur distribution géographique pourrait donc être liée à celle de leur hôte définitif, en l'occurrence le sparidé *Sarpa salpa*.

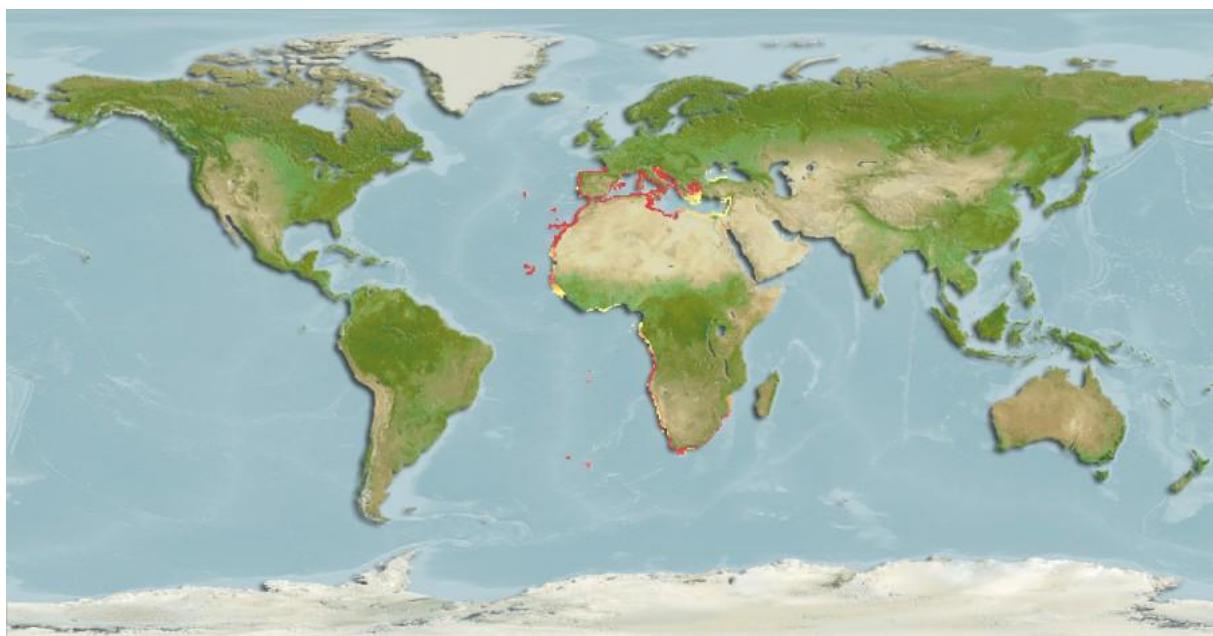


Figure 21. Distribution géographique de *Sarpa salpa* (extrait de : <http://www.fishbase.us>)

II-1-4-3 Cycle biologique

Les Mésométridés *Elstia stossichianum* et *Wardula capitellata* sont des parasites oioxènes, c'est-à-dire qu'ils infectent un seul hôte définitif (Bartoli, 1987). Jousson *et al.* (1998), sur la base d'« ITS (Internal Transcribed Spacer) » de l'ADNr, identifièrent les cercaires de *E. stossichianum* et *W. capitellata*, entre autres. Ainsi, ces cercaires se développent chez différentes espèces de prosobranches (*Vermetus triquierter* pour *E. stossichianum* et *Barleeia*

rubra pour *W. capitellata*), représentant le premier hôte intermédiaire. L'enkystement de ces cercaires se ferait sur les feuilles d'algues ou de *Posidonia oceanica* (plante aquatique endémique de la Méditerranée). Finalement, l'hôte définitif, le sparidé *Sarpa salpa*, s'infesterait en s'alimentant d'algues ou de *Posidonia*.

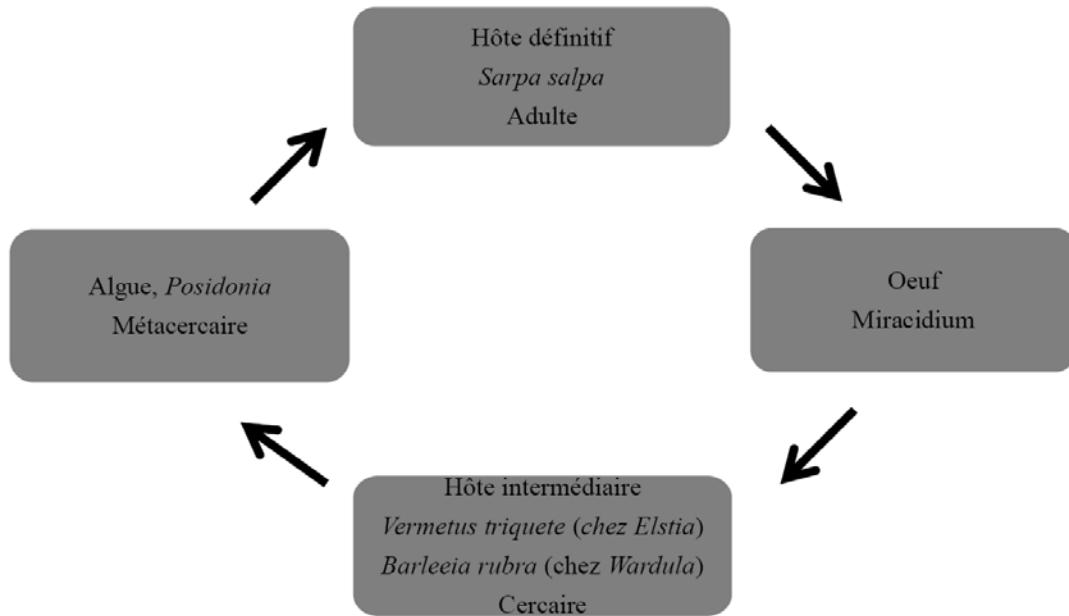


Figure 22. Cycle biologique de *Elstia stossichianum* et *Wardula capitellata*

II-1-5 *Mediogonimus jourdanei* Mas-Coma & Rocamora, 1978

Hôte : le campagnol roussâtre, *Myodes glareolus* (Schreber, 1780)

Lieu de capture : Réserve Naturelle de Py (Pyrénées orientales, France)

Microhabitat parasitaire : foie



Figure 23. *Myodes glareolus*
(Mammalia, Rodentia, Muridae)
(Photo cédée par le Dr. I. Torre)



Figure 24. Biotope typique de *Myodes glareolus*
(Réserve Naturelle de Py, France)

Systématique

Phylum : Plathelminthes

Classe : Trematoda

Sous-classe : Digenea

Ordre : Plagiorchiida

Superfamille : Microphalloidea

Famille : Prosthogonimidae

Genre : *Mediogonimus*

Espèce : *Mediogonimus jourdanei*

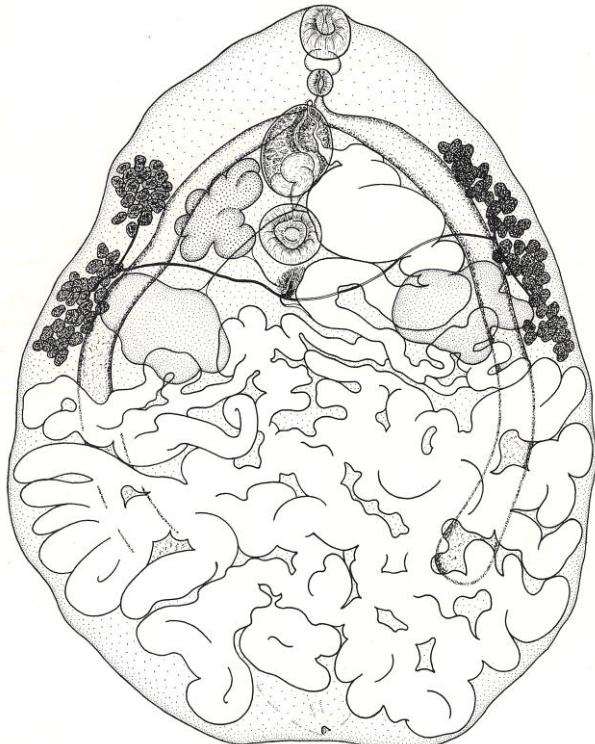


Figure 25. *Mediogonimus jourdanei*
(extrait de Mas-Coma & Rocamora, 1978)

II-1-5-1 Morpho-anatomie

Mediogonimus jourdanei, mesurant environ 2390 µm de long et 1950 µm de large, présente un corps piriforme et aplati dorso-ventralement, avec un tégument pourvu de spinulation. Les deux ventouses sont de taille similaire, la ventrale (210/197 µm) étant légèrement plus grande que l'orale (158/156 µm de diamètre). On observe un espace prépharyngien clair, un pharynx relativement grand et un œsophage court. Les cœcums digestifs, larges, parcourent le corps du ver de manière plus ou moins parallèle et s'étendent postérieurement sans atteindre le bord terminal du ver. Les deux testicules sont subégaux, légèrement lobés et situés dorsalement par rapport aux cœcums digestifs. La poche du cirre (située dorsalement entre l'ovaire et la glande de Mehlis) renferme une vésicule séminale grande et repliée, les glandes prostatiques et le cirre. L'ovaire, multilobé, est situé indistinctement à gauche ou à droite de l'acétabulum. Les glandes vitellogènes sont constituées de follicules irréguliers, relativement gros et disposés en deux champs latéraux qui s'étendent du niveau antérieur de l'ovaire au niveau des bords postérieurs des testicules. L'utérus forme de nombreuses anses utérines qui occupent toute la région postérieure du corps, en arrière de l'acétabulum. Il contient des nombreux œufs mesurant environ 30,0-37,5 µm de long et 12,0-15,0 µm de large (Mas-Coma & Rocamora, 1978 ; Gracenea *et al.*, 1987).

II-1-5-2 Biogéographie

La présence de *Mediogonimus jourdanei* est jusqu'ici répertoriée au niveau de la Péninsule Ibérique, notamment dans les Pyrénées. Cette localisation conforte l'hypothèse émise par Combes & Jourdane (1974) concernant l'influence de l'isolement des Pyrénées sur l'évolution des Plathelminthes (voir Mas-Coma & Rocamora, 1978 ; Gracenea *et al.*, 1987). Les hôtes définitifs connus pour *M. jourdanei* sont *Myodes glareolus* et *Apodemus sylvaticus* (Ribas *et al.*, 2005).

II-1-5-3 Cycle biologique

À ce jour il n'y a pas eu d'étude concrète en ce qui concerne le cycle biologique de *Mediogonimus jourdanei*. Cependant, en se basant sur le cycle biologique de certaines espèces de Prosthogonimidés (Yamaguti, 1975), on pourrait penser à un cycle indirect

véhiculé par des hôtes aquatiques. D'autant plus qu'il a été constaté que les hôtes définitifs (*Myodes glareolus*), capturés et infectés par *M. joudanei*, provenaient d'endroits proches des cours d'eaux (Gracenea *et al.*, 1987). Récemment, *Apodemus sylvaticus* a été trouvé naturellement infesté par *M. joudanei*, étant donc hôte définitif (Ribas *et al.*, 2005).



Figure 26. Distribution de *Mediogonimus joudanei*
(extrait de : <http://www.faunaeur.org>)

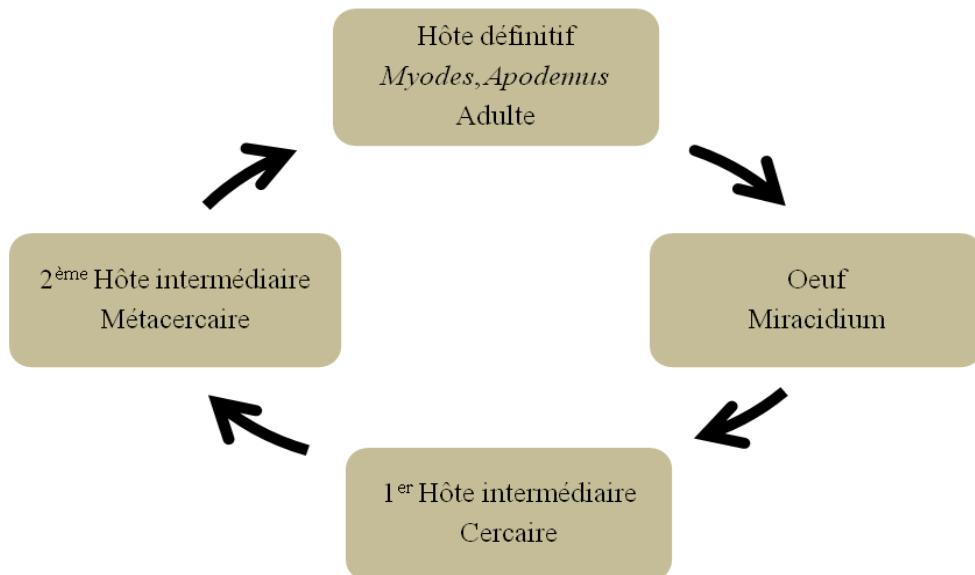


Figure. 27. Cycle biologique de *Mediogonimus joudanei*

II-1-6 *Robphildollfusium fractum* (Rudolphi, 1819)

Hôte : la saupe, *Sarpa salpa* (Linnaeus, 1758)

Lieu de capture : plages de Ouakam, Soumbédioune et de la Baie de Hann (Dakar, Sénégal)

Microhabitat parasitaire : intestin



Figure 28. *Sarpa salpa*
(Pisces, Teleostei, Sparidae)



Figure 29. Plage de la Baie de Hann
(Dakar, Sénégal)

Systématique

Phylum : Plathelminthes

Classe : Trematoda

Sous-classe : Digenea

Ordre : Plagiorchiida

Superfamille : Lepocreadioidea

Famille : Gyliuchenidae

Genre : *Robphildollfusium*

Espèce : *Robphildollfusium fractum*



Figure 30. *Robphildollfusium fractum*
(extrait de Hall & Cribb, 2005)

II-1-6-1 Morpho-anatomie

Robphildolfusium fractum présente un tégument dépourvu d'épines et un corps allongé, mesurant 3421-4208 µm de long et 722-1190 µm de large. Ce corps est également effilé aux deux extrémités, avec la partie située avant l'acétabulum souvent plus élargie que celle de la région post-acétabulaire. La ventouse orale (490-560 µm x 272-330 µm) est plus ou moins cylindrique et subterminale, tandis que celle ventrale (426-533 µm x 416-533 µm) est à peu près circulaire et disposée au milieu de la longueur du corps. La face ventrale de la cavité buccale exhibe sur toute sa longueur, et de part et d'autre du plan sagittal, deux bourrelets parallèles entre eux. Le prépharynx est très long et sa tunique externe renferme des fibres musculaires longitudinales. Le pharynx est ovoïde, musculaire et vient avant la bifurcation des cæcums car l'œsophage est absent. Les cæcums digestifs s'étendent parallèlement à la paroi du corps et se terminent en cul-de-sac à l'extrémité postérieure. Les testicules, arrondis et à contour entier, sont disposés en tandem. La vésicule séminale, très longue, cylindrique et sinuuse, débute au niveau de l'ovaire, contourne l'acétabulum et se termine à la base de la poche du cirre qui a une forme approximativement biconique. L'ovaire, entier et généralement tétralobé, est localisé à mi-chemin entre le testicule antérieur et l'acétabulum. Les follicules vitellins s'étendent entre l'arrière de la ventouse orale et l'extrémité postérieure du ver, en fusionnant sur le plan médian dans l'espace post-testiculaire. L'utérus, intercæcal, contient des œufs mesurant 67-74 µm de long et 26-35 µm de large (Bartoli, 1987).

II-1-6-2 Biogéographie

La présence de *Robphildolfusium fractum* a été signalée au niveau de la mer Méditerranée, des côtes des îles Canaries, et des côtes de l'océan Atlantique (Hall & Cribb, 2005). À l'image de la distribution des deux espèces de Mésométridés étudiées dans ce Mémoire, la distribution géographique de *R. fractum* pourrait être corrélée avec celle de *Sarpa salpa* (voir figure 21).

II-1-6-3 Cycle biologique

À notre connaissance, il n'y a pas de descriptions concernant le cycle vie de *Robphildolfusium fractum*. Cependant, Bartoli (1987) a tenté une approximation en mentionnant la relation entre la distribution des Robphildolfusidés et Mésométridés au sein de leur hôte définitif (*Sarpa salpa*) avec les modalités d'enkystement de leurs cercaires sur les végétaux.

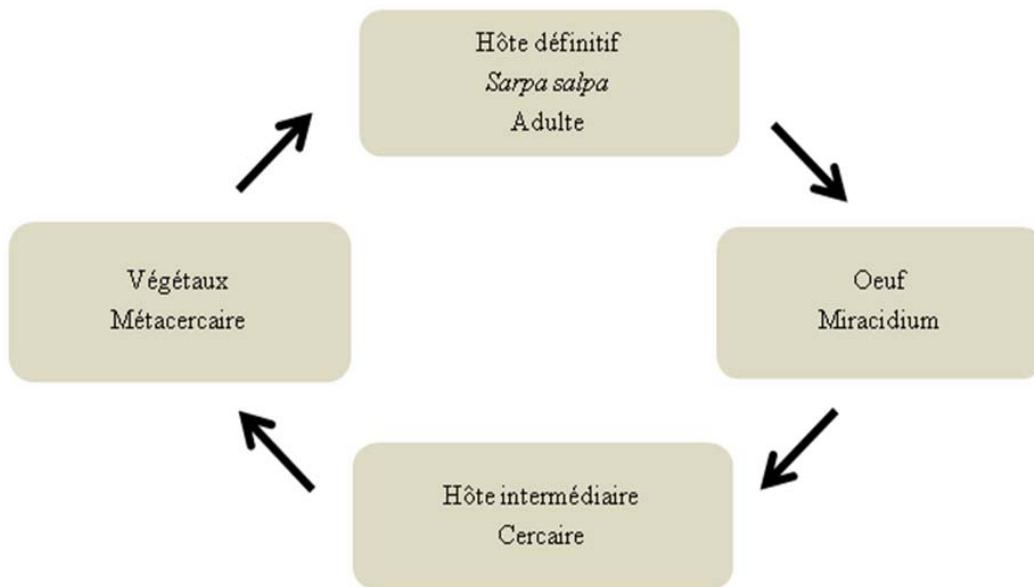


Figure 31. Approximation du cycle biologique de *Robphildolfusium fractum*

II-1-7 *Rubenstrema exasperatum* (Rudolphi, 1819)

Hôte : la musaraigne commune, carrelet ou vulgaire, *Sorex araneus* Linnaeus, 1758

Lieu de capture : Réserve Naturelle de Bugskiy (Brest, Biélorussie)

Microhabitat parasitaire : intestin



Figure 32. *Sorex araneus*
(Mammalia, Insectivora, Soricidae)
(photo cédée par le Dr. I. Torre)



Figure 33. Biotope de *Sorex araneus* (Réserve
Naturelle de Bugskiy, Biélorussie)
(photo cédée par le Dr. V.V. Shimalov)

Systématique

Phylum : Plathelminthes

Classe : Trematoda

Sous-classe : Digenea

Ordre : Plagiorchiida

Superfamille : Plagiorchioidea

Famille : Omphalometridae

Genre : *Rubenstrema*

Espèce : *Rubenstrema exasperatum*

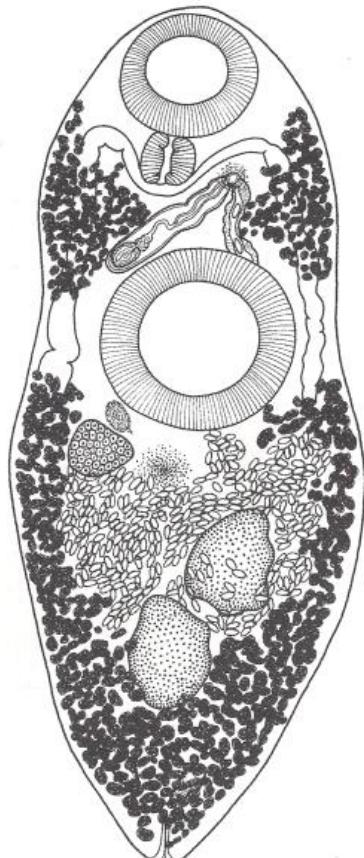


Figure 34. *Rubenstrema exasperatum*
(extrait de Tkach, 2008)

II-1-7-1 Morpho-anatomie

Rubenstrema exasperatum présente un corps allongé, mesurant environ 3070 µm de long et 910 µm de large, avec un tégument garnie d'épines. La ventouse orale (361-387 µm) est subterminale et plus petite que la ventouse ventrale (533-445 µm), qui est située dans la moitié antérieure du corps du ver. Le prépharynx, très court, est suivi d'un pharynx arrondi et d'un œsophage quasi absent. Les cœcums s'acheminent en premier vers le pharynx latéralement avant de se rabattre parallèlement vers l'extrémité postérieure du ver. Les testicules, ovales et en position diagonale, sont situés dans l'espace intercœcal au niveau de la partie post-acétabulaire et sont séparés l'un de l'autre par l'utérus. La poche du cirre, contenant un cirre bien développé, est positionnée entre le pharynx et la ventouse ventrale (sa partie postérieure atteint la marge antérieure de l'acétabulum). L'ovaire, arrondi et de localisation postéro-latérale, vient juste en arrière de la ventouse ventrale. Les follicules vitellins sont séparés en deux groupes : le premier groupe disposé entre le pharynx et le milieu de la ventouse ventrale, et le second disposé après la ventouse ventrale, atteignant la partie postérieure du ver où les follicules sont unis. L'utérus, situé entre l'acétabulum et le testicule postérieur, s'étend dans l'espace inter-testiculaire surpassant latéralement un des cœcums et renfermant de nombreux œufs de dimensions variables (59-67 µm x 29-32 µm) (Bušta & Našincová, 1991 ; Noikov, 1992).

II-1-7-2 Biogéographie

Rubenstrema exasperatum est une espèce présente particulièrement chez des insectivores (*Neomys anomalus*, *N. fodiens*, *Sorex araneus* et *S. minutus*), mais elle a été aussi citée chez l'écureuil *Sciurus vulgaris* et répertoriée dans une grande partie d'Eurasie (Autriche, République Tchèque, Sud-est de l'Allemagne, Bulgarie, Hongrie, Pologne, République Slovaque, Russie, Biélorussie) (Genov, 1984 ; Mastkasi, 1984 ; Noikov, 1992 ; Shimalov & Shimalov, 2002 ; Zbikowska, 2007 ; Faltynkova *et al.*, 2008) (voir figure 35).

II-1-7-3 Cycle biologique

La description du cycle de vie de *Rubenstrema exasperatum* a été rapportée par Bušta & Našincová (1991). Les cercaires ont été décrites chez l'escargot *Planorbarius corneus*

naturellement infecté et qui représente le premier hôte intermédiaire. Une fois libérées, ces cercaires s'enkystent expérimentalement sur des larves de moustique (*Culex molestus*), jouant ainsi le rôle de second hôte intermédiaire. Les spécimens adultes de *Rubenstrema exasperatum* sont obtenus après avoir infecté expérimentalement le hamster *Mesocricetus auratus* (hôte définitif) (figure 36).

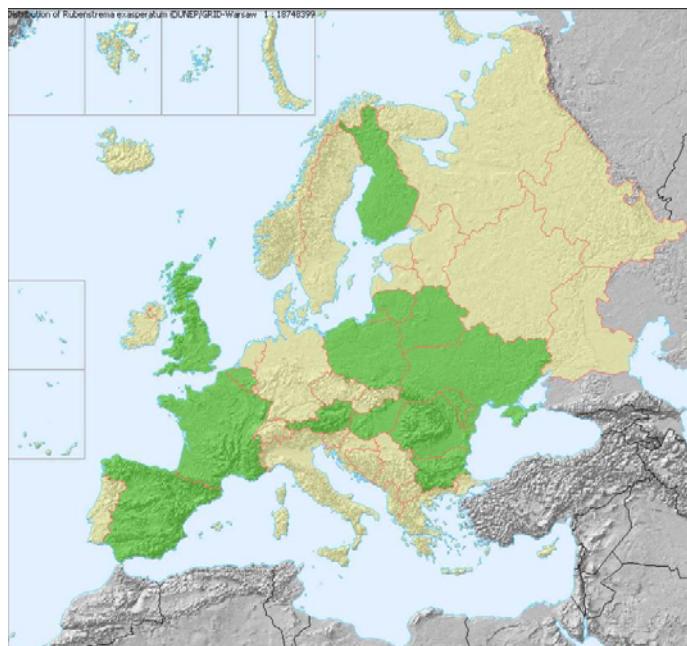


Figure 35. Distribution européenne de *Rubenstrema exasperatum*
(extrait de : <http://www.faunaeur.org>)

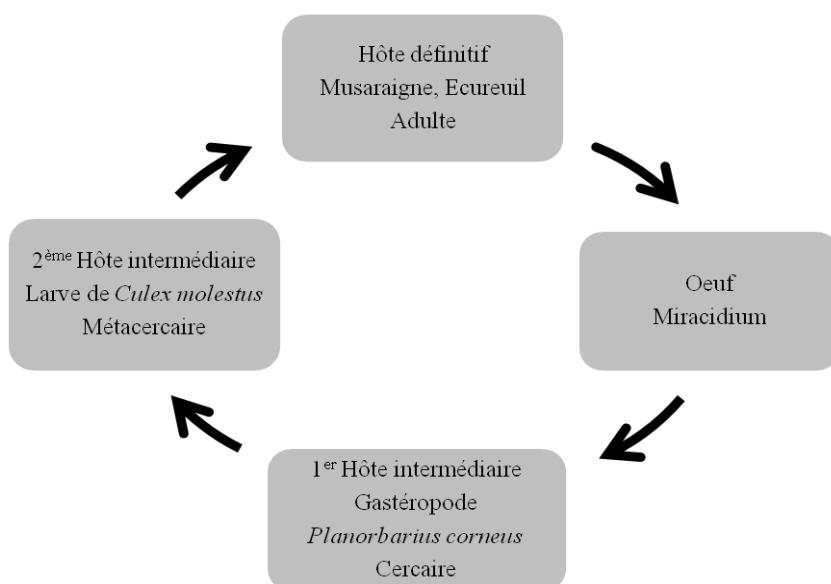


Figure 36. Cycle biologique expérimentale de *Rubenstrema exasperatum*

II-2 Méthodologie

Dans cette partie, nous exposons tout ce qui concerne la méthodologie utilisée dans notre étude. Ainsi, d'une part nous relatons les techniques helminthologiques qui nous ont permis d'aboutir à l'identification spécifique des Digènes étudiés. D'autre part, du fait de la dimension ultrastructurale du présent Mémoire, et en considérant que l'observation du matériel biologique en microscopie électronique nécessite au préalable un traitement rigoureux et particulier, nous présentons toute la méthodologie assignée à la préparation des Digènes en vue de leur observation au microscope électronique à transmission (MET) et à balayage (MEB).

II-2-1 Méthodologie helminthologique

Les techniques helminthologiques regroupent l'ensemble des processus allant de l'extraction des helminthes de leurs microhabitats parasitaires dans leurs hôtes respectifs jusqu'à leur détermination spécifique au microscope photonique. Les techniques que nous avons utilisées dans ce Mémoire correspondent aux méthodes classiques décrites antérieurement dans la littérature (Langeron, 1949a, b ; Nesemeri & Hollo, 1961 ; Melvin & Brooke, 1971 ; Feliu, 1980 ; Montoliu, 1984 ; Casanova, 1993 ; Miquel, 1993). Cependant, nous nous limitons ici à la méthodologie appliquée pour les Trématodes étudiés dans ce Mémoire, qui sont extraits de leurs hôtes récemment morts.

II-2-1-1 Extraction des helminthes

Une fois que toutes les données concernant l'hôte sont notées, nous procédons à l'extraction des helminthes ou dissection. Pour cela, nous utilisons des boites de Pétri contenant de l'eau physiologique ou eau de mer (dans le cas de la dissection des poissons) où les différents organes ciblés (cœur, foie, intestin, estomac, etc.) sont déposés séparément. Après un examen minutieux de ces différents organes à la loupe binoculaire à l'aide du matériel de dissection élémentaire (aiguilles à manche, bistouris, ciseaux, gants, pinces...), les Trématodes vivants obtenus sont isolés dans une salière contenant de l'eau physiologique ou eau de mer à l'aide de fins pinceaux (ou tout simplement pipetés lorsqu'ils sont très petits).

II-2-1-2 Fixation *in vivo*

Les techniques de fixations « *in vivo* » varient selon qu'il s'agit de Nématodes, Cestodes, Acanthocéphales ou Trématodes. Pour ces derniers, objet de notre étude, nous utilisons comme fixateur le liquide de Bouin, dont la composition est donnée ci-dessous. La technique consiste à déposer le Trématode sur une lame avec une goutte d'eau physiologique et de s'assurer qu'il soit bien étalé et qu'il ne déborde pas. Puis, nous déposons une goutte de liquide de Bouin sur la face inférieure de la lamelle (c'est-à-dire la face qui sera en contact avec le spécimen). Par la suite, la lamelle est déposée sur le Trématode. Cette opération doit s'effectuer soigneusement et sous la loupe binoculaire afin de s'assurer de la position correcte du Trématode vivant avant de déposer la lamelle. Il faut aussi veiller à ce que la préparation ne s'assèche pas, afin d'éviter une mauvaise fixation du spécimen. Cependant, si cela arrive, on peut déposer une goutte de liquide de Bouin sur la bordure de la lamelle à l'aide d'une pipette Pasteur. Le liquide de Bouin pénétrera par capillarité.

Il arrive aussi que le Trématode soit incorrectement positionné. Dans une telle situation, on peut à l'aide d'une aiguille à manche corriger sa position en donnant quelques légers coups sur la bordure de la lamelle.

Le Trématode ainsi fixé doit rester entre lame et lamelle durant environ 10 minutes. Passé ce délai, le ver est récupéré à l'aide d'un fin pinceau puis déposé dans une salière contenant du liquide de Bouin durant 30 minutes. Ensuite, nous plaçons le Trématode dans une autre salière contenant cette fois-ci de l'alcool éthylique 70° pour permettre sa décoloration suite à la couleur jaunâtre que lui confère le liquide de Bouin. Il est important de changer régulièrement le bain alcoolique jusqu'à l'élimination complète de l'excès de Bouin. Finalement, le Trématode décoloré est gardé dans un petit flacon, dûment étiqueté, contenant de l'alcool éthylique 70°.

Préparation du liquide fixateur de Bouin :

| Composants | Quantité |
|---|------------|
| Solution aqueuse saturée d'acide picrique | 75 mesures |
| Formol à 4% | 25 mesures |
| Acide acétique glacial | 5 mesures |

II-2-1-3 Coloration et différentiation

a. Coloration

La coloration est l'étape qui suit la fixation et elle vise à mettre en évidence les structures internes des Trématodes afin de bien mener le diagnostic spécifique. Elle peut se réaliser par le biais de colorants tels que : le carmin boracique de Grenacher, le carmin chlorhydrique alcoolique (surtout dans le cas des cestodes), le carmin aluminique, le carmin de Gower, l'acéto-carmin ferrique, le carmin acétique de Semichon, entre autres.

Dans le cas de notre étude nous avons utilisé le carmin acétique de Semichon, dont la composition est exposée ci-dessous.

Préparation du carmin acétique de Semichon :

| Composants | Quantité |
|------------------------|-------------|
| Acide acétique glacial | 100 ml |
| Eau ultrapure | 100 ml |
| Carmin (n° 40) c.s.p. | 2 g environ |
| Alcool éthylique 70° | 200 ml |

Au mélange acide acétique glacial et eau ultrapure, nous ajoutons du carmin jusqu'à saturation (environ 2 g). Puis, nous laissons le mélange durant 15 minutes avant de l'introduire dans un bain-marie sans arriver à l'ébullition. Ensuite, le mélange est laissé au repos (refroidissement) avant d'être filtré. Finalement, à la solution rouge-vive obtenue, nous ajoutons le même volume d'alcool éthylique 70°.

Pour la coloration des helminthes nous procédons comme suit :

Dans le cas des spécimens fixés au Bouin, il faut s'assurer de leur décoloration complète avant de les introduire dans le colorant durant 30 minutes, alors qu'avec les helminthes fixés à l'alcool nous passons directement à leur coloration durant la même période. Cette dernière fixation à l'alcool chaud a été utilisée lorsque le numéro de spécimens isolés pendant la dissection est très grand et dans ce cas, seulement une partie est fixée au Bouin.

b. Différentiation

Les vers colorés sont placés dans une solution limpide d'alcool éthylique 70° où ils sont différenciés en ajoutant goutte-à-goutte de l'acide chlorhydrique commercial pour éliminer l'excès de colorant des structures internes. Cette opération requiert une attention spéciale

puisque elle doit être contrôlée sous la loupe binoculaire (avec sa lumière supérieure et inférieure) afin de bien noter la coloration adéquate. De façon générale, on considère que la différentiation est bonne lorsque les spécimens apparaissent colorés en rose.

Une fois différenciés, les Trématodes sont déposés dans une salière contenant de l'alcool éthylique 70° durant environ 10 minutes avant d'initier la déshydratation et, postérieurement, le montage entre lame et lamelle. La déshydratation est un pas indispensable, tenant en compte que les vers sont montés dans un milieu hydrophobe comme le baume de Canada.

II-2-1-4 Déshydratation

Elle s'effectue à l'aide d'une série d'alcools éthyliques de gradient croissant et finalement du xylol comme l'indique la démarche ci-après :

Les Digènes sont placés successivement dans des salières contenant de l'alcool éthylique 70°, 80°, 90°, 96° et, finalement, alcool isopropilique ou butilique durant environ 5-10 minutes (selon la taille du Digène). Ce temps peut être réduit dans le cas de spécimens très petits.

Par la suite, les vers sont placés dans du xylol durant à peu près 5-10 minutes. Il est important que cette dernière manipulation soit contrôlée sous la loupe binoculaire du fait du pouvoir éclaircissant du xylol.

II-2-1-5 Montage entre lame et lamelle

Il consiste à placer les Trématodes entre lame et lamelle en utilisant comme liquide de montage le baume de Canada. Ce dernier doit être utilisé en quantité minimale pour éviter une grosseur excessive à la préparation, fait qui pourrait rendre difficile son observation à fort grossissement au microscope photonique.

Après leur montage, les préparations sont dûment étiquetées et placées dans l'étuve à 40-45°C (optionnelle) ou laissées à la température ambiante, jusqu'à la polymérisation du liquide de montage.

II-2-1-6 Détermination spécifique

L'objectif final de cette méthodologie est l'identification spécifique de chacune des espèces montées à l'aide du microscope photonique et de la bibliographie nécessaire. Elle s'effectue

en observant la morphologie et anatomie générale de chaque helminthe, et en réalisant les mesures opportunes avec le micromètre oculaire. Dans notre étude, en plus de l'aide des anciennes clefs d'identification des Trématodes (Dawes, 1968 ; Yamaguti, 1971 ; Schmidt, 1986 ; etc.), nous avons surtout utilisé les nouvelles clefs récemment publiées en trois volumes par Gibson *et al.* (2002), Jones *et al.* (2005) et Bray *et al.* (2008) pour arriver à la détermination générique. En plus, pour l'identification spécifique nous avons consulté d'autres articles à l'image de ceux de Mas-Coma & Rocamora (1978) ou Bartoli (1987), entre autres.

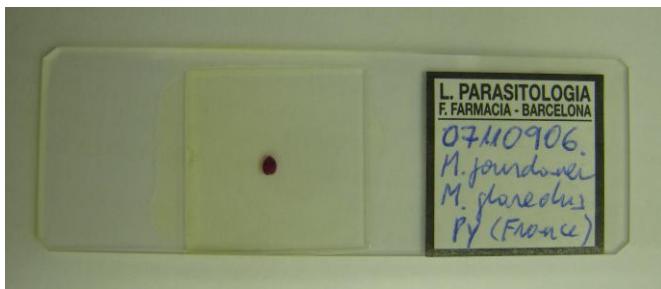


Figure 37. Lame de *Mediogonimus jourdanei*



Figure 38. *Euryhelmis squamula* traité au carmin de Semichon

II-2-2 Protocole pour l'observation au microscope électronique à transmission (MET)

L'observation du matériel helminthologique au MET requiert au préalable une préparation adéquate dudit matériel afin de pouvoir l'observer dans des conditions ressemblant le plus possible aux conditions « *in vivo* ». Pour cela, il est fondamental que les parasites soient bien vivants et qu'ils proviennent des hôtes fraîchement morts. Cet état frais des parasites permettrait d'éviter une éventuelle altération de leurs structures internes.

Une fois que les parasites sont isolés et placés dans une salière contenant de l'eau physiologique ou eau de mer (selon le cas), nous procédons à leur traitement en suivant les différentes étapes exposées ci-dessous.

II-2-2-1 Fixation

La fixation est une des étapes les plus importantes pour la bonne observation du matériel biologique. Elle consiste à utiliser un fixateur qui :

1. gardera intactes les structures cellulaires ;
2. occasionnera le moins d'altérations possibles au niveau des différentes structures du matériel biologique ;
3. maintiendra le volume, la morphologie et la relation spatiale de l'échantillon avec une perte minimale des éléments tissulaires ;
4. et protègera l'échantillon lors des manipulations postérieures (déshydratation, faisceau d'électrons, vide, etc.).

En plus de ces exigences, le fixateur devra répondre également à un certain nombre de facteurs tels que :

1. le pouvoir pénétrant (plus c'est rapide, mieux c'est) ;
2. la taille de l'échantillon : importante, car la fixation rapide et effective se fait sur une profondeur avoisinant 0,25 mm. Il est alors important que l'échantillon à fixer ait un volume inférieur ou égal à 0,5 mm³. Pour des volumes supérieurs, il est recommandé de sectionner l'échantillon ;
3. la composition ionique et la température à laquelle se réalise la fixation.

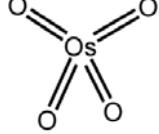
Ainsi, des fixateurs tels que les monoaldéhydes (paraformaldéhyde), dialdéhydes (glutaraldéhyde) et le tétr oxyde d'osmium sont utilisés de nos jours pour les matériaux biologiques comme les parasites étudiés dans ce Mémoire.

Pour ce qui est de notre étude, nous réalisons une double fixation des spécimens. Comme préfixateur nous utilisons une solution de glutaraldéhyde 2,5% dans du tampon cacodylate de sodium 0,1M à pH 7,4, durant un minimum de deux heures et à 4°C (à ce stade le matériel peut être conservé durant de longues périodes au froid). Ensuite, après trois lavages successifs de 15 minutes avec la solution tampon cacodylate de sodium 0,1M à pH 7,4, nous procédons à la post-fixation avec une solution de tétr oxyde d'osmium 1% dans le même tampon cacodylate de sodium durant une heure au froid (4°C).

Une fois immergés dans le tétr oxyde d'osmium, les échantillons prennent une teinte noirâtre.

La préparation des différentes solutions fixatrices s'effectue de la manière suivante :

| Glutaraldéhyde | Mélange |
|--|---|
| Formule : $\text{H}-\underset{\text{O}}{\overset{ }{\text{C}}}-\text{(CH}_2)_3-\underset{\text{O}}{\overset{ }{\text{C}}}-\text{H}$ | 1 ml de glutaraldéhyde 25% 4 ml d'eau ultrapure 5 ml de tampon cacodylate de sodium 0,2M à pH 7,4 |
| Solution préfixatrice : 10 ml de glutaraldéhyde 2,5% dans du cacodylate de sodium 0,1M à pH 7,4 | |

| Tétroxyde d'osmium | Mélange |
|--|--|
| Formule :  | 1 ml de tétroxyde d'osmium 4% 1 ml d'eau ultrapure 2 ml de tampon cacodylate de sodium 0,2M à pH 7,4 |
| Solution post-fixatrice : 4 ml de tétroxyde d'osmium 1% dans du cacodylate de sodium 0,1M à pH 7,4 | |



Dû à la toxicité de ces réactifs et surtout celle du tétroxyde d'osmium, il est recommandé de les manipuler avec des gants et sous une hotte aspirante.

II-2-2-2 Déshydratation et inclusion

a. Déshydratation

Le but de la déshydratation est de substituer l'eau intracellulaire non miscible à la résine Spurr (utilisé dans notre étude) par l'éthanol et l'oxyde de propylène. Pour cela, nous procédons après trois lavages avec la solution tampon cacodylate de sodium 0,1M à pH 7,4, à une série de déshydratation en utilisant des éthanols de gradient croissant et l'oxyde de propylène. La figure 39 montre le mode opératoire utilisé, ainsi que la durée d'immersion respective des Digènes.

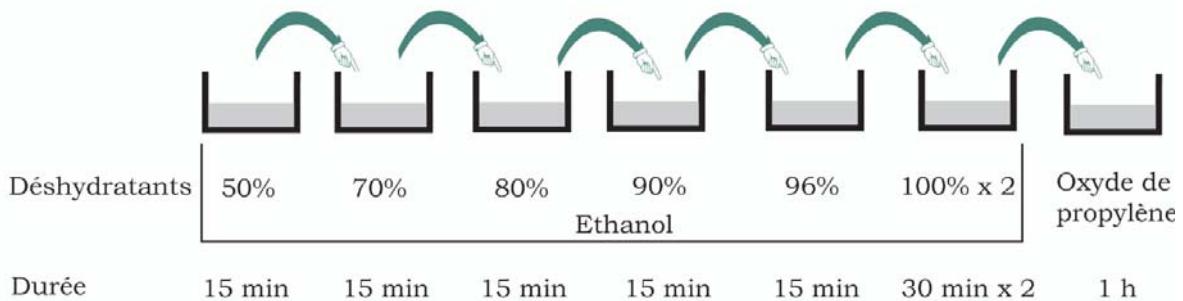


Figure 39. Protocole de déshydratation du matériel

b. Inclusion

Elle se fait à l'aide de substances d'inclusion qui sont des liquides visqueux sous forme de monomères polymérisables grâce à des agents chimiques (initiateurs, catalyseurs, accélérateurs) et physiques (chaleur, radiations, rayons UV).

Dans notre étude, nous avons utilisé la résine Spurr-ERL (Spurr, 1969) qui, de par ses propriétés (insoluble dans l'eau, ne change pas de volume au cours de la polymérisation, stable sous le faisceau d'électrons, polymérisable à 60°C...), est recommandée pour ces genres d'études. D'autres types de résine Epoxy (Araldite, Epon) ou les méthacrylates (LR white, LR Gold, Lowicryls, Unicryl,...) peuvent également être utilisés.

La résine Spurr se prépare avec des composants commerciaux comme l'indique sa composition ci-dessous.

| Composants | Quantité |
|--|----------|
| (2-nonen-1-yl) succinic anhydride (NSA) SIGMA N-7644 | 26 g |
| Vinyl cyclohexene dioxyde (ERL 4206) SIGMA V-3630 | 10 g |
| Polypropylène glycol diglycid ether (DER Resin 736) SIGMA D-8165 | 6 g |
| Dibutyl phthalate (DBP) Durcupan ACM FLUKA 44614 | 0,8 g |
| 2-dimethylaminoethanol (DMAE S-1) SIGMA D-4256 | 0,4 g |

La résine obtenue est soumise à une légère agitation, et cette opération est répétée avant chaque utilisation.

L'inclusion quant à elle s'effectue en deux étapes : l'infiltration et l'inclusion proprement dite.

L'infiltration se réalise de manière progressive, afin de viser une pénétration parfaite et homogène de la résine dans les tissus du matériel biologique (Trématodes dans notre cas). Pour cela, la résine Spurr est mélangée progressivement dans proportions différentes avec l'oxyde de propylène (OxP) (voir figure 40).

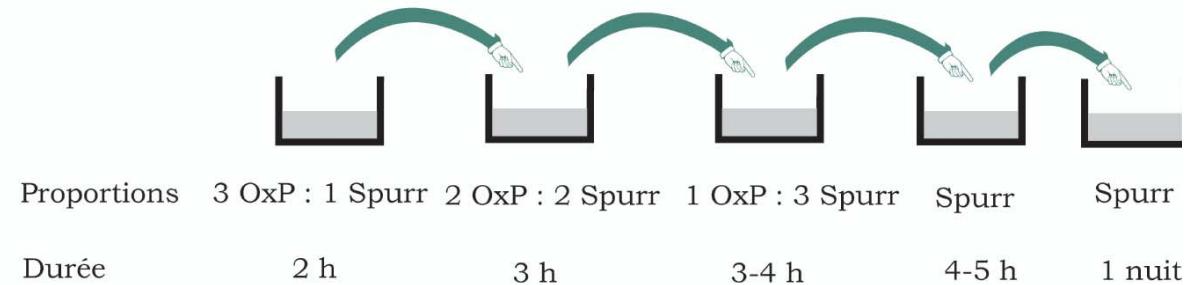


Figure 40. Protocole d'infiltration du matériel dans de la résine Spurr

Il est important d'utiliser un agitateur (orbital ou tangentiel) pour le bon déroulement de l'infiltration.

Après la dernière étape de cette infiltration, les échantillons sont inclus en utilisant des moules en silicones (figure 41) où sont déposés les spécimens accompagnés de leur étiquette identificatrice. Ces moules sont par la suite placées dans l'étuve durant 48-72 heures pour permettre à la résine de polymériser. Durant cette opération, il est important d'effectuer une bonne orientation du matériel en question dans le bloc, afin de faciliter postérieurement la localisation des zones d'intérêt. Pour cela, une connaissance de la morpho-anatomie de chacune des spécimens étudiés s'avère déterminante.

Les différents blocs obtenus et correctement identifiés sont stockés jusqu'au moment de continuer avec la microtomie (figure 42).



Figure 41. Moule en silicium

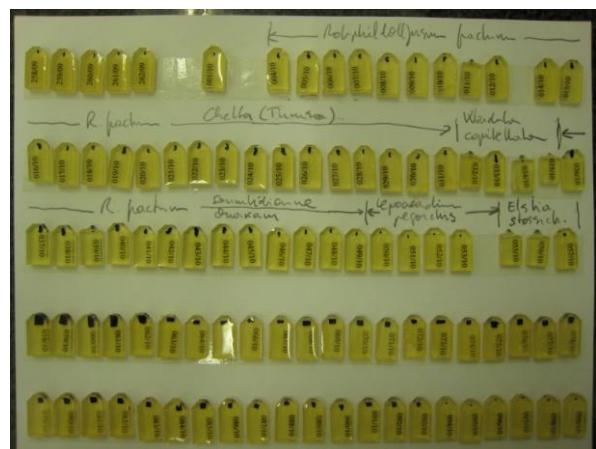


Figure 42. Stockage des blocs

II-2-2-3 Microtomie

a. Pyramitome

La « *pyramidation* » du bloc est une étape préliminaire avant la réalisation des coupes semifines qui vise à tailler l'extrémité du bloc contenant le matériel biologique en forme de pyramide en utilisant le pyramitome. Pour cela, nous éliminons l'excès de résine située sur les bords de la pyramide contenant l'échantillon (figure 43).

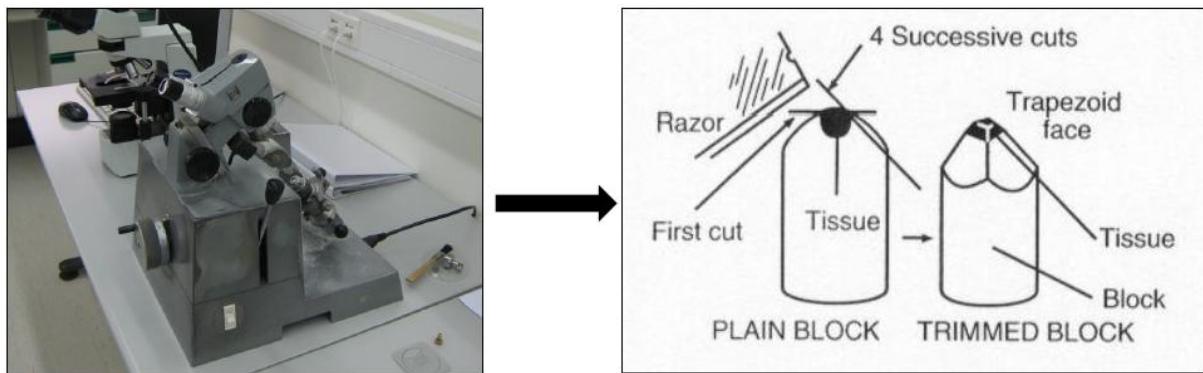


Figure 43. Taillage du bloc avec le pyramitome Reichert TM-60

b. Semifine

Après avoir pyramidé le bloc, nous procédons à la localisation des zones d'intérêt pour l'étude en microscopie électronique à transmission. Il s'agit du testicule pour ce qui concerne la spermiogenèse et de la vésicule séminale pour le cas de l'étude du spermatozoïde. Pour mener à bien cette manipulation, nous avons utilisé l'ultramicrotome (figure 44) pour la réalisation aussi bien des coupes semifines que celles ultrafines.

Les semifines sont préparées à l'aide d'un couteau en verre obtenu en se servant du « *knifemaker* » (figure 45) et leur épaisseur varie entre 0,5 à 1 µm.



Figure 44. Ultramicrotome Reichert-Jung Ultracut E



Figure 45. « Knifemaker » Leica EM KMR2

Les semifines ainsi obtenues, sont déposées sur une lame porte-objet, colorées avec un mélange de bleu de méthylène 1% et du borax 1% durant à peu près 10 secondes, lavées à l'eau, séchées sur une plaque chauffante et finalement observées au microscope photonique pour vérifier la localisation des zones d'intérêt (figure 46A et B).

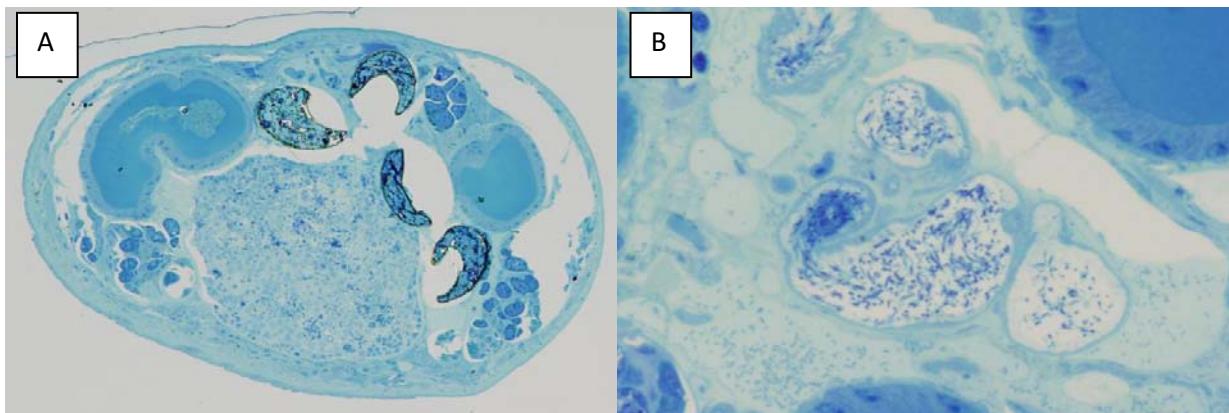


Figure 46. Coupes semifines montrant la zone testiculaire (A) et les spermatozoïdes dans la vésicule séminale (B) chez *Diplodiscus subclavatus*

II-2-2-4 Ultramicrotomie

Après avoir localisé les zones d'intérêt, le bloc est à nouveau « repyramidé » avant de procéder à la réalisation des coupes ultrafines. Cette opération vise à amoindrir les dimensions de la pyramide en vue d'éviter la rupture des futures coupes ultrafines due à leurs épaisseurs très fines.

Il est possible, mais très difficile, d'obtenir de parfaites coupes ultrafines avec le couteau en verre, dû à l'épaisseur très mince de ces coupes ultrafines qui sont de l'ordre de 60-90 nm. Pour cette raison, nous avons utilisé le couteau en diamant pour la réalisation des ultrafines comme l'indique la démarche ci-dessous :

1. placer le bloc dans le porte-bloc de l'ultramicrotome ;
2. utiliser un couteau en verre pour orienter le bloc et puis le remplacer par celui en diamant muni d'une « piscine » (figure 47) ;
3. remplir la « piscine » d'eau ultrapure en ajustant son niveau de façon à ce que la surface de l'eau réfléchisse la lumière ;
4. lancer le moteur pour la réalisation des coupes automatiquement et, après avoir obtenu plusieurs coupes, passer à leur sélection à l'aide du tableau de correspondance des couleurs (figure 48). De façon générale, les coupes de couleur argentée sont considérées comme ayant une bonne épaisseur (60-90 nm) ;

5. étirer les coupes ultrafines avec de la vapeur de xylol. Pour cela, nous déposons une goutte de xylol sur un papier filtre. Il est important ici de ne pas toucher ni l'eau de la « piscine » ni le couteau ;
6. regrouper un nombre suffisant de coupes argentées (10 par exemple) à l'aide d'un cil monté sur un brin et puis, récupérer les coupes sur une grille de 200-300 mesh (en cuivre ou en or) en la faisant glisser sous les coupes ;
7. éliminer l'excès d'eau en déposant la grille sur un papier filtre.

Dans le cas où le matériel se rompt (par exemple quand il contient des œufs), il est préférable que ces coupes ultrafines soient déposées sur une membrane de carbone ou de plastique (membrane de « *formvar* »).

Les grilles utilisées servent de support pour les ultrafines lors de leur observation au MET.

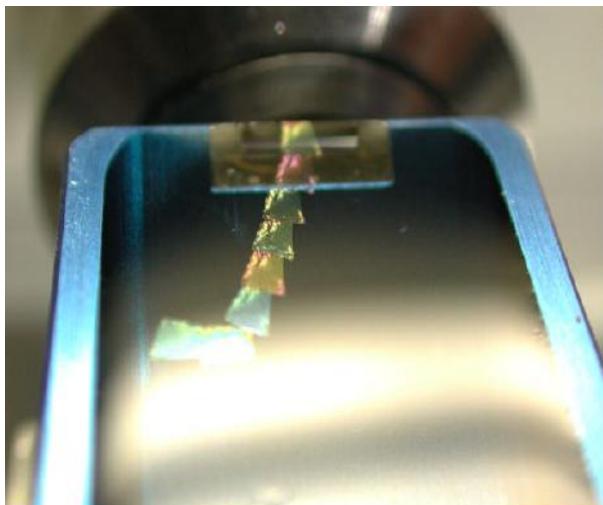


Figure 47. Coupes ultrafines baignant dans la « piscine » du couteau en diamant

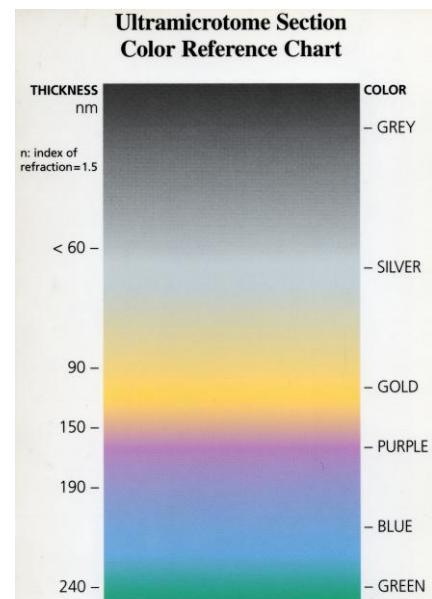


Figure 48. Tableau de correspondance des couleurs

II-2-2-5 Contraste et observation

Avant leur observation au microscope électronique à transmission, les coupes doivent préalablement être contrastées pour mettre en évidence les différents composants des tissus. Si elles ne sont pas contrastées, on voit à peine les structures biologiques. Ainsi, pour contraster les ultrafines, nous utilisons successivement différents sels de métaux lourds intercalés par des rinçages selon la méthodologie de Reynolds (1963) :

- déposer la grille (face supérieure contenant les coupes en contact avec la goutte) sur une goutte d'acétate d'uranyle (solution aqueuse à 2%) à l'obscurité durant 30 minutes ;
- rincer la grille avec de l'eau ultrapure avant de la sécher sur un papier filtre ;
- redéposer la grille sur une goutte de citrate de plomb dans une boîte hermétique où sont déposées des pastilles de soude permettant de capter l'humidité du milieu ;
- rincer à nouveau la grille avec de l'eau ultrapure et la sécher sur un papier filtre.

Préparation des solutions :

- Acétate d'uranyle (solution aqueuse 2%) :

0,1 g dans 5 ml d'eau ultrapure. Cette préparation nécessite 30 minutes pour la dissolution.

- Citrate de Plomb (Reynolds, 1963)

| | |
|--|--------|
| Pb(NO ₃) ₂ | 1,33 g |
| Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇). 2 H ₂ O..... | 1,76 g |
| H ₂ O ultrapure..... | 30 ml |

Mélanger durant 30 minutes tous ces composants, puis ajouter à la solution obtenue 8 ml de NaOH 1N 4% avant de la compléter à 50 ml avec de l'eau ultrapure.

Après avoir contrasté les grilles, ces dernières sont observées au microscope électronique à transmission avec une accélération de 80 kV. Le microscope que nous avons utilisé est pourvu d'un système de digitalisation, ce qui facilite l'étude grâce à l'obtention des images en format TIFF (figure 49).



Figure 49. Microscope électronique à transmission
JEOL 1010

II-2-2-6 Technique de Thiéry

Cette technique a été élaborée en 1967 par Jean Paul Thiéry pour mettre en évidence les mucopolysaccharides et glycoprotéines intracellulaires (glycogène dans notre cas). Pour cela, les ultrafines doivent impérativement être déposées sur des grilles en or. Ainsi, le protocole s'articule de la manière suivante :

- les grilles sont placées dans une solution d'acide périodique à 10% (dans de l'eau ultrapure) durant 20-30 minutes ;
- ensuite, nous procédons à trois lavages successifs de 10 minutes avec de l'eau ultrapure ;
- puis, les grilles sont introduites dans une solution de thiocarbohydrazide à 0,2% en acide acétique à 20% durant 24 heures (mise en évidence des mucopolysaccharides et du glycogène). Cette durée peut être réduite à 30-45 minutes pour mettre en évidence seulement la présence de glycogène ou allongée de 48-72 heures pour la mise en évidence des glycoprotéines ;
- après, nous lavons à nouveau les grilles avec de l'acide acétique et de l'eau ultrapure, de la manière suivante :

| Lavages | Temps |
|-------------------------------|------------|
| Acide acétique 10% | <1 min x 2 |
| Acide acétique 10% | 15 min x 2 |
| Acide acétique 5% | 5 min x 1 |
| Acide acétique 1% | 5 min x 1 |
| Eau ultrapure | 10 min x 3 |
| Eau ultrapure goutte à goutte | < 1 min |

- par la suite, les grilles sont placées dans une solution de protéinate d'argent à 1% (dans de l'eau ultrapure) préparée 20-30 minutes à l'avance, durant 30 minutes en maintenant la solution à l'abri de la lumière ;
- ensuite, nous réalisons 5 lavages de 10 minutes chacun, à l'eau ultrapure pour éviter la précipitation de la solution de protéinate d'argent ;
- finalement, nous procédons au séchage des grilles avant de passer à leur observation au MET (figure 49).

II-2-3 Protocole pour l'observation au microscope électronique à balayage (MEB)

L'observation au microscope électronique à balayage a été réalisée pour le spermatozoïde de *Mediogonimus jourdanei*. Elle permet d'évaluer en plus de la morphologie externe du spermatozoïde, la longueur de celui-ci. Pour mener à bien ce protocole, les préparations préliminaires du matériel biologique sont effectuées de la manière suivante.

II-2-3-1 Fixation

Une fois les parasites isolés, nous les plaçons dans une salière contenant de l'eau physiologique. Ainsi donc, nous isolons un spécimen dans une salière contenant une solution de Tyrode (voir mode de préparation) préparée au préalable. Puis, sous la loupe binoculaire et à l'aide de bistouri, nous séparons la portion contenant la vésicule séminale du reste du ver. Après avoir dilacéré cette portion contenant la vésicule séminale, nous laissons au repos la

solution obtenue pendant environ 10-15 minutes à 37°C. Durant ce temps, les spermatozoïdes se libèrent dans la solution de Tyrode (Bedford, 1975).

| Solution A | Solution B |
|--|--|
| - NaCl.....20 g | - NaHCO ₃5 g |
| - KCl.....0,5 g | - NaH ₂ PO ₄0,25 g |
| - CaCl ₂ . 6H ₂ O.....0,5 g | - Eau ultrapure c.s.p.100 ml |
| - MgCl ₂ . 6H ₂ O.....0,25 g | |
| - Eau ultrapure c.s.p.100 ml | |

Pour préparer 500 ml de Tyrode nous mélangeons :

(20 ml solution A + 230 ml eau ultrapure) + (10 ml solution B + 240 ml eau ultrapure)

Passé ce temps, nous procédons à la fixation avec une solution de glutaraldéhyde à 2% dans du tampon phosphate 0,1M à pH 7,4. Pour cela, une solution fixatrice de glutaraldéhyde à 8% est préparée, et la fixation se fait en maintenant le rapport en volume (1 volume d'échantillon pour 3 volumes du fixateur) dans un tube « *eppendorf* » et à l'aide d'une pipette Pasteur.

Une fois le fixateur ajouté, nous agitons légèrement le tube afin d'homogénéiser son contenu et le laissons pendant un minimum de 15 minutes à 4°C. Nous procédons par la suite à la centrifugation entre 500 et 1000 rpm pour obtenir une précipitation des spermatozoïdes en forme de « *pellet* ». Ce « *pellet* » est à nouveau fixé directement avec du glutaraldéhyde à 2% dans du même tampon durant un minimum de 2 heures.

Postérieurement, nous réalisons 3 lavages de 5 minutes avec du tampon phosphate à 4°C.

Optionnellement, on peut aussi à ce stade « *osmifier* » l'échantillon avec une solution de tétr oxyde d'osmium à 1% dans du tampon phosphate 0,1M à pH 7,4 pendant 1 heure à 4°C.

Après 4 lavages de 5 minutes avec de l'eau ultrapure à 4°C, nous déposons 100 µl d'échantillon sur un porte-objet avec de la poly-L-lysine et laissons la solution durant 20-30 minutes.

Optionnellement, on peut aussi déposer l'échantillon sur un filtre de polycarbonate et le laisser sécher.

II-2-3-2 Déshydratation et point critique

Avant la réalisation du point critique, nous effectuons une série de déshydratation graduelle de l'échantillon à l'aide d'alcools éthyliques de gradient croissant comme l'indique le tableau suivant :

| Déshydratants | Durée |
|---------------|------------|
| Ethanol 50° | 10 min |
| Ethanol 70° | 10 min |
| Ethanol 80° | 10 min |
| Ethanol 90° | 10 min |
| Ethanol 96° | 2 x 10 min |
| Ethanol 100° | 3 x 10 min |

Finalement, pour le séchage de l'échantillon, nous procédons à la réalisation du point critique dans du CO₂ ou en utilisant l'hexamethyldisilazane.

Cette opération a été réalisée grâce à l'utilisation du « *critical point drying* » (figure 50).



Figure 50. « *Critical point drying* » Polaroid CPD 7501

II-2-3-3 Montage et recouvrement

Le montage se réalise avec des porte-échantillons pour microscope électronique à balayage où nous déposons le matériel biologique. Une fois montée, la préparation est introduite dans le « *sputtering* » (figure 51) pour la recouvrir avec une couche d'or d'épaisseur comprise entre 15-20 nm.



Figure 51. « *Sputtering* » Fisons Instruments SC 510

II-2-3-4 Observation

L'observation est effectuée au MEB avec une accélération de 15 kV et à une distance de travail de 4 mm. Comme dans le cas du microscope électronique à transmission, le microscope électronique à balayage que nous avons utilisé est aussi pourvu d'un système de digitalisation qui permet l'obtention des images en format TIFF (figure 52).



Figure 52. Microscope électronique à balayage ZEISS DSM 940 A

TROISIÈME CHAPITRE :

RÉSULTATS

III- Résultats

Dans ce chapitre nous exposons, sous forme de publications, nos résultats obtenus concernant l'étude ultrastructurale de la spermiogenèse et/ou du spermatozoïde des huit espèces de Digènes.

En amont de chacune des publications, classées par ordre alphabétique, parues ou à paraître dans des revues internationales, nous présentons un résumé détaillé et des mots clés en français.

La liste des huit articles correspondant aux huit espèces, appartenant à sept familles et superfamilles différentes, est présentée ci-dessous :

- 1- **Bakhoum A.J.S., Ribas A., Eira C., Bâ C.T. & Miquel J. (sous presse).** *Brachycoelium salamandrae* (Frölich, 1789) (Digenea : Brachycoeliidae) : ultrastructural study of spermiogenesis and the mature spermatozoon. *Zoologischer Anzeiger*.
- 2- **Bakhoum A.J.S., Torres J., Shimalov V.V., Bâ C.T. & Miquel J. (2011).** Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) (Paramphistomoidea, Diplodiscidae), an intestinal fluke of the pool frog *Rana lessonae* (Amphibia, Anura). *Parasitology International*, **60**(1) : 64-74.
- 3- **Bakhoum A.J.S., Ndiaye P.I., Bâ C.T. & Miquel J. (sous presse).** Spermatological characteristics of *Elstia stossichianum* (Digenea, Mesometridae) from the intestine of the cow bream (*Sarpa salpa*) off Dakar, Senegal. *Journal of Helminthology*.
- 4- **Bakhoum A.J.S., Bâ C.T., Fournier-Chambrillon C., Torres J., Fournier P. & Miquel J. (2009).** Spermatozoon ultrastructure of *Euryhelmis squamula* (Rudolphi, 1819) (Digenea, Opisthorchioidea, Heterophyidae), an intestinal parasite of *Mustela vison* (Carnivora, Mustelidae). *Revista Ibero-latinoamericana de Parasitología*, **68**(1) : 37-45.
- 5- **Bakhoum A.J.S., Feliu C., Bâ C.T. & Miquel J. (2012).** Spermiogenesis and spermatozoon of the liver fluke *Mediogonimus jourdanei* (Microphalloidea : Prosthogonimidae), a parasite of *Myodes glareolus* (Rodentia : Cricetidae). *Folia Parasitologica*, **59**(1) : 32-42.

- 6- **Bakhoum A.J.S., Sène A., Ndiaye P.I., Bâ C.T. & Miquel J. (2012).**
Spermiogenesis and the spermatozoon ultrastructure of *Robphildolfusium fractum* (Digenea : Gyliachenidae), an intestinal parasite of *Sarpa salpa* (Pisces : Teleostei). *Comptes Rendus Biologies*, **335**(7) : 435-444.
- 7- **Bakhoum A.J.S., Bâ C.T., Shimalov V.V., Torres J. & Miquel J. (2011).**
Spermatological characters of the digenetic *Rubenstrema exasperatum* (Rudolphi, 1819) (Plagiorchioidea, Omphalometridae). *Parasitology Research*, **108**(5) : 1283-1293.
- 8- **Bakhoum A.J.S., Ndiaye P.I., Sène A., Bâ C.T. & Miquel J. (2012).**
Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of *Wardula capitellata* (Digenea, Mesometridae) an intestinal parasite of the sparid teleost *Sarpa salpa* in Senegal. *Acta Parasitologica*, **57**(1) : 34-45.

III-1 *Brachycoelium salamandrae* (Frölich, 1789) (Digenea : Brachycoeliidae) : étude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde

Résumé

Les caractères ultrastructuraux de la spermiogenèse et du spermatozoïde de *Brachycoelium salamandrae* sont décrits au microscope électronique à transmission.

La spermiogenèse débute par la formation d'une zone de différentiation qui contient le noyau, plusieurs mitochondries et les deux centrioles associés chacun à une racine striée et séparés par un corps intercentriolaire. Les deux centrioles développent deux flagelles libres qui croissent orthogonalement à l'expansion cytoplasmique médiane avant de fusionner avec cette dernière. La spermiogenèse prend fin avec la constriction de l'anneau de membranes arquées et la libération du jeune spermatozoïde. Durant cette dernière étape, est observée au niveau des centrioles la présence d'un matériel piriforme opaque aux électrons.

Le spermatozoïde de *B. salamandrae* présente deux axonèmes de type 9+'1' des Trepaxonemata, un noyau, deux champs de microtubules corticaux parallèles et des granules de glycogène. En outre, le spermatozoïde de *B. salamandrae* exhibe des ornementations externes de la membrane plasmique et des corps en forme d'épine. Dans cette étude sont discutés et comparés les caractères les plus significatifs du spermatozoïde de *B. salamandrae* avec ceux d'autres espèces appartenant à la superfamille Gorgoderoidea.

Mots clés :

Brachycoelium salamandrae, Brachycoeliidae, Gorgoderoidea, Digenea, Spermiogenèse, Spermatozoïde, Ultrastructure



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Zoologischer Anzeiger

journal homepage: www.elsevier.de/jcz

Zoologischer Anzeiger

Brachycoelium salamandrae (Frölich, 1789) (Digenea: Brachycoeliidae): Ultrastructural study of spermiogenesis and the mature spermatozoon

Abdoulaye J.S. Bakhoum^{a,b}, Alexis Ribas^c, Catarina Eira^{d,e}, Cheikh Tidiane Bâ^f, Jordi Miquel^{a,b,*}

^a Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Spain

^b Institut de Recerca de la Biodiversitat, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona, Spain

^c Evolutionary Ecology Group, Department of Biology, University of Antwerp, Groenenborgerlaan, 171, 2020 Antwerp, Belgium

^d CESAM & Departamento de Biología, Universidade de Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

^e Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem, Estação de Campo de Quiaios, Apartado 16 EC Quiaios, 3081-101 Figueira da Foz, Portugal

^f Laboratory of Evolutionary Biology, Ecology and Management of Ecosystems, Faculty of Sciences and Techniques, Cheikh Anta Diop University of Dakar, Senegal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 April 2012

Received in revised form 16 May 2012

Accepted 21 May 2012

Corresponding Editor: Sorensen.

Keywords:

Brachycoelium salamandrae

Brachycoeliidae

Gorgoderoidea

Digenea

Spermiogenesis

Spermatozoon

Ultrastructure

ABSTRACT

Ultrastructural characters of spermiogenesis and the mature spermatozoon of *Brachycoelium salamandrae* are described by means of transmission electron microscopy. Spermiogenesis begins with the formation of a differentiation zone containing a nucleus, several mitochondria, and two centrioles associated with striated rootlets and with an intercentriolar body between them. The two centrioles originate two free flagella that grow orthogonally to the median cytoplasmic process before fusing with it. The final stage of spermiogenesis is characterized by a constriction of the ring of arched membranes and the liberation of the young spermatozoon. In this final stage a pear shaped electron-dense material appears at the level of centrioles. Spermatozoon of *B. salamandrae* exhibits two axonemes of different length with the 9+1' trepanemata pattern, a nucleus, two mitochondria, two bundles of parallel cortical microtubules and granules of glycogen. Additionally, the spermatozoon of *B. salamandrae* shows external ornamentations of the plasma membrane and spinelike bodies. The most relevant spermatozoon characters of *B. salamandrae* are discussed and compared with those of other species belonging to the superfamily Gorgoderoidea.

© 2012 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

Brachycoeliid are a group of digeneans that includes only five genera parasitizing the intestine, gall-bladder and bile ducts of amphibians and reptiles, but also mammals (Pojmańska, 2008). However, brachycoeliids have been considered by several authors as a subfamily, the Brachycoeliinae Looss, 1899 within the family Dicrocoeliidae Looss, 1899 or Lepodermatidae Looss, 1899, while other authors supported its erection to a family status, the Brachycoeliidae Looss, 1899 (see Bray and Blair, 2008; Pojmańska, 2008).

For understanding digenetic relationships, several authors have proposed to use ultrastructural characters of spermiogenesis and/or the mature spermatozoon (Miquel et al., 2000, 2006; Levron et al., 2003, 2004a,b; Ndiaye et al., 2003a, 2004, 2011; Quilichini et al., 2007a,b,c, 2010a,b; Bakhoum et al., 2011a,b). Thus, following the contributions produced over the last years, our study presents

new data on the Digenea. In fact, we describe for the first time the spermatological characters of *Brachycoelium salamandrae* (Frölich, 1789), which belongs to the unexplored family Brachycoeliidae. Additionally, our results are compared with those of other species belonging to the superfamily Gorgoderoidea Looss, 1899 in which Brachycoeliidae are included.

2. Materials and methods

Live specimens of *B. salamandrae* were collected from the intestine of a naturally infected *Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758), a road-killed individual found in Santa Fe del Montseny (Barcelona, Spain) and immediately transported to the laboratory of Parasitology of University of Barcelona for necropsy and extraction of parasites. After dissection, the collected specimens were routinely processed for transmission electron microscopy examination. They were fixed in cold (4 °C) with 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4 for a minimum of 2 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4, post-fixed in cold (4 °C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4, dehydrated in an ethanol series and propylene oxide, embedded in Spurr resin and finally polymerized at 60 °C for 72 h. Ultrathin sections were

* Corresponding author at: Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n, E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 402 45 00; fax: +34 93 402 45 04.

E-mail address: jordimiquel@ub.edu (J. Miquel).

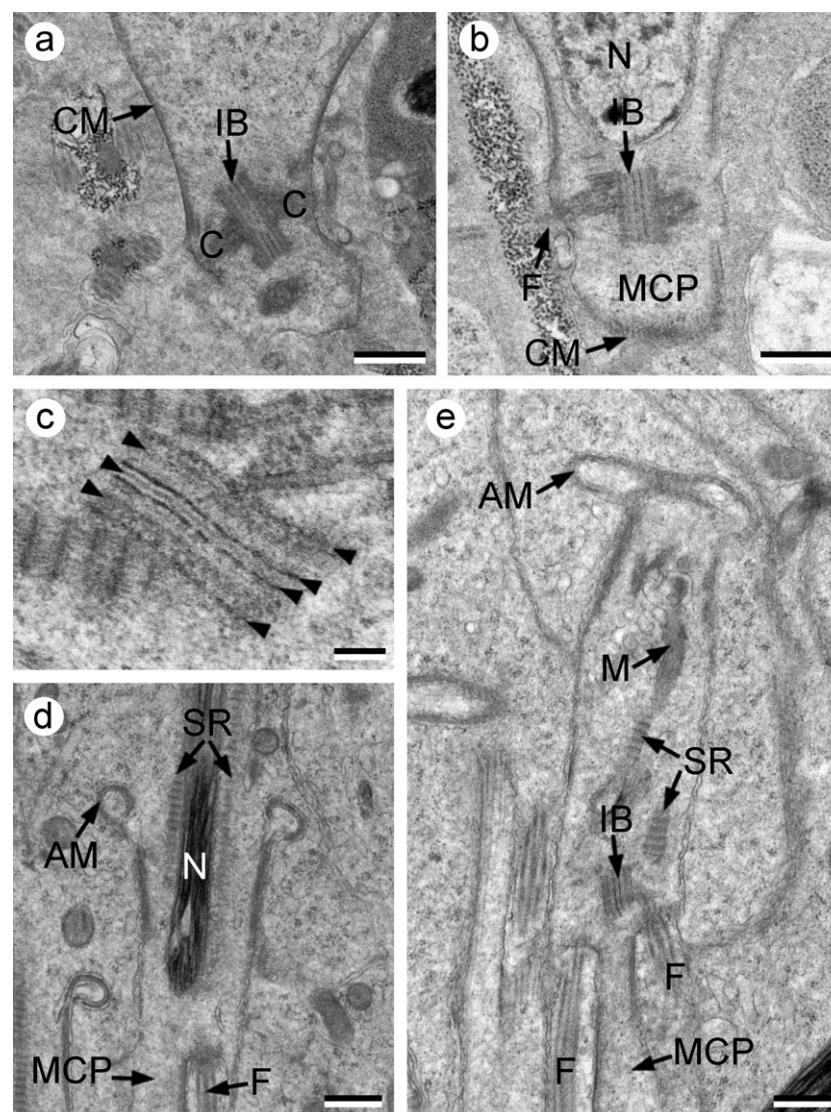


Fig. 1. (a–e) Spermiogenesis of *Brachycoelium salamandrae*. (a and b) Differentiation zone showing the elongation of the median cytoplasmic process (MCP) and the nucleus (N). C, centrioles; CM, cortical microtubules; F, flagellum; IB, intercentriolar body. Scale bars = 0.5 μm. (c) Detail of the intercentriolar body exhibiting seven electron-dense layers (arrowheads). Scale bar = 0.2 μm. (d) Longitudinal section showing nuclear migration. AM, arched membranes; F, flagellum; MCP, median cytoplasmic process; N, nucleus; SR, striated rootlets. Scale bar = 0.5 μm. (e) Longitudinal section before proximodistal fusion in which flagella (F) are parallel to the median cytoplasmic process (MCP). Note also mitochondria (M) in migration. AM, arched membranes; IB, intercentriolar body; SR, striated rootlets. Scale bar = 0.5 μm.

made using a Reichert-Jung Ultracut-E ultramicrotome, placed on copper grids, and double-stained with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds (1963) methodology. Gold grids were also made in order to reveal the presence of glycogen according to Thiéry (1967) technique. They were treated in periodic acid, thiocarbohydrazide and silver proteinate (PA-TCH-SP) as follows: 30 min in 10% PA, rinsed in Milli-Q water, 24 h in TCH, rinsed in acetic solutions and Milli-Q water, 30 min in 1% SP in the dark, and rinsed in Milli-Q water. Finally, all ultrathin sections were studied with a JEOL 1010 transmission electron microscope operated at 80 kV.

3. Results

3.1. Spermiogenesis

Spermiogenesis of *B. salamandrae* is illustrated in Figs. 1a–e, 2a–e and 3a–d. It begins with the formation of the differentiation zone, an area surrounded by a submembranous layer of cortical microtubules (Fig. 1a). This zone of differentiation

contains a pair of centrioles each bearing an associated striated rootlet and with an intercentriolar body between them (Figs. 1a, b and 3a, b). The intercentriolar body is formed by seven electron-dense layers (Fig. 1c). In an early stage of spermiogenesis, centrioles originate two free flagella growing orthogonally to the median cytoplasmic process longitudinal axis and rotating toward the median cytoplasmic process (Figs. 1b, d, e and 3a–c). When both flagella are nearly parallel to the median cytoplasmic process, the migrating nucleus and mitochondria are observed in the proximal area of the differentiation zone (Figs. 1d, e and 3d). Before the proximodistal fusion of the free flagella four attachment zones are already observed in the median cytoplasmic process (Fig. 2a). In advanced stages of spermiogenesis, a pear shaped electron-dense material is observed as a central element of both centrioles (Figs. 2b–d and 3d). Each centriole is formed by nine triplets around the pear shaped electron-dense material (Fig. 2d). In this proximal area of old spermatids a continuous layer of cortical microtubules and mitochondrial migration are also observed (Fig. 2d and e). Finally, spermiogenesis ends when the constriction of the ring of arched membranes is complete (Fig. 2c).

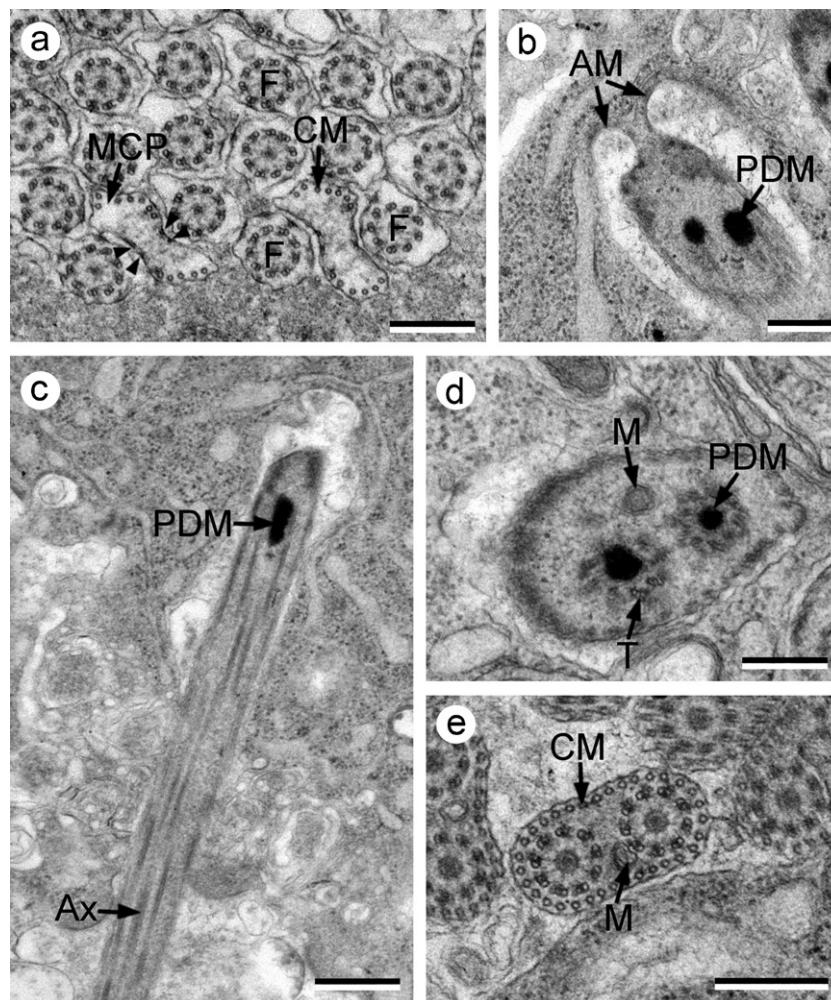


Fig. 2. (a–e) Spermatogenesis of *Brachycoelium salamandrae*. (a) Several cross-sections before proximodistal fusion showing median cytoplasmic processes (MCP) accompanied by free flagella (F). Note the presence of four attachment zones (arrowheads) in the median cytoplasmic process. CM, cortical microtubules. Scale bar = 0.3 μm. (b) Oblique section during constriction of the ring of arched membranes (AM) after fusion of flagella with median cytoplasmic process showing the pear shaped electron-dense material (PDM). Scale bar = 0.3 μm. (c) Longitudinal section during the final stage of spermatogenesis exhibiting persistence of the pear shaped electron-dense material (PDM). Ax, axoneme. Scale bar = 0.5 μm. (d and e) Consecutive cross-sections in proximal area of late spermatides showing centrioles with pear shaped electron-dense material (PDM) and in a more posterior area exhibiting both axonemes surrounded by a continuous layer of parallel cortical microtubules (CM). Note mitochondrial migration in these areas. M, mitochondrion; T, triplet. Scale bars = 0.3 μm.

3.2. Spermatozoon

Ultrastructural characters of the mature spermatozoon of *B. salamandrae* are illustrated in Figs. 4a–i, 5a–f, 6 and 7I–III. The mature spermatozoon contains two axonemes of different lengths of the 9+1' trepaxonematan pattern, two bundles of parallel cortical microtubules, external ornamentations of the plasma membrane, spinelike bodies, a nucleus, two mitochondria and granules of glycogen. After the observation of numerous longitudinal and cross-sections, three different regions (I–III) are distinguished, each presenting different ultrastructural characters.

Region I corresponds to the anterior spermatozoon extremity. Longitudinal sections in the anterior tip show a single axoneme (Fig. 4a). Consecutive cross-sections towards the posterior part of region I show a first axoneme and the second axoneme no yet formed with disorganized doublets (Figs. 4b and 7I). When both axonemes are already formed, the first mitochondrion is observed between them (Fig. 4c). In this area there is a continuous layer of submembranous and parallel cortical microtubules and attachment zones are not present (Fig. 4b and c). In the middle part of region I, longitudinal and cross-sections show an external ornamentation of the plasma membrane associated with cortical microtubules

and spinelike bodies (Fig. 4d and e). In this area, the first mitochondrion is also observed and attachment zones are present (Figs. 4d, e and 7I). The transition to region II is characterized by sections showing two axonemes, the first mitochondrion, cortical microtubules and granules of glycogen (Fig. 4f).

Region II is characterized by the presence of two axonemes, two mitochondria, cortical microtubules and granules of glycogen. Cortical microtubules are distributed in two parallel fields (Figs. 4g–i and 7II). The first mitochondrion is observed in the anterior area of this region (Figs. 4g, h and 7II) and the second mitochondrion appears and reaches the nuclear region in a more posterior area (Figs. 4i and 5a). It is interesting to note the presence of two parallel mitochondria in the posterior area of this region (Figs. 4i and 7II).

Region III corresponds to the posterior spermatozoon extremity. It begins with the appearance of the nucleus (Fig. 5a). Cross-sections in its anterior part show two axonemes, nucleus, a second mitochondrion, cortical microtubules and granules of glycogen (Figs. 5a and 6III). Later, one of the axonemes disorganizes and disappears (Figs. 5b, c and 7III). Posterior sections show the reduction in the size of nucleus and the disappearance of the second mitochondrion (Fig. 5d) and cortical microtubules (Fig. 5e). Then, near

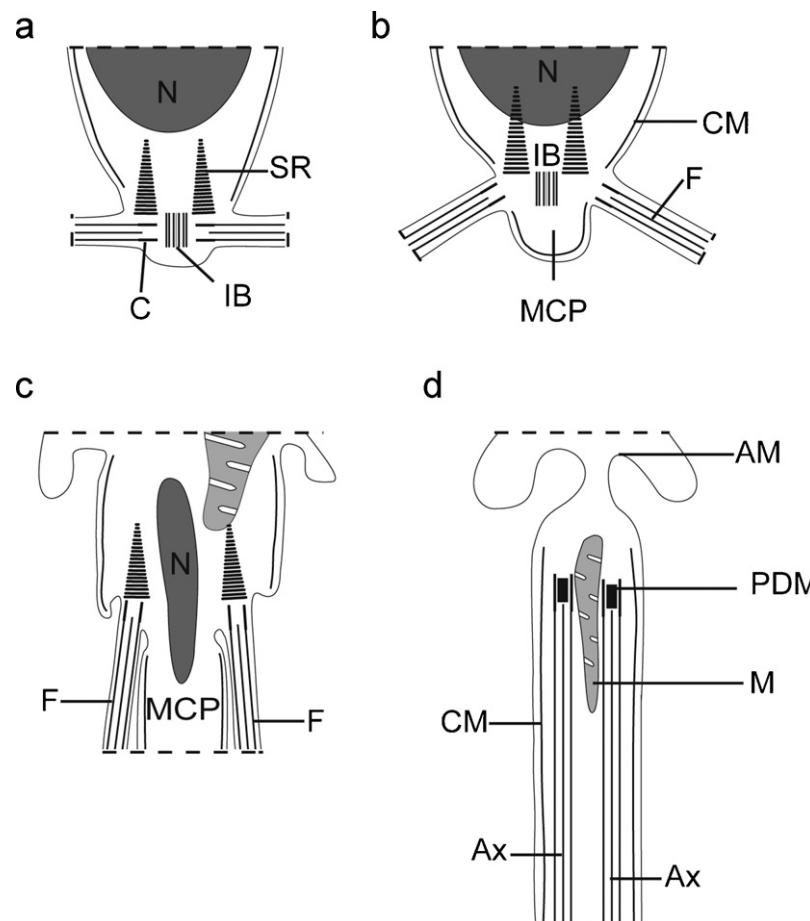


Fig. 3. (a-d) Schematic representation of the spermiogenesis of *Brachycoelium salamandrae*. AM, arched membranes; Ax, axoneme; C, centriole; CM, cortical microtubules; F, flagellum; IB, intercentriolar body; M, mitochondrion; MCP, median cytoplasmic process; N, nucleus; PDM, pear shaped electron-dense material; SR, striated rootlets.

the posterior spermatozoon extremity, the last axoneme disappears and only the nucleus surrounded by few granules of glycogen reaches the posterior spermatozoon tip (Figs. 5f and 7III). The result of the test of Thiéry (1967) evidences the glycogenic nature of the granular material (Fig. 6).

4. Discussion

4.1. Spermiogenesis

Spermiogenesis in *B. salamandrae* follows the general pattern described in the Digenea. It is characterized by the formation of a differentiation zone delimited by a ring of arched membranes, surrounded by cortical microtubules, and containing a pair of centrioles associated with striated rootlets and an intercentriolar body. Due to poor description of spermiogenesis in gorgoderoidean species (Robinson and Halton, 1982; Orido, 1988; Iomini et al., 1997) general comparison is not given in this study within the superfamily. Nevertheless, some particularities are distinguished in the spermiogenesis of *B. salamandrae*.

A flagellar rotation of 90° present in *B. salamandrae* is also described in the dicrocoeliids *Corrigia vitta* and *Dicrocoelium dendriticum* (Robinson and Halton, 1982; Cifrián et al., 1993), and also in the troglotrematid *Troglotrema acutum* (Miquel et al., 2006). The flagellar rotation of 90° is frequent during digenetic spermiogenesis (see Ndiaye et al., 2003b; Levron et al., 2003, 2004b,c; Bakhoun et al., 2011a,b). However, a flagellar rotation greater than 90° is reported in *Dicrocoelium hospes* (Dicrocoeliidae) by Agostini et al. (2005), and also in other digenetic species such as *Fasciola hepatica*,

Helicometra fasciata, or *Nicolla wisniewskii* (see Levron et al., 2003; Ndiaye et al., 2003a; Quilichini et al., 2007a). The importance of the angle of flagellar rotation in phylogenetic analysis was argued in previous studies (Levron et al., 2003; Agostini et al., 2005; Miquel et al., 2006; Bakhoun et al., 2011a,b).

A noteworthy character in final stage of spermiogenesis of *B. salamandrae* is the presence of a pear shaped electron-dense material in the central part of centrioles not described until now in gorgoderoidean species. However, similar structures have been reported previously during spermiogenesis of the deropristid *Dero- pristis inflata* and the echinostomatid *Echinostoma caproni* (Iomini and Justine, 1997; Foata et al., 2007).

4.2. Spermatozoon

The mature spermatozoa of gorgoderoidean species studied to date exhibit the classical structures previously observed in digenetics: a nucleus, one or more mitochondria, two bundles of parallel cortical microtubules and two axonemes of the 9+1' pattern of trepaxonematan Platyhelminthes. Moreover, additional structures such as external ornamentations of the plasma membrane, spine-like bodies or lateral expansions are present in some species and absent in others (Table 1). Thus, six ultrastructural characters are discussed below considering the gorgoderoidean spermatozoa.

4.2.1. Anterior spermatozoon extremity

The anterior spermatozoon tip of *B. salamandrae* is formed by one axoneme as described in most gorgoderoidean species studied until now (see Table 1). This morphology is the most

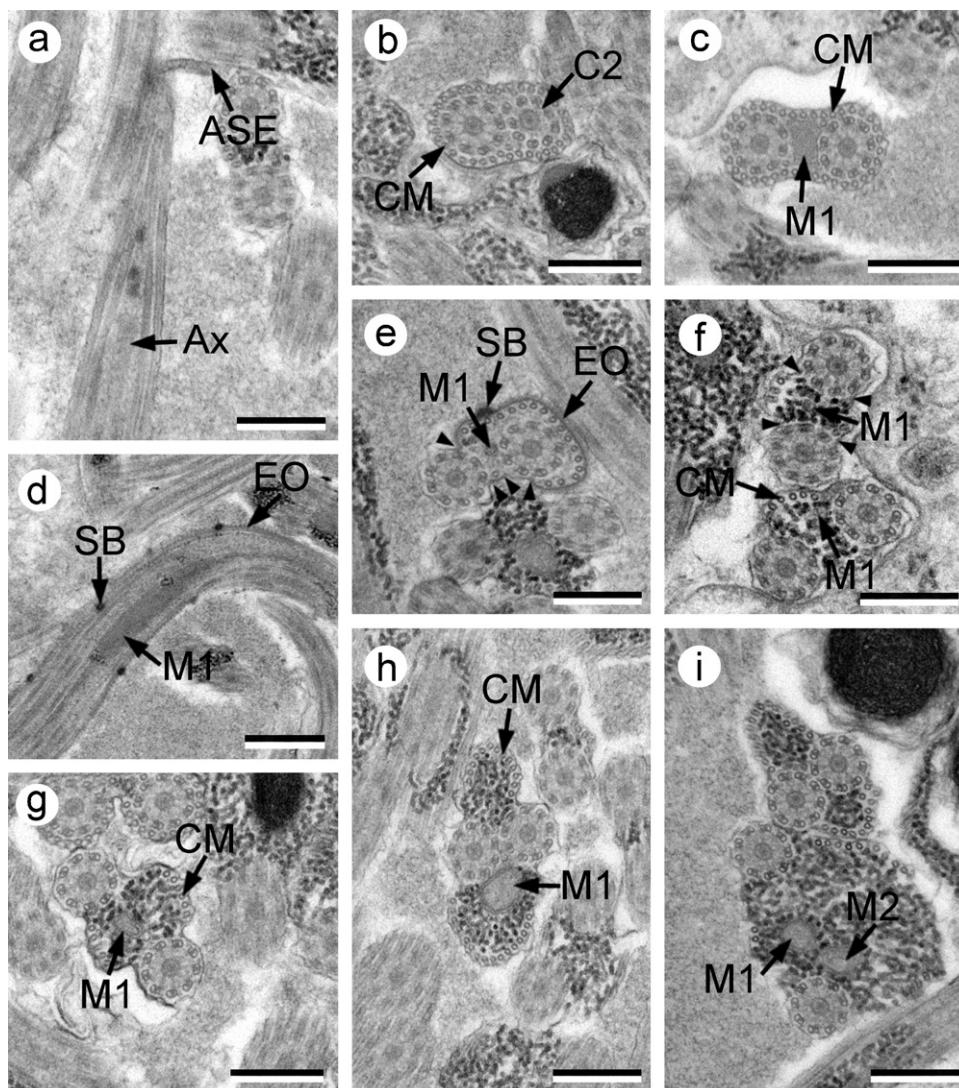


Fig. 4. (a–i) Spermatozoon of *Brachycoelium salamandrae*. (a) Longitudinal section of region I showing the anterior spermatozoon extremity (ASE). Ax, axoneme. Scale bar = 0.3 μm. (b) Cross-sections of region I exhibiting the first axoneme already formed and the centriole of the second axoneme (C2). CM, cortical microtubules. Scale bar = 0.3 μm. (c) Cross-section when both axonemes are formed showing the first mitochondrion (M1) between them. CM, cortical microtubules. Scale bar = 0.3 μm. (d) Longitudinal section in ornamented area in which spinelike bodies (SB) and the first mitochondrion (M1) are observed. EO, external ornamentation of plasma membrane. Scale bar = 0.5 μm. (e) Cross-section in ornamented area of region I. Arrowheads indicate the four attachment zones. EO, external ornamentation of plasma membrane; M1, first mitochondrion; SB, spinelike bodies. Scale bar = 0.3 μm. (f) Cross-sections in transitional area between regions I and II. Note the four attachment zones (arrowheads). CM, cortical microtubules; M1, first mitochondrion. Scale bar = 0.3 μm. (g and h) Cross-sections of region II showing two axonemes, the first mitochondrion (M1), cortical microtubules (CM) and granules of glycogen. Scale bars = 0.3 μm. (i) Posterior area of region II exhibiting in cross-section two parallel mitochondria. M1, first mitochondrion; M2, second mitochondrion. Scale bar = 0.3 μm.

Table 1
Main ultrastructural characters of the spermatozoon in the superfamily Gorgoderoidea.

| Families and species | ASE | LE | EO | SB | M | PSE | References |
|----------------------------------|------|----|----|----|---|------|----------------------------|
| Brachycoeliidae | | | | | | | |
| <i>Brachycoelium salamandrae</i> | 1 Ax | – | + | + | 2 | N | Present study |
| Dicrocoeliidae | | | | | | | |
| <i>Dicrocoelium dendriticum</i> | 1 Ax | – | – | – | 1 | 1 Ax | Cifrian et al. (1993) |
| <i>Dicrocoelium hospes</i> | 1 Ax | + | + | + | 2 | N | Agostini et al. (2005) |
| <i>Corrigia vitta</i> | 1 Ax | – | – | – | 1 | 1 Ax | Robinson and Halton (1982) |
| Mesocoeliidae | | | | | | | |
| <i>Mesocoelium monas</i> | ? | – | – | – | 1 | N | Iomini et al. (1997) |
| Paragonimidae | | | | | | | |
| <i>Paragonimus ohrai</i> | 1 Ax | – | + | + | 2 | 1 Ax | Orido (1988) |
| Troglotrematidae | | | | | | | |
| <i>Troglotrema acutum</i> | 1 Ax | + | + | + | 2 | 1 Ax | Miquel et al. (2006) |

ASE, anterior spermatozoon extremity; Ax, axoneme; EO, external ornamentation; LE, lateral expansion; M, number of mitochondria; N, nucleus; PSE, posterior spermatozoon extremity; SB, spinelike bodies; +/–, presence/absence of character; ?, unknown character.

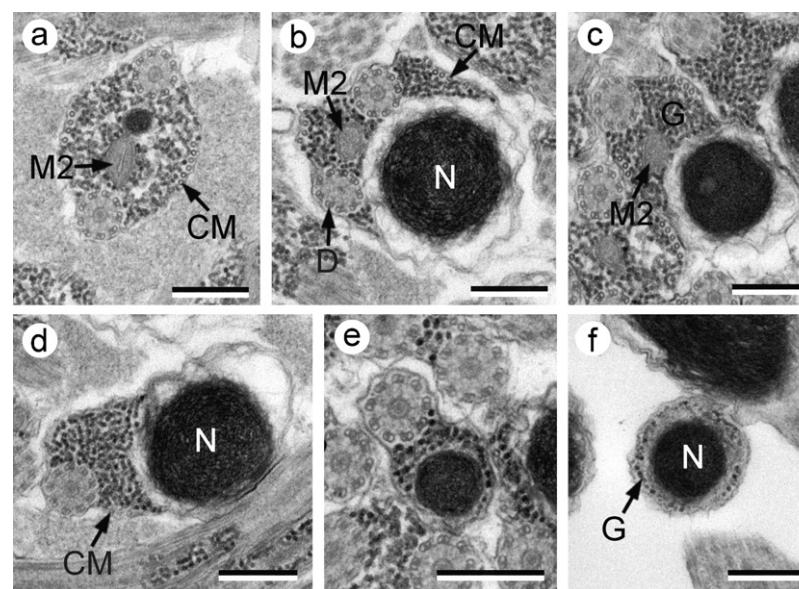


Fig. 5. (a–f) Spermatozoon of *Brachycoelium salamandrae*. (a–f) Consecutive cross-sections of region III showing the increasing size of the nucleus (N), the disorganization of the first axoneme, the stopping of the second mitochondrion (M2) and cortical microtubules (CM), and the posterior extremity containing only the nucleus surrounded by granules of glycogen (G). D, doublets. Scale bars = 0.3 μ m.

frequently reported in digenetic spermatozoa. Such is the case of species belonging to the families Heterophyidae (see Rees, 1979; Bakhoun et al., 2009), Fasciolidae (see Ndiaye et al., 2003a, 2004), Opistholebetidae (see Quilichini et al., 2010a) or to the superfamily Paramphistoidea (see Bakhoun et al., 2011b). However, in recent studies, spermatozoa with an anterior extremity containing one axoneme accompanied by electron-dense material are described in two species belonging to two families: Lepocreadiidae and Pronocephalidae (see Bâ et al., 2011; Ndiaye et al., 2011). In addition to these morphologies, other digenetic species exhibit an anterior extremity with two axonemes slightly longitudinally displaced. This is the case of *Haematoloechus* sp., *E. caproni*, *Nicolla testobliquum* or *Rubenstremma exasperatum* (see Justine and Mattei, 1982; Iomini and Justine, 1997; Quilichini et al., 2007b; Bakhoun et al., 2011a).

Another type of anterior spermatozoon extremity is characterized by the presence of external ornamentation of the plasma membrane; it is the case of *Neopapocreadium chabaudi* (see Kacem et al., 2010). Thus, the variability concerning the digenetic anterior spermatozoon extremity gives real evidence for the importance of this character in phylogenetic relationships.

4.2.2. Lateral expansion

Within the gorgoderoidean species studied until now only two species present a lateral expansion in their spermatozoa. Those are *D. hospes* (Agostini et al., 2005) in which this structure is called cytoplasmic expansion and *T. acutum* (Miquel et al., 2006) in which it is named hookshaped dorsolateral expansion. The latter has been reported also in other digenetics as *E. caproni* (Iomini and Justine, 1997), *F. hepatica* and *Fasciola gigantica* (Ndiaye et al., 2003a, 2004). As in other gorgoderoideans such as *D. dendriticum*, *C. vitta* and *Paragonimus ohirai* (Robinson and Halton, 1982; Orido, 1988; Cifrian et al., 1993 – see Table 1) a lateral expansion is not observed in *B. salamandrae*.

The presence or absence of lateral expansion and its association with external ornamentations and spinelike bodies seem to be a valuable argument to differentiate digenetic species at family or superfamily level (Bakhoun et al., 2011b; Ndiaye et al., 2011).

4.2.3. External ornamentations

They are generally present in the anterior areas of the spermatozoon and usually they do not cover all the perimeter of the cell. Their appearance probably occurs in the final stage of spermiogenesis when flagella have already fused, because external ornamentation has never been observed in the median cytoplasmic process during spermiogenesis. In fact, numerous digenetic species exhibit external ornamentations of plasma membrane in their spermatozoa. This is the case of *B. salamandrae*, *D. hospes*, *P. ohirai* and *T. acutum* for the Gorgoderoidea (Orido, 1988; Agostini et al., 2005; Miquel et al., 2006 – see Table 1) and many other species (see Kacem et al., 2010; Quilichini et al., 2010b; Bakhoun et al., 2011a,b). The external ornamentation described in *B. salamandrae* is observed only around one of the axonemes and a similar description has been reported in *T. acutum* (Miquel et al., 2006). However, the presence of

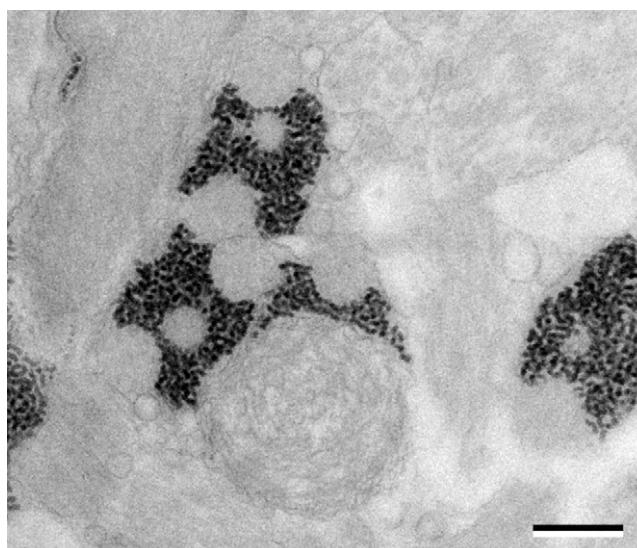


Fig. 6. Cross-section of the spermatozoon showing granules of glycogen evidenced by the test of Thiéry (1967). Scale bar = 0.3 μ m.

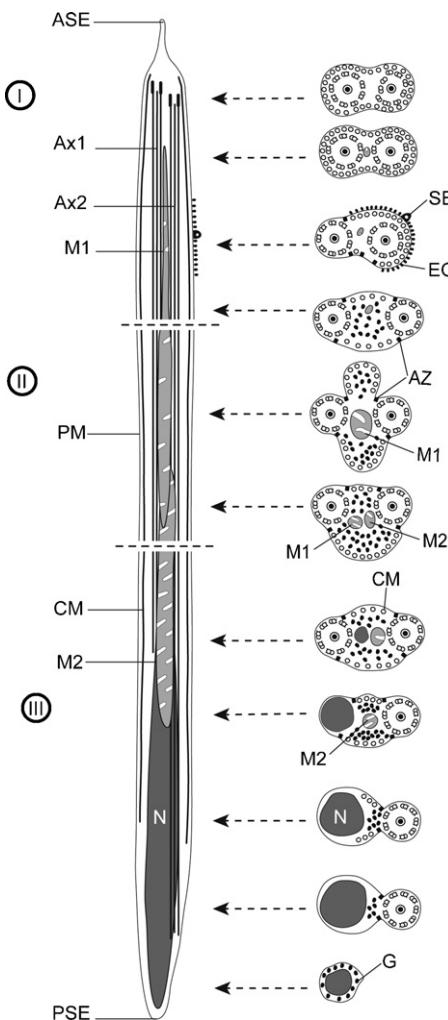


Fig. 7. (I–III) Schematic reconstruction of the spermatozoon of *Brachycoelium salamandrae*. (I) Anterior region. (II) Middle region. (III) Posterior region. ASE, anterior spermatozoon extremity; Ax1, first axoneme; Ax2, second axoneme; AZ, attachment zones; CM, cortical microtubules; EO, external ornamentation of plasma membrane; G, granules of glycogen; M1, first mitochondrion; M2, second mitochondrion; N, nucleus; PM, plasma membrane; PSE, posterior spermatozoon extremity; SB, spine-like bodies.

mitochondrion between axonemes in the ornamented area allows distinguishing the spermatozoon of *B. salamandrae*.

Thus, variability in the disposition of external ornamentation of the plasma membrane could be useful for a future application to phylogenetic analysis within the Digenea (Quilichini et al., 2011).

4.2.4. Spinelike bodies

Since their first description by Miquel et al. (2000) in the spermatozoon of *Opecoeloides furcatus* (Opecoelidae), spinelike bodies appear frequently described in recent studies. In fact, in the past, these structures could have been misinterpreted or considered as artefacts (see Miquel et al., 2006).

Concerning the gorgoderoidean species studied until now, spinelike bodies are observed in four species (see Table 1). Thus, it is possible that in this superfamily these structures were omitted or considered as artefacts in old studies as it seems to have occurred in the case of *P. ohirai* (Ordo, 1988). Spinelike bodies are described in the spermatozoon of other digenean species such as *F. hepatica* and *F. gigantica* (see Ndiaye et al., 2003a, 2004), *Notocotylus neyrai* (see Ndiaye et al., 2003b), *P. furcatum* (see Levron et al., 2004b) or *R. exasperatum* (see Bakhoum et al., 2011a). In most digeneans in which these structures were observed, they are present in anterior areas

of the spermatozoon and associated with external ornamentation of the plasma membrane, and usually in the mitochondrial region of the male gamete (Quilichini et al., 2011). However, exceptions have been reported in *D. inflata* (Foata et al., 2007) and *N. chabaudi* (Kacem et al., 2010). Considering all these aspects, this character will be of great interest to the elucidation of relationships between digeneans at the family level.

4.2.5. Number of mitochondria

Making logical interpretations with several cross-sections in the disposition of ultrastructural characters along the mature spermatozoon, the presence of more than one mitochondrion is evidenced. The mature spermatozoon of *B. salamandrae* presents two mitochondria with a thin one in the ornamented area, and a second one more posteriorly located, reaching the nuclear region.

The disposition of the parallel mitochondria observed in *B. salamandrae* in the present study has been reported also in the mature sperm of *D. hospes* (Agostini et al., 2005) in which two mitochondria were described as in other digenean species (see Gracenea et al., 1997; Levron et al., 2004a,b; Bakhoum et al., 2011a). However, in most digeneans one mitochondrion was reported as the case of some gorgoderoideans (see Table 1) and other digeneans such as *O. furcatus*, *Diphterostomum brusinae* or *Diplodiscus subclavatus* (Miquel et al., 2000; Levron et al., 2004c; Bakhoum et al., 2011b). Recently, a moniliform mitochondrion was reported in the mature spermatozoon of *Holorchis micracanthum* by Bâ et al. (2011).

4.2.6. Posterior spermatozoon extremity

As occurs with the anterior spermatozoon tip, the posterior spermatozoon extremity is morphologically variable within digeneans in general (see Quilichini et al., 2010a). In gorgoderoidean species, two posterior spermatozoon morphologies have been observed. The first morphology concerns species with posterior spermatozoon tip ended by nucleus as observed in *B. salamandrae* and *D. hospes* (Agostini et al., 2005 – see Table 1). The second morphology groups species with a posterior spermatozoon tip ended by one axoneme as reported in *C. vitta*, *P. ohirai*, *D. dendriticum*, and *T. acutum* (Robinson and Halton, 1982; Ordo, 1988; Cifrián et al., 1993; Miquel et al., 2006 – see Table 1). With respect to the remaining gorgoderoidean species, the poor description of these species does not allow us to give evidence of the morphology of their posterior spermatozoon extremities.

The interest and variability of posterior spermatozoon morphologies is argued by several authors (see Quilichini et al., 2010a; Bakhoum et al., 2011b; Ndiaye et al., 2011) and it would be very interesting to take further studies of this character.

Acknowledgments

Authors would to thank the “Unitat de Microscòpia, Facultat de Medicina, Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB)” for their support in the preparation of samples. A.J.S. Bakhoum benefits from MAEC-AECID doctoral Grants (refs. 2009-10 0000448019 and 2010-11 0000538055). A. Ribas is visiting postdoctoral fellow with FWO. C. Eira was supported by a Grant (SFRH/BPD/27014/2006) from the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT).

References

- Agostini, S., Miquel, J., Ndiaye, P.I., Marchand, B., 2005. *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 (Digenea, Dicrocoeliidae): spermiogenesis, mature spermatozoon and ultrastructural comparative study. Parasitology Research 96, 38–48.
- Bâ, C.T., Ndiaye, P.I., Dione, A., Quilichini, Y., Marchand, B., 2011. Ultrastructure of the spermatozoon of *Holorchis micracanthum* (Digenea: Lepocreadiidae), an intestinal parasite of *Plectorchinhus mediterraneus* (Pisces, Teleostei) in Senegal. Parasitology Research 109, 1099–1106.

- Bakhoum, A.J.S., Bâ, C.T., Fournier-Chambrillon, C., Torres, J., Fournier, P., Miquel, J., 2009. Spermatozoon ultrastructure of *Euryhelmis squamula* (Rudolph, 1819) (Digenea, Opisthorchioidea, Heterophyidae), an intestinal parasite of *Mustela vison* (Carnivora, Mustelidae). Revista Ibero-latinoamericana de Parasitología 1, 37–45.
- Bakhoum, A.J.S., Bâ, C.T., Shimalov, V.V., Torres, J., Miquel, J., 2011a. Spermatozoal characters of the digenetic *Rubenstrema exasperatum* (Rudolph, 1819) (Plagiorchioidea, Omphalometridae). Parasitology Research 108, 1283–1293.
- Bakhoum, A.J.S., Torres, J., Shimalov, V.V., Bâ, C.T., Miquel, J., 2011b. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) (Paramphistoidea, Diplodiscidae), an intestinal fluke of the pool frog *Rana lessonae* (Amphibia, Anura). Parasitology International 60, 64–74.
- Bray, R.A., Blair, D., 2008. Superfamily Gorgoderoidea Looss, 1899. In: Bray, R.A., Gibson, D.I., Jones, A. (Eds.), Keys to the Trematoda, vol. 3. CABI Publishing, London, pp. 187–190.
- Cifrián, B., García-Corrales, P., Martínez-Alos, S., 1993. Ultrastructural study of the spermatogenesis and mature spermatozoa of *Dicrocoelium dendriticum* (Plathelminthes, Digenea). Parasitology Research 79, 204–212.
- Foata, J., Quilichini, Y., Marchand, B., 2007. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Deropristis inflata* Molin, 1859 (Digenea, Deropristidae), a parasite of *Anguilla anguilla*. Parasitology Research 101, 843–852.
- Gracenea, M., Ferrer, J.R., González-Moreno, O., Trullols, M., 1997. Ultrastructural study of spermatogenesis and spermatozoon in *Postorchigenes gymnesicus* (Trematoda, Lecithodendriidae). Journal of Morphology 234, 223–232.
- Iomini, C., Justine, J.-L., 1997. Spermiogenesis and spermatozoon of *Echinostoma caproni* (Platyhelminthes, Digenea): transmission and scanning electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. Tissue and Cell 29, 107–118.
- Iomini, C., Mollaret, I., Albaret, J.-L., Justine, J.-L., 1997. Spermatozoon and spermiogenesis in *Mesocoelium monas* (Platyhelminthes: Digenea): ultrastructure and epifluorescence microscopy of labelling of tubulin and nucleus. Folia Parasitologica 44, 26–32.
- Justine, J.-L., Mattei, X., 1982. Réinvestigation de l'ultrastructure du spermatozoïde d'*Haematoechus* (Trematoda: Haematoloechidae). Journal of Ultrastructure Research 81, 322–332.
- Kacem, H., Bakhoum, A.J.S., Neifar, L., Miquel, J., 2010. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the digenetic *Neapocreadium chabaudi* (Apocreadiidae), a parasite of *Balistes capriscus* (Pisces, Teleostei). Parasitology International 59, 358–366.
- Levron, C., Ternengo, S., Marchand, B., 2003. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Helicometra fasciata* (Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Labrus merula* (Pisces, Teleostei). Acta Parasitologica 48, 255–264.
- Levron, C., Ternengo, S., Marchand, B., 2004a. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Monorchis parvus* Looss, 1902 (Digenea, Monorchidae), a parasite of *Diplodus annularis* (Pisces, Teleostei). Parasitology Research 93, 102–110.
- Levron, C., Ternengo, S., Marchand, B., 2004b. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Poracanthium furcatum* (Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mullus surmuletus* (Pisces, Teleostei). Acta Parasitologica 49, 190–200.
- Levron, C., Ternengo, S., Marchand, B., 2004c. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Diphterostomum brusinae* (Digenea, Zoogonidae), a parasite of *Diplodus annularis* (Pisces, Teleostei). Parasitology Research 94, 147–154.
- Miquel, J., Nourrisson, C., Marchand, B., 2000. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Opecoeloides furcatus* (Trematoda, Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mullus barbatus* (Pisces, Teleostei). Parasitology Research 86, 301–310.
- Miquel, J., Fournier-Chambrillon, C., Fournier, P., Torres, J., 2006. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the cranial digenetic *Troglotrema acutum* (Leuckart, 1842). Journal of Parasitology 92, 441–453.
- Ndiaye, P.I., Miquel, J., Fons, R., Marchand, B., 2003a. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the liver fluke *Fasciola hepatica* L., 1758 (Digenea, Fasciolidae): scanning and transmission electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. Acta Parasitologica 48, 182–194.
- Ndiaye, P.I., Miquel, J., Feliu, C., Marchand, B., 2003b. Ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa of *Notocotylus neyrai* González Castro, 1945 (Digenea, Notocotylidae), intestinal parasite of *Microtus agrestis* (Rodentia: Arvicidae) in Spain. Invertebrate Reproduction and Development 43, 105–115.
- Ndiaye, P.I., Miquel, J., Bâ, C.T., Marchand, B., 2004. Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of the liver fluke *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856 (Digenea, Fasciolidae), a parasite of cattle in Senegal. Journal of Parasitology 90, 30–40.
- Ndiaye, P.I., Quilichini, Y., Sène, A., Bâ, C.T., Marchand, B., 2011. Ultrastructure of the spermatozoon of the digenetic *Cricocelus albus* (Kuhl & van Hasselt, 1822) Looss, 1899 (Platyhelminthes, Pronocephaloidea, Pronocephalidae), parasite of "the hawksbill sea turtle" *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) in Senegal. Zoologischer Anzeiger 250, 215–222.
- Orido, Y., 1988. Ultrastructure of spermatozoa of the lung fluke, *Paragonimus ohirai* (Trematoda: Troglotrematidae), in the seminal receptacle. Journal of Morphology 196, 333–343.
- Pojmańska, T., 2008. Family Brachycoeliidae Looss, 1899. In: Bray, R.A., Gibson, D.I., Jones, A. (Eds.), Keys to the Trematoda, vol. 3. CABI Publishing, London, pp. 219–223.
- Quilichini, Y., Foata, J., Orsini, A., Marchand, B., 2007a. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Nicolla wisniewskii* (Digenea: Opecoelidae), an intestinal parasite of brown trout *Salmo trutta* (Pisces: Teleostei). Journal of Parasitology 93, 469–478.
- Quilichini, Y., Foata, J., Marchand, B., 2007b. Ultrastructural study of the spermatozoon of *Nicolla testibliaquum* (Digenea, Opecoelidae) parasite of brown trout *Salmo trutta* (Pisces, Teleostei). Parasitology Research 101, 1295–1301.
- Quilichini, Y., Foata, J., Marchand, B., 2007c. Ultrastructural study of the spermatozoon of *Pronoprymna ventricosa* (Digenea, Baccigerinae), parasite of the twaite shad *Alosa fallax* Lacepede (Pisces, Teleostei). Parasitology Research 101, 1125–1130.
- Quilichini, Y., Foata, J., Justine, J.-L., Bray, R.A., Marchand, B., 2010a. Ultrastructural study of the spermatozoon of *Heterolebes maculosus* (Digenea, Opistholebetidae), a parasite of the porcupinefish *Diodon hystrix* (Pisces, Teleostei). Parasitology International 59, 427–434.
- Quilichini, Y., Foata, J., Justine, J.-L., Bray, R.A., Marchand, B., 2010b. Spermatozoon ultrastructure of *Aponurus laguncula* (Digenea: Lecithasteridae), a parasite of *Aluterus monoceros* (Pisces, Teleostei). Parasitology International 59, 22–28.
- Quilichini, Y., Foata, J., Justine, J.-L., Bray, R.A., Marchand, B., 2011. Spermatozoon ultrastructure of *Gyliauchen* sp. (Digenea: Gyliauchenidae), an intestinal parasite of *Siganus fuscescens* (Pisces: Teleostei). Biological Bulletin 221, 197–205.
- Rees, F.G., 1979. The ultrastructure of the spermatozoon and spermiogenesis in *Cryptocotyle lingua* (Digenea: Heterophyidae). International Journal for Parasitology 9, 405–419.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. Journal of Cell Biology 17, 208–212.
- Robinson, R.D., Halton, D.W., 1982. Fine structural observations on spermatogenesis in *Corrigia vitta* (Trematoda: Dicrocoeliidae). Zeitschrift für Parasitenkunde 68, 53–72.
- Thiéry, J.P., 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. Journal of Microscopy 6, 987–1018.

III-2 Ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde de *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) (Paramphistomoidea : Diplodiscidae), parasite intestinal de *Rana lessonae* (Amphibia : Anura)

Résumé

La spermiogenèse chez *Diplodiscus subclavatus* débute par la formation de la zone de différentiation contentant deux centrioles, associés chacun à une racine striée et séparés par un corps intercentriolaire. Ce dernier est constitué de sept bandes opaques aux électrons avec une bande centrale fine et trois bandes épaisses de part et d'autre de la bande centrale. Les bandes externes du corps intercentriolaire sont formées par des granules opaques aux électrons.

Chaque centriole donne naissance à un flagelle, qui croît orthogonalement par rapport à l'axe de l'expansion cytoplasmique médiane. Après la rotation flagellaire et avant la fusion proximo-distale des flagelles avec l'expansion cytoplasmique médiane, quatre points de fusion ou « *attachment zones* » sont observés sur plusieurs coupes transversales, indiquant la zone où la fusion aura lieu. Dans cette zone de différentiation, des corps épineux ont aussi été observés avant la fusion proximo-distale. Finalement, la spermiogenèse prend fin après la constriction complète de l'anneau de membranes arquées, donnant naissance au jeune spermatozoïde.

Le spermatozoïde mûr de *D. subclavatus* exhibe les caractères classiques observés chez les Digènes tels que les deux axonèmes de longueur distincte et de type 9+'1' des Trepaxonemata, un noyau, une mitochondrie, deux rangées de microtubules corticaux parallèles et des granules de glycogène. Cependant, quelques particularités comme la présence d'une expansion latérale associée à des ornements extramembranaires et à des corps épineux, permettent de distinguer le spermatozoïde de *D. subclavatus* de ceux des autres Digènes.

Mots clés :

Diplodiscus subclavatus, Diplodiscidae, Paramphistomoidea, Digenea, Spermiogenèse, Spermatozoïde, Ultrastructure



Contents lists available at ScienceDirect



Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) (Paramphistomoidea, Diplodiscidae), an intestinal fluke of the pool frog *Rana lessonae* (Amphibia, Anura)

A.J.S. Bakhoum ^{a,b}, J. Torres ^{a,b}, V.V. Shimalov ^c, C.T. Bâ ^d, J. Miquel ^{a,b,*}^a Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, sn, E-08028 Barcelona, Spain^b Institut de Recerca de la Biodiversitat, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 645, E-08028 Barcelona, Spain^c Brest State University, 224665 Brest, Belarus^d Laboratoire de Parasitologie-Helminthologie, Département de Biologie animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, B.P. 5005, Dakar, Senegal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 August 2010

Received in revised form 17 October 2010

Accepted 18 October 2010

Available online 23 October 2010

Keywords:

Diplodiscus subclavatus

Diplodiscidae

Paramphistomoidea

Digenea

Spermiogenesis

Spermatozoon

Ultrastructure

ABSTRACT

Spermiogenesis in *Diplodiscus subclavatus* begins with the formation of the zone of differentiation presenting two centrioles associated with striated roots and an intercentriolar body. The latter presents seven electron-dense layers with a fine central plate and three plates on both sides. The external pair of these electron-dense layers is formed by a granular row. Each centriole develops into a free flagellum, both of them growing orthogonally in relation to the median cytoplasmic process. After the flagellar rotation and before the proximodistal fusion of both flagella with the median cytoplasmic process four attachment zones were already observed in several cross-sections indicating the area of fusion. Spinelike bodies are also observed in the differentiation zone before the fusion of flagella. Finally, the constriction of the ring of arched membranes gives rise to the young spermatozoon that detaches from the residual cytoplasm. The mature spermatozoon of *D. subclavatus* shows all the classical characters observed in Digenea spermatozoa such as two axonemes of different length of the 9+1 trepanemata pattern, nucleus, mitochondrion, two bundles of parallel cortical microtubules and granules of glycogen. However, some peculiarities such as a well-developed lateral expansion associated with external ornamentation of the plasma membrane and spinelike bodies combined with their area of appearance distinguish the ultrastructural organization of the sperm cells of *D. subclavatus* from those of other digenleans.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The Paramphistomoidea comprises digenleans mainly characterized by the absence of oral sucker and by the posterior position of the ventral sucker. The majority of them are intestinal parasites of numerous groups including man [1]. Although this superfamily comprises 12 families [1], the ultrastructural organization of spermiogenesis and of the spermatozoon has been studied in only three of these families. The latter include the Paramphistomidae with *Ceylonocotyle scoliocoelium*, *Paramphistomum microbothrium* and *Cotylophoron cotylophorum* [2–4], the Cladorchiidae with *Basidioliscus etorchus* and *Sandonia sudanensis* [5], and the Gastrothylacidae with *Carmyrius endopapillatus* [6]. The numerous species of digenleans (about 18,000 species included in 2,500 genera) [7] and the insufficient ultrastructural studies on sperm emphasise the need for more spermatological descriptions. Therefore, ultrastructural char-

acters related to sperm have been seen in the last years as interesting tools in the interpretation of the relationships within the Platylhelminthes in general and Digenea in particular [8–17]. The present contribution describes the spermiogenesis and the spermatozoon ultrastructure of *Diplodiscus subclavatus*, producing the first data on a fourth family of Paramphistomoidea. We also compare our results with those obtained by other authors in the above-mentioned species of Paramphistomoidea.

2. Materials and methods

Live adult specimens of *D. subclavatus* were obtained from the intestinal duct of a natural infected amphibian male of *Rana lessonae* captured in March 2008 in the Bugskiy landscape reserve (Southwest Belarus). The living digenleans were placed in a 0.9% NaCl solution. After dissection, different portions containing testes and seminal vesicle were routinely processed for transmission electron microscope examination. Specimens were fixed in cold (4 °C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2 for 2 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, postfixed in cold (4 °C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h, rinsed in a

* Corresponding author. Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, sn, E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 402 45 00; fax: +34 93 402 45 02.

E-mail address: jordimiquel@ub.edu (J. Miquel).

0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, dehydrated in an ethanol series and propylene oxide, and finally embedded in Spurr's resin. Both semithin (for localize testes and seminal vesicle) and ultrathin sections were obtained using a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome. Ultrathin sections were placed on copper grids and double-stained with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds [18] process. Gold grids were also obtained for the Thiéry [19] test in order to reveal the presence of glycogen. Thus, they were treated in periodic acid, thiocarbohydrazide and silver proteinate (PA-TCH-SP) as follows: 30 mn in 10% of PA, rinsed in distilled water, 24 h in TCH, rinsed in acetic solutions and distilled water, 30 mn in 1% SP in the dark,

and rinsed in distilled water. Ultrathin sections were examined using a JEOL 1010 transmission electron microscope operating at 80 kv in the "Serveis Científics i Tècnics" of the University of Barcelona (Spain).

3. Results

3.1. Spermiogenesis

Spermiogenesis in *D. subclavatus* is illustrated in Figs. 1–3. This process begins with the formation of the zone of differentiation delimited by the ring of arched membranes and a submembranous

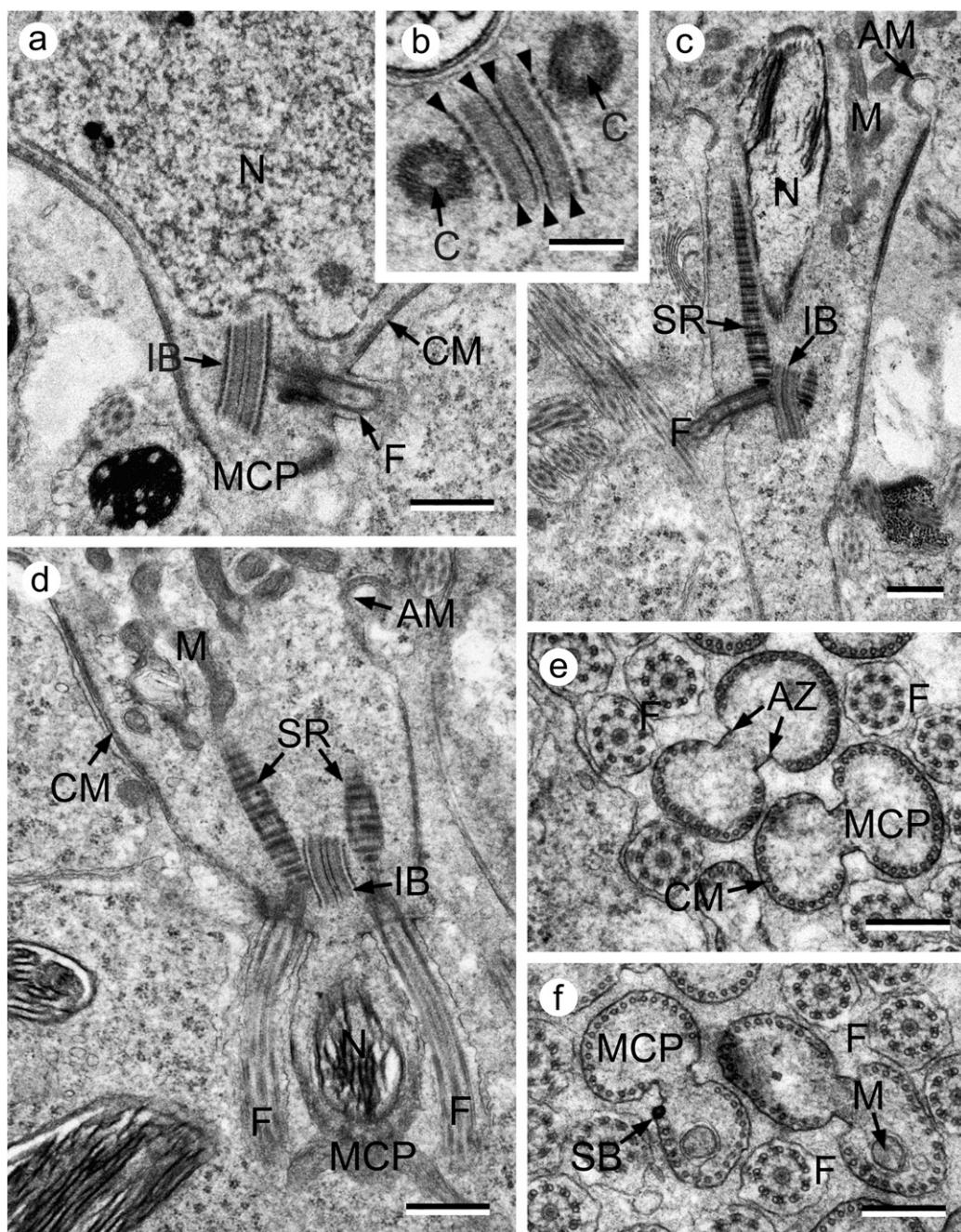


Fig. 1. Spermiogenesis of *Diplodiscus subclavatus*. (a) Longitudinal section of a differentiation zone showing the orthogonally development of one flagellum and the intercentriolar body. (b) Detail of the intercentriolar body showing seven electron-dense layers (arrowheads). (c) Zone of differentiation in longitudinal section characterized by the presence of one flagellum, the intercentriolar body, the striated rootlets and both nucleus and mitochondria in migration. (d) Advanced stage of a differentiation zone delimited by a ring of arched membranes in which the flagella, after their rotation, become parallel to the median cytoplasmic process. (e) Cross-sections of spermatids before the proximodistal fusion characterized by the presence of attachment zones and submembranous cortical microtubules. (f) Cross-sections of spermatids showing the appearance of the spinelike body and the migrations of mitochondrion before the proximodistal fusion. AM, arched membranes; AZ, attachment zones; C, centriole; CM, cortical microtubules; F, flagellum; IB, intercentriolar body; M, mitochondrion; MCP, median cytoplasmic process; N, nucleus; SB, spinelike body; SR, striated rootlets. Bar = 0.5 μm (a, c, and d), 0.2 μm (b), 0.3 μm (e and f).

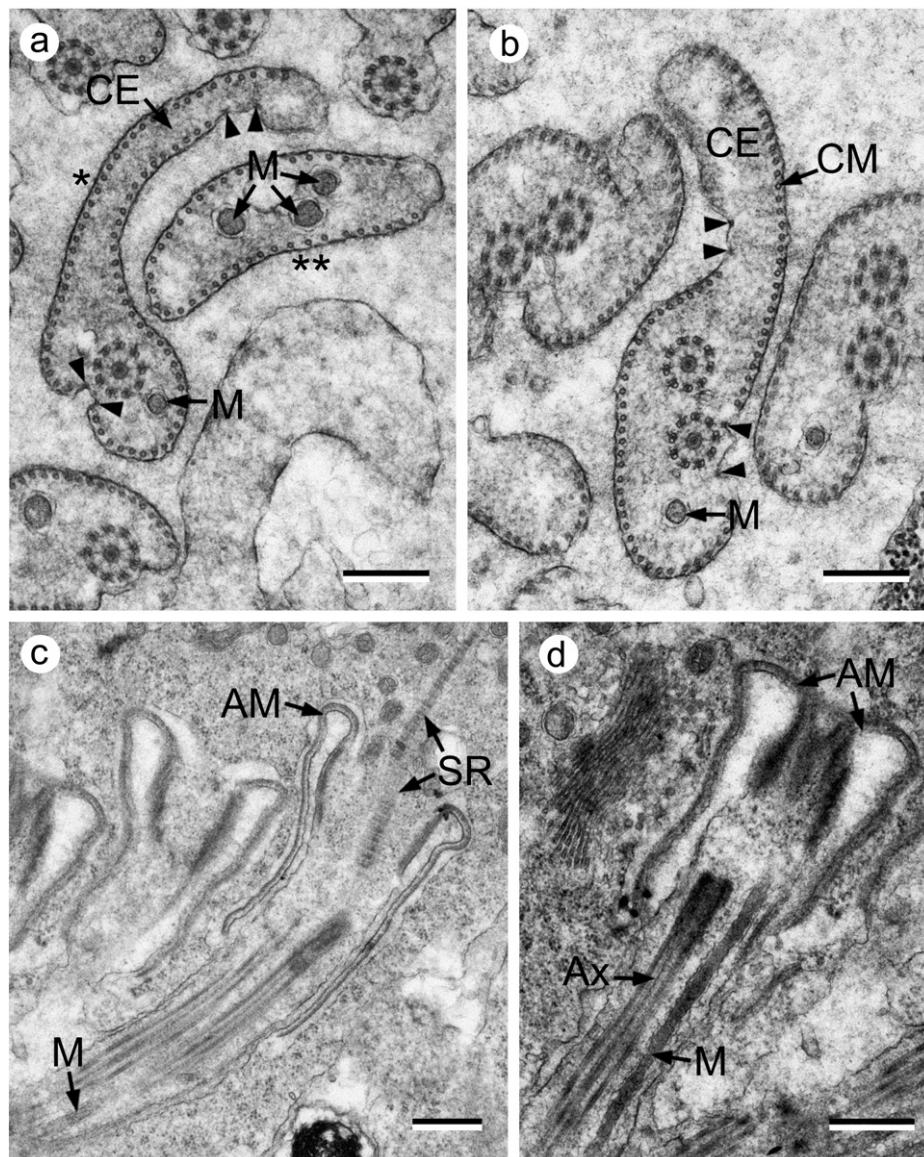


Fig. 2. Spermiogenesis of *Diplodiscus subclavatus*. (a) Cross-sections of spermatids after the proximodistal fusion of the first flagellum (*) and showing the migration of three mitochondria (**). Note the well-developed cytoplasmic expansion and the presence of attachment zones (arrowheads). (b) Cross-section of a spermatid after the proximodistal fusion of both flagella. Arrowheads indicate the attachment zones. (c) Longitudinal section of a spermatid after the proximodistal fusion showing the persistence of striated rootlets. (d) Advanced stage of spermiogenesis showing the constriction of the ring of arched membranes before the liberation of a young spermatozoon. AM, arched membranes; Ax, axoneme; CE, cytoplasm expansion; CM, cortical microtubules; M, mitochondrion; SR, striated rootlets. Bar = 0.3 µm (a and b); 0.5 µm (c and d).

layer of cortical microtubules. This zone presents also a pair of centrioles associated with striated rootlets and an intercentriolar body (Fig. 1a–c). The latter is formed by seven electron-dense layers with a fine central plate and three plates on both sides (Fig. 1b), therefore the external pair of these electron-dense layers is formed by a granular row (Fig. 1b). The centrioles give rise to two free flagella that grow externally, which undergo a 90° rotation thus becoming parallel to the median cytoplasmic process (Fig. 1a, c, and d). Before the flagellar rotation, the nucleus starts migrating toward the spermatid, followed by several mitochondria (Fig. 1c and d). Several cross-sections of spermatids after the flagellar rotation show the presence of four attachment zones indicating the area of fusion of the flagella and the median cytoplasmic process (Fig. 1e and f). At this stage, before the proximodistal fusion, we observed one or more mitochondria and the presence of spinelike bodies (Figs. 1f and 2a). Additionally, this area of fusion in *D. subclavatus* is characterized by a well-developed cytoplasm extension containing a submembranous layer of cortical microtubules except at its tip (Fig. 2a and b). Furthermore, logical interpretation using several cross-sections

of this area of fusion shows that one of the flagella fuses with the median cytoplasmic process (Fig. 2a) before the other (Fig. 2b). Thus, these observations and also the presence of mitochondria in both sections (Fig. 2a) clearly demonstrate that the proximodistal fusion is asynchronous and that it takes place during the mitochondrial migration (Fig. 2a and b). In a more advanced stage of spermiogenesis we also note the persistence of striated rootlets after the proximodistal fusion of the flagella and the median cytoplasmic process (Fig. 2c). However, these striated rootlets are not observed in the final stage spermiogenesis during the constriction of the ring of arched membranes (Fig. 2d). Finally, the total constriction of arched membranes gives rise to the young spermatozoon liberated from the residual cytoplasm.

3.2. Spermatozoon

The mature spermatozoon presents several structures previously described in the other digenleans in general and in the superfamily Paramphistoidea in particular. It contains two axonemes of different

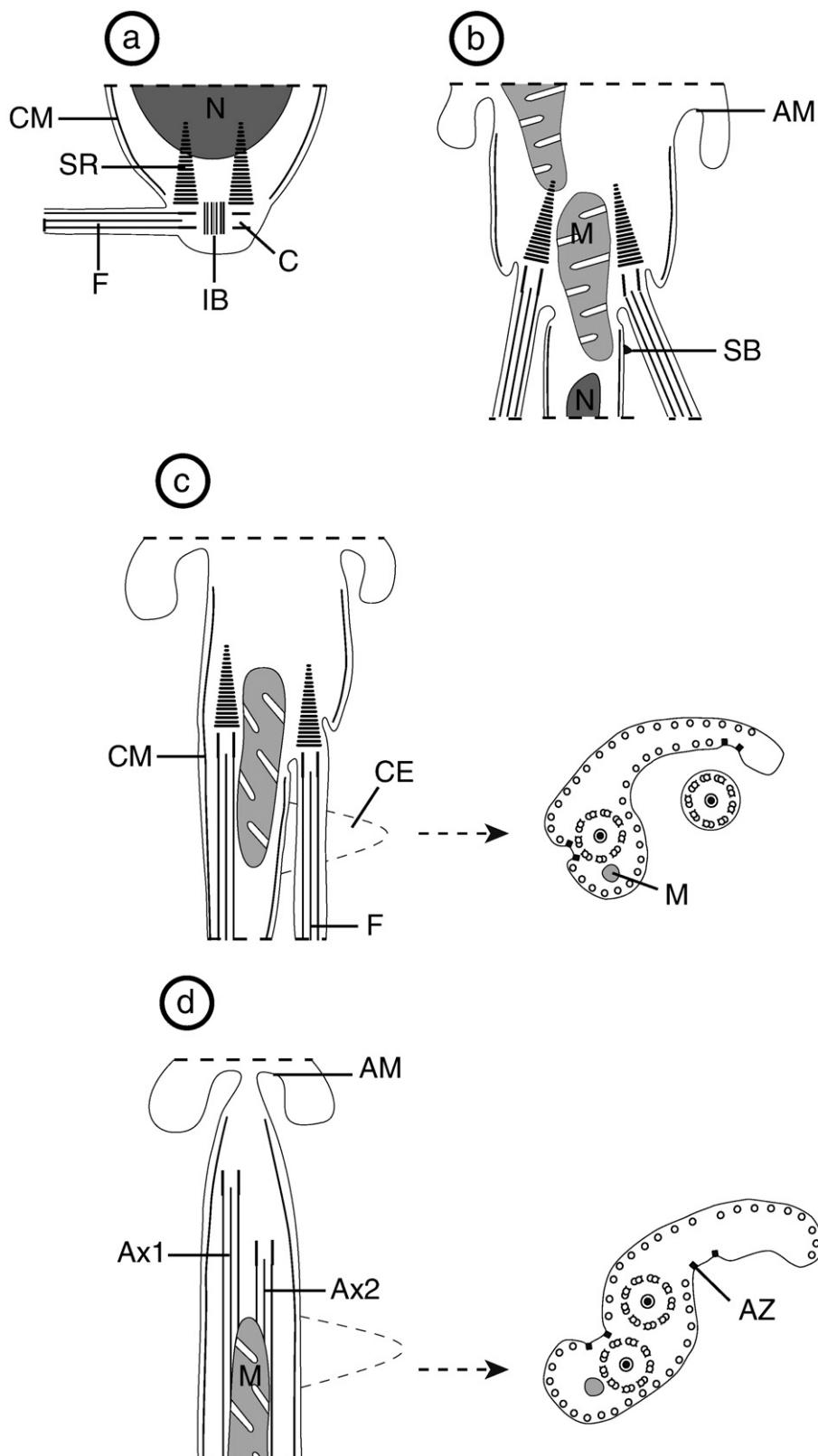


Fig. 3. Diagram showing the main stages of spermiogenesis in *Diplodiscus subclavatus*. (a) Early stage of the differentiation zone. (b) Zone of differentiation showing the flagellar rotation. The two flagella become parallel to the median cytoplasmic process. (c) Spermatid showing the asynchronous proximodistal fusion of flagella. At this stage, the cytoplasmic expansion is present. (d) Final stage of the spermiogenesis showing the constriction of the ring of arched membranes and the disappearance of striated rootlets. AM, arched membranes; Ax1, first axoneme; Ax2, second axoneme; C, centriole; CE, cytoplasm expansion; CM, cortical microtubules; F, flagellum; M, mitochondrion; N, nucleus; SR, striated rootlets; SB, spinelike body.

lengths, showing a typical 9 + "1" pattern of the trepaxonemata. Platyhelminthes, two bundles of parallel cortical microtubules, one mitochondrion, nucleus, external ornamentation of the plasma mem-

brane, spinelike bodies and a lateral expansion. The granules of glycogen are also present and distributed along the spermatozoon except for the anterior part. The observation of several sections made at the level of

seminal vesicle enabled us to establish three (I–III) regions in the male gamete of *D. subclavatus* (Figs. 4–7) with distinctive ultrastructural characters.

Region I corresponds to the anterior extremity of the spermatozoon. The anterior tip is filiform with the presence of only the first axoneme of the typical trepaxonemata pattern constituted by nine peripheral doublets around the central cylinder (Fig. 4a and b). No cortical microtubules are described at this level of region I. Posteriorly,

the dilatation of the cytoplasmic membrane precedes the appearance of the centriole of the second axoneme and also the appearance of cortical microtubules (Fig. 4c and d). In the middle portion of region I, where both axonemes are present, it is possible to observe a continuous and submembranous layer of cortical microtubules (Fig. 4e). Additionally, in this area (Fig. 4e–g) a well-developed lateral expansion begins to emerge associated with a continuous layer of submembranous cortical microtubules, external ornamentation of

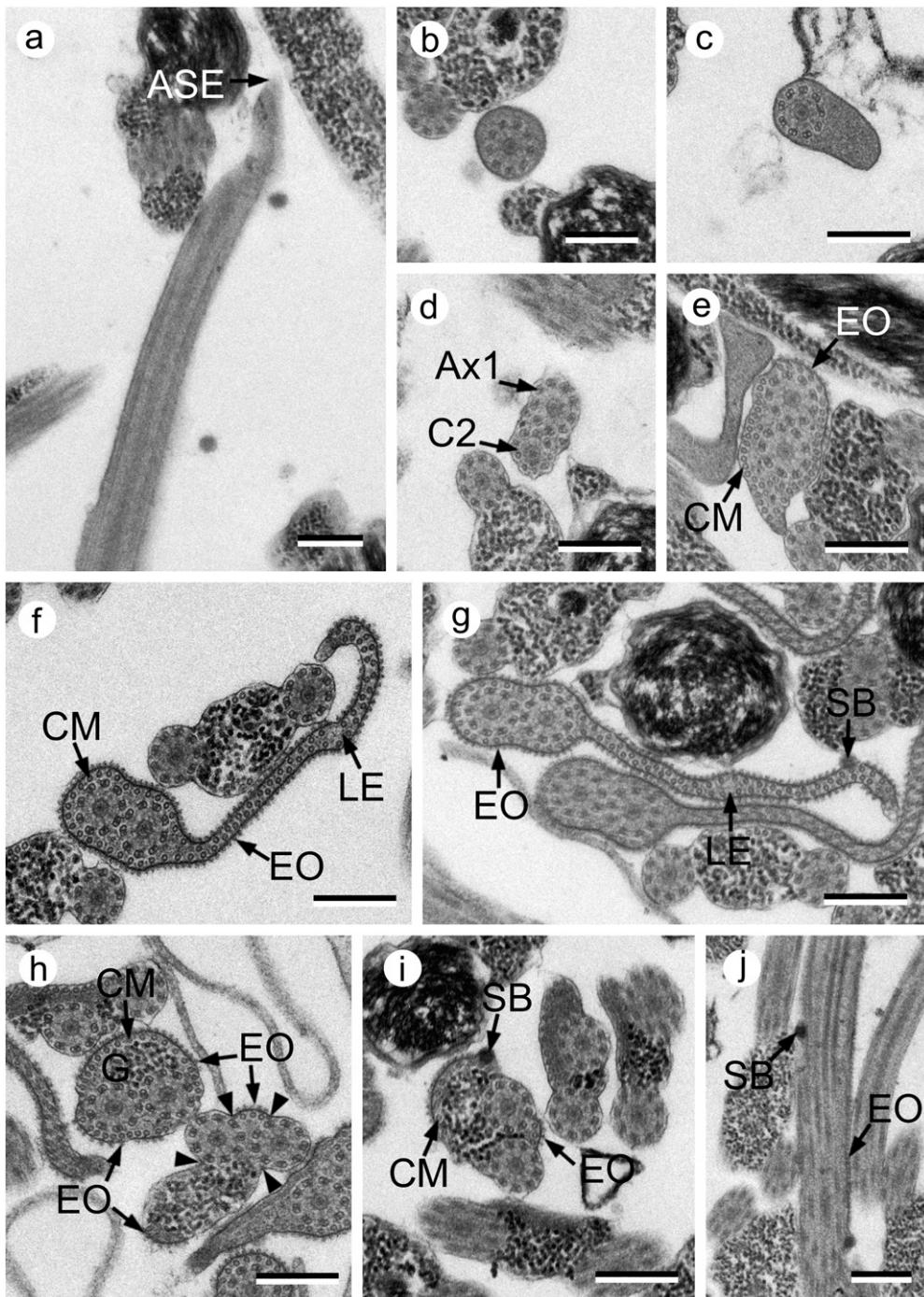


Fig. 4. Spermatozoon of *D. subclavatus*. (a) Longitudinal section of the anterior extremity of the spermatozoon. (b and c) Cross-sections of the anterior region of the spermatozoon containing only one axoneme. (d) Cross-section showing the appearance of the centriole of the second axoneme. (e) Cross-section showing the beginning of the lateral expansion and the external ornamentation associated with cortical microtubules. (f and g) Cross-sections of the well-developed lateral expansion showing submembranous cortical microtubules accompanied with both external ornamentation and spinelike bodies. Note the lack of these elements in the tip of the lateral expansion. (h and i) Cross-sections showing the repartition of the external ornamentation and cortical microtubules in two sides. Note also the presence of spinelike body. Arrowheads in (h) indicate the attachment zones. (j) Longitudinal section showing the simultaneous presence of the external ornamentation and spinelike bodies. ASE, anterior spermatozoon extremity; Ax1, first axoneme; C2, second centriole; CM, cortical microtubules; EO, external ornamentation; G, granules of glycogen; LE, lateral expansion; SB, spinelike body. Bar = 0.3 μm (a–j).

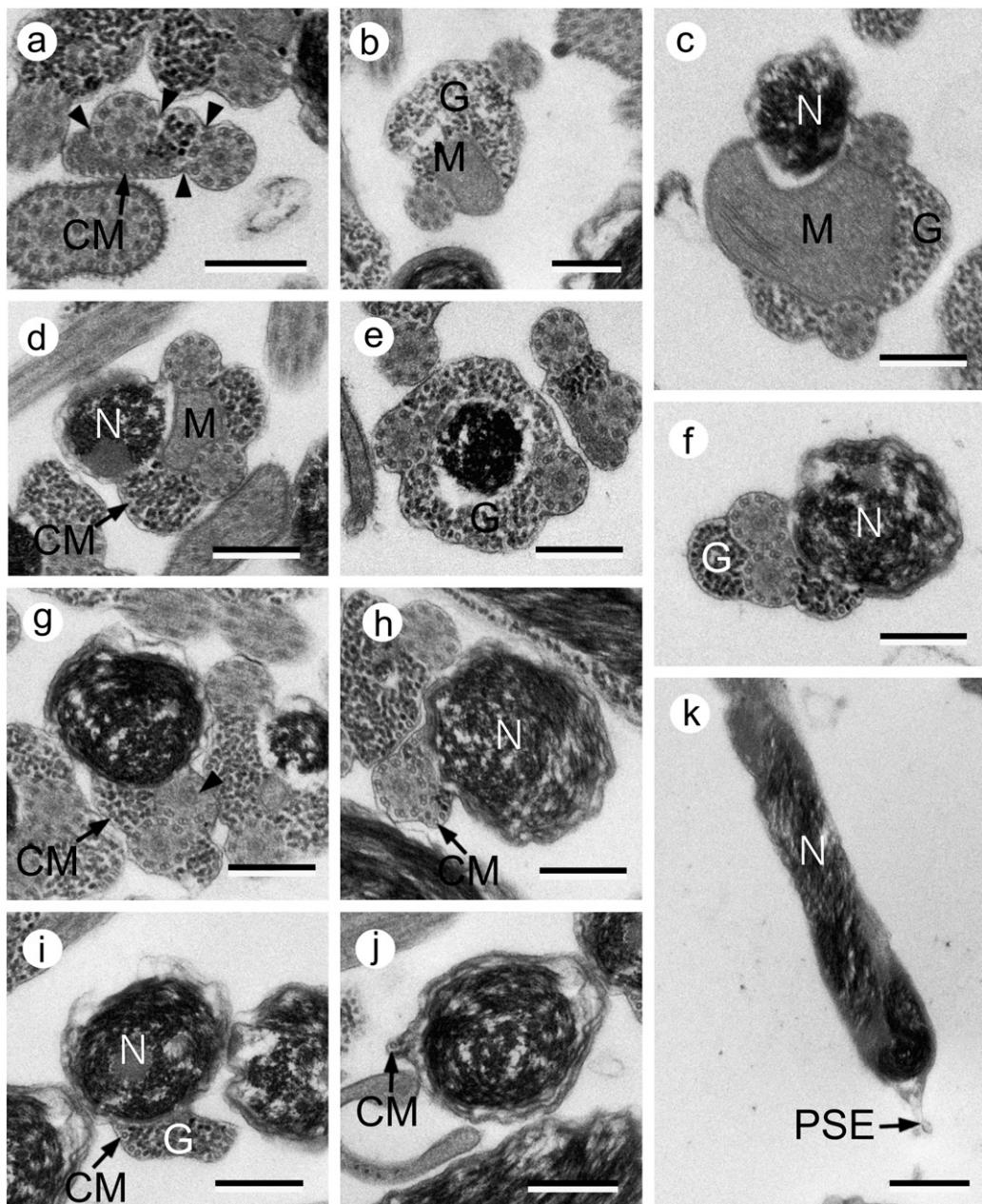


Fig. 5. Spermatozoon of *D. subclavatus*. (a) Cross-section of the transition area between anterior (I) and middle (II) regions. Arrowheads indicate the attachment zones. (b–g) Consecutive cross-sections of the mitochondrial region (II). (h–j) Consecutive cross-sections of the posterior region (III). Note the disorganization of the first axoneme (arrowhead) in (g) marking the transition towards the region III. (k) Longitudinal section showing the posterior extremity of the spermatozoon. CM, cortical microtubules; G, granules of glycogen; M, mitochondrion; N, nucleus; PSE, posterior spermatozoon extremity. Bar = 0.3 μm (a–j); 0.5 μm (k).

the plasma membrane and spinelike bodies. However, in all sections containing the lateral expansion neither cortical microtubules nor external ornamentation have been observed at the tip of this expansion (Fig. 4f and g). It is interesting to remark that these are the regions of sperm presenting the highest number of cortical microtubules (up to 74). Several cross and longitudinal sections below the area containing the lateral expansion also show the presence of external ornamentation associated with cortical microtubules and spinelike bodies (Fig. 4h–j). It is also interesting to note that these external ornamentations are observed only where cortical microtubules are present (Fig. 4h and i) and contrarily to the anterior sections described (Fig. 4e–g), the cortical microtubules are not covering the axonemes. It is remarkable that areas of region I located posteriorly to the lateral expansion show the presence of attachment

zones (Figs. 4h and 5a). The appearance of the granules of glycogen also characterizes this area of the male gamete. Finally, the distal area of the region I is characterized only by the presence of both axonemes, two bundles of parallel cortical microtubules, attachment zones and granules of glycogen (Fig. 5a).

Region II is the mitochondrial region and it is also characterized by the presence of nucleus, both axonemes, cortical microtubules and granules of glycogen. The anterior area of this region shows the mitochondrion before the apparition of the nucleus (Fig. 5b). The appearance of nucleus coincides with the greatest section of the mitochondrion (Fig. 5c). In these areas, containing both mitochondrion and nucleus, the latter is eccentric with respect to the axonemes (Fig. 5c and d). When the mitochondrion disappears, the nucleus is centrally located between the axonemes (Fig. 5e) and, finally, in the posterior

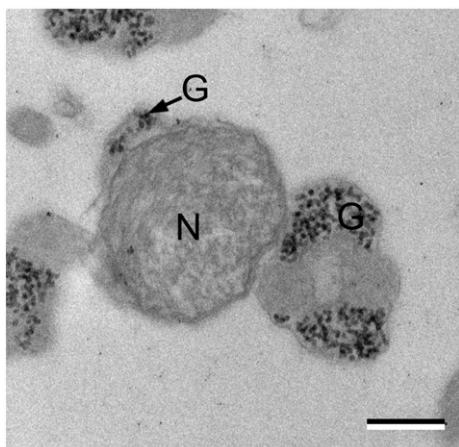


Fig. 6. Granules of glycogen revealed by the test of Thiéry. G, granules of glycogen; N, nucleus. Bar = 0.3 μ m.

area of region II it is again in an eccentric position to the axonemes (Fig. 5f and g). Finally, the disorganization and disappearance of the first axoneme occur (Fig. 5g) marking the transition toward the third region.

Region III (Fig. 5h–k) constitutes the posterior part of the spermatozoon and contains the nucleus, the second axoneme, a reduced number of cortical microtubules and few granules of glycogen. In this area the second axoneme disappears and, consequently, the posterior part of region III presents only the nucleus and cortical microtubules that progressively disappear near the posterior tip (Fig. 5j).

4. Discussion

4.1. Spermiogenesis

The spermiogenesis process in all the Paramphistomoidea species described until now is relatively homogeneous. As observed in *D. subclavatus*, spermiogenesis is characterized by the formation of a differentiation zone delimited by the ring of the arched membranes in which there are two striated rootlets and an intercentriolar body associated with two centrioles, which give rise to two free flagella growing orthogonally to a median cytoplasmic process. The subsequent 90° flagellar rotation is described in all the species belonging to the three different studied Paramphistomoidea families (see Table 1). This angle of rotation is the most frequent in digeneans, although certain species present a wider than 90° angle as occurs in *Fasciola hepatica*, (Fasciolidae), *Helicometra fasciata* and *Nicolla wisniewskii* (Opecoelidae), *Monorchis parvus* (Monorchiidae), *Dicrocoelium hospes* (Dicrocoeliidae) and in *Crepidostomum metecous* (Allocreadiidae) [20–25]. In this sense, within the cestodes a flagellar rotation greater than 90° is also described for spermiogenesis of species belonging to basal orders such as Caryophyllidea and Spathebothriidea [29,30]. In parallel and also concerning the cestodes flagellar rotation angles inferior to 90° have been described in four cyclophyllideans belonging to Catenotaeniidae, Paruterinidae and Taeniidae families [31–34]. It has been suggested that this variability may represent a gradual reduction of the angle of rotation of the free flagellum/a from the primitive to the most evolved Platyhelminthes [35]. However, it is interesting to note that in the Aspidogastrea, which is considered a sister group of digeneans, all species described until now present a flagellar rotation of 90° [26–28].

The intercentriolar body, made up of several electron-dense layers (seven in the case of *D. subclavatus* and many others digeneans), is considered as a plesiomorphic character present in the Trematoda (Digenea and Aspidogastrea) and in most of the Cestoda except for the representatives of Cyclophyllidea [11,12,14]. The morphological aspect of the intercentriolar body, with seven electron layers, in which the

external bands are made by a discontinuous layer of electron-dense material, is also reported in the species of Paramphistomoidea (see Table 1). The phylogenetic interest of the intercentriolar body is related to its progressive reduction from 11 electron-dense layers in the aspidogastrean *A. limacoides* [28] to only five layers in *H. fasciata* [21], with intermediate intercentriolar bodies constituted by nine electron-dense layers in the case of three digeneans (*Cryptocotyle lingua*, *Microphallus primas* and *M. parvus* [23,36,37]), by six electron-dense layers in *Deropristis inflata* [38] and by seven electron-dense layers described in most of digeneans. Moreover, the reduction of this character is also observed in cestodes [14], in which the intercentriolar body (i) is usually constituted by one to five electron-dense plates or (ii) it is absent in the case of cyclophyllideans excepted for the mesocestoidids (with one or three layers) [39,40]. This variability gives a particular interest to the intercentriolar body although more detailed studies of this structure are needed for future phylogenetic analyses.

Spermiogenesis in *D. subclavatus* is also characterized by the presence of a cytoplasmic expansion and spinelike bodies before the fusion of both flagella. In fact, during spermiogenesis, a cytoplasmic expansion is reported only in two additional species of the superfamily Paramphistomoidea: in *Basidiodiscus ectorchus* and in *Sandonia sudanensis* [5] (see Table 1). Apart from the superfamily Paramphistomoidea, within the order Echinostomida such structure has been described in *Saccocoeloides godoyi*, *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* [20,41,42]. However, our attention was drawn to the great similarity between the cytoplasmic expansions observed in *D. subclavatus* and other paramphistomatid species [5] and those described in the aspidogastrean *Multicotyle purvisi* [27]. In our opinion, this cytoplasmic expansion is related to the lateral expansion present in the mature spermatozoon. However, some studies that show lateral expansions in the male gamete lack observations of cytoplasmic expansions during spermiogenesis [3,4,6], thus emphasising the need to conduct more detailed studies on this particular structure during spermiogenesis.

To our knowledge, spinelike bodies have never been reported in the differentiation zone before the fusion of flagella. The present study describes for the first time the appearance of spinelike bodies in the median cytoplasmic process and indicates that their formation occurs in the early stages of spermiogenesis in *D. subclavatus*. In other studies, e.g., *Opecoeloides furcatus*, during spermiogenesis this structure is formed after the proximodistal fusion [43].

4.2. Spermatozoon

The spermatozoon of *D. subclavatus* presents the general features described in digeneans, including two axonemes of the 9 + "1" pattern characteristic of the Trepaxonemata [44] with different lengths, a nucleus, a mitochondrion, a well-developed lateral expansion, and external ornamentation of plasma membrane associated with cortical microtubules and spinelike bodies. Granules of glycogen were also observed along the spermatozoon except in its anterior areas. Contrarily to the incorporation of ultrastructural characters for understanding the phylogeny in the cestodes, in digeneans such incorporation is not yet established. However, several features found from the anterior to the posterior extremities of digenetic spermatozoa present a great interest for phylogenetic studies.

The delimitation of the anterior spermatozoon extremity in digenetic spermatozoa is relative and depends on the author's considerations. It is usually observed only one axoneme as in the case of *D. subclavatus* and in the other species of Paramphistomoidea studied to date (see Table 1). Nevertheless, the presence of two axonemes of similar lengths or one axoneme slightly longitudinally displaced to the other has been described in several species. This is the case of *Echinostoma caproni*, *Nicolla testiobliquum*, *N. wisniewskii* or *Haematolöechus medioplexus* [22,45–47]. Additionally, to our knowledge,

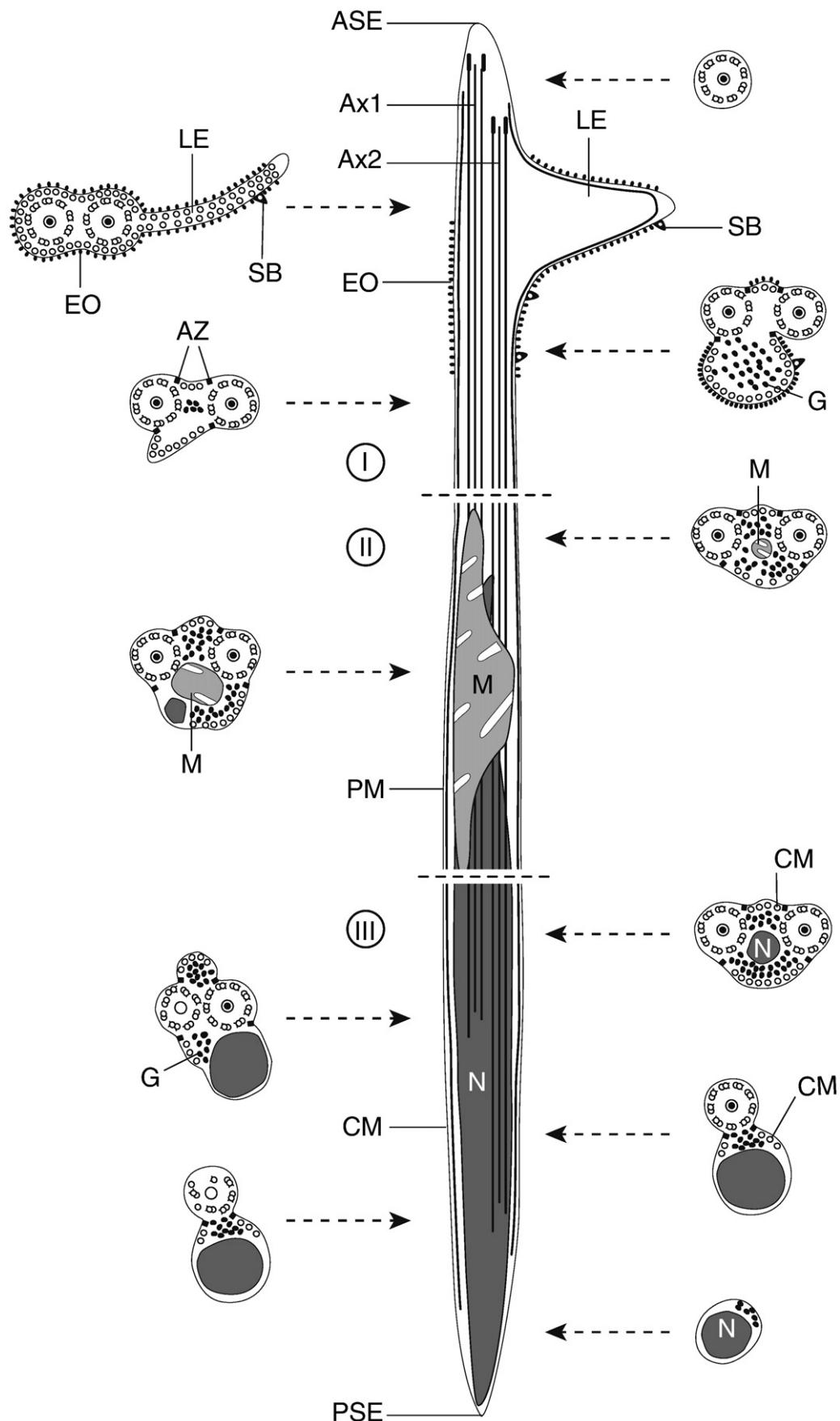


Fig. 7. Schematic reconstruction of the spermatozoon of *D. subclavatus*. The granules of glycogen are not shown in the longitudinal section in order to simplify the drawing. ASE, anterior spermatozoon extremity; Ax1, first axoneme; Ax2, second axoneme; AZ, attachment zone; CM, cortical microtubule; EO, external ornamentation of plasma membrane; G, glycogen granules; LE, lateral expansion; M, mitochondrion; N, nucleus; PM, plasma membrane; PSE, posterior spermatozoon extremity; SB, spinelike body.

Table 1

Ultrastructural characters of spemiogenesis and the spermatozoon in the Paramphistomoidea.

| Families and species [reference] | IB | FR | AZ | CE | ASE | EO | LE | SB | M | PSE |
|--|----|-----|----|----|-----|----|----|----|---|-----|
| Paramphistomidae | | | | | | | | | | |
| <i>Paramphistomum microbothrium</i> [3] | 7 | 90° | 4 | — | 1Ax | + | + | + | 1 | N |
| <i>Cotylophoron cotylophorum</i> [4] | 7 | 90° | 4 | — | 1Ax | + | + | + | 1 | N |
| Cladorchidae | | | | | | | | | | |
| <i>Basidioidiscus ectorchus</i> [5] | 7 | 90° | 4 | + | 1Ax | + | + | — | 3 | N |
| <i>Sandonia sudanensis</i> [5] | 7 | 90° | 4 | + | 1Ax | + | + | — | 3 | N |
| Gastrothylacidae | | | | | | | | | | |
| <i>Carmyerius endopapillatus</i> [6] | 7 | 90° | 4 | — | 1Ax | + | + | + | 1 | N |
| Diplodiscidae | | | | | | | | | | |
| <i>Diplodiscus subclavatus</i> [present study] | 7 | 90° | 4 | + | 1Ax | + | + | + | 1 | N |

ASE, anterior spermatozoon extremity; Ax, axoneme; AZ, attachment zones; CE, cytoplasmic expansion; EO, external ornamentation of plasma membrane; FR, flagellar rotation; IB, intercentriolar body; LE, lateral expansion; M, mitochondrion; N, nucleus; PSE, posterior spermatozoon extremity; SB, spinelike body; +/−, presence/absence of considered character.

granules of glycogen in the anterior extremity of the male gamete as occurs in the case of *D. subclavatus* have never been described. The reason is unknown, but such absence of glycogen might be seen as a particularity of the anterior extremity of spermatozoa in digeneans.

The external ornamentation of the plasma membrane is another element of great phylogenetic interest, sometimes described in the anterior areas of sperm. In the case of *D. subclavatus* this external ornamentation is present in areas containing both cortical microtubules and spinelike bodies, being described in the area closest to the anterior extremity. In most of digeneans the external ornamentation is associated with cortical microtubules, but, in certain species such as *Pronoprymna ventricosa* this ornamentation is not associated with cortical microtubules [48]. With the exception of *Ceylonocotyle scoliocoelium*, a species poorly described [2], the external ornamentation is reported in all the species belonging to the different families of the Paramphistomoidea (see Table 1). Additionally, this structure is observed in other digeneans belonging to the order Echinostomida, namely, *E. caproni* (Echinostomatidae), *F. hepatica*, *F. gigantica* (Fasciolidae), *S. godoyi* (Haplporidae) and *N. neyrai* (Notocotylidae) [20,41,42,45,49]. In *D. subclavatus* several cross-sections observed in areas presenting external ornamentation show a relation between the presence of cortical microtubules and the external ornamentation. Thus, at the level of region I in *D. subclavatus*, sections with and without lateral expansion present this ornamentation located in areas of the sperm cell that contain submembranous cortical microtubules. A similar relation between external ornamentation and cortical microtubules was described in the spermatozoon of *H. medioplexus* [47]. However, contrary to our observations, these authors have mentioned the presence of two types of external ornamentations, (i) the first type is located in the anterior part of the spermatozoon and corresponding to the external ornamentation originated from the differentiation zone and associated with a small number of cortical microtubules, and (ii) the second type is accompanied by the so-called "collerette" and a more important number of cortical microtubules. Moreover, Quilichini et al. [48] discuss the possible existence of two groups of digeneans according to the presence of an anterior external ornamentation and a posterior one. This posterior ornamentation is usually in a mitochondrial region of sperm [i.e., 22,24,35,43,46]. All these aspects give a particular interest to this structure when it comes to understanding the relationships within the digeneans. The role of external ornamentation is unknown, but certain authors [50] consider its possible participation in the fusion of sperm and ovocyte membranes during fertilization. It is interesting to remark that, for organisms such as acanthocephalans, there is an attachment and a penetration of the anterior extremity of sperm in the ovocyte [51,52]. In this sense, certain authors discuss on the possible role of other anterior structures, such as the crested bodies of cestodes in the fertilization [53]. Taking into account that ornamentations are present surrounding the plasma membrane in anterior areas of the spermatozoon of *D. subclavatus* as in other digeneans, it is possible to hypothesize on the participation of these structures in the fertilization.

Additionally, in most digenean spermatozoa with external ornamentation, the presence of spinelike bodies is also reported. However, spinelike bodies are described in areas of the spermatozoon lacking external ornamentation in the apocreadiid *Neoapocreadium chabaudi* [17]. In what refers spinelike bodies, it is also interesting to evaluate its periodicity, if exists. Thus, in *N. chabaudi* [17], *Siphoderina elongata* [54] as occurs in the present study for *D. subclavatus*, the appearance of spinelike bodies is irregularly observed along the sperm. Other species show a periodicity in the appearance of this character, i.e., digeneans belonging to the families Opecoelidae and Fasciolidae [22,42,43,55]. Finally, in other digeneans, the distribution of these elements along the sperm cell has not evaluated, i.e., *D. hospes*, *N. neyrai*, *C. metoecus* or *T. acutum* [24,25,35,49]. To our knowledge, spinelike bodies have never been reported in other taxa belonging to the Platyhelminthes. Thereby, some authors have attempted to establish a parallelism between spinelike bodies observed in digenean spermatozoa and crested bodies described in the spermatozoon of some cestodes [35]. The presence, absence and location of spinelike bodies would be interesting arguments for a comparison amongst digeneans at the family level.

A well-developed lateral expansion was observed in the spermatozoon of *D. subclavatus* and in other paramphistomoideans studied to date (see Table 1). This lateral expansion is present in the anterior area of digenean spermatozoa and it is normally associated with external ornamentation and sometimes with spinelike bodies. Nevertheless, in the case of *H. fasciata* [21], the lateral expansion is not associated with any ornamentation. The morphology of this lateral expansion is variable according to species. In fact, certain digeneans exhibit a simple lateral expansion as described in *Scaphiostomum palaearticum*, *H. fasciata* or *Poracanthium furcatum* [21,55,56], whereas others present a hook-shaped dorsolateral expansion as described in *Troglotrema acutum*, *E. caproni*, *F. hepatica* or *F. gigantica* [20,35,42,45]. The tip of the lateral expansion described in *D. subclavatus* in the present study lacks external ornamentation and cortical microtubules as reported for example in the spermatozoon of fasciolids or echinostomatids [20,42,45]. Additionally, it is noticeable to remark the similarities of the lateral expansion observed in general in the paramphistomoideans and *D. subclavatus* in particular with those reported in the mature spermatid of the aspidogastrean *M. purvisi* [27].

Concerning the mitochondrion, all the paramphistomids studied to date present one mitochondrion except *B. ectorchus* and *S. sudanensis* [5] (see Table 1). These differences could be explained by the difficulties in observing the real number of mitochondria using longitudinal sections, due to the size of the spermatozoon and the impossibility to observe the complete mitochondrion in only one section. In fact, several researchers determine the number of mitochondria by considering a logical interpretation of a great number of cross-sections. The possible application of a mitochondria-labelling technique would be very useful to ascertain the real number of this organelle [35]. In the digenean spermatozoa one to three mitochondria have been described, but never

in the Eucestoda considered as the most evolved group of the Platyhelminthes. The variability in the number of mitochondria is an interesting aspect for explaining the evolutionary relationships within the Platyhelminthes.

The posterior extremity of the spermatozoon of *D. subclavatus* contains only the nucleus as in the other paramphistomoideans (see Table 1). Considering the order Echinostomida, this pattern is also described in the fasciolids [20,42]. In fact, this type of posterior spermatozoon extremity has recently been postulated as type 2 or fasciolidean type by Quilichini et al. [16]. These authors [16] also describe two additional types of posterior extremities, the type 1 or opecoelidean type and the type 3 or cryptogonimidean type. Moreover, recently a fourth morphology of the posterior extremity has been described in the lecithasterid *Aponurus laguncula* [15]. This species presents a posterior spermatozoon extremity characterized by the presence of a mitochondrion and a disorganized axoneme and, to date, this morphology has only been described in this species. It is evident the interest of the posterior spermatozoon extremity as a tool for understanding the relationships within the digenleans, but taking into account the numerous digenlean families unexplored, the consideration of the available data to suprageneric level should be considered with caution at the present state of knowledge.

The great diversity of the Digenea and their complex life cycles are one of the difficulties at the time to elaborate their phylogenetic relationships. However, over the last years the contribution of molecular studies combined with ultrastructural data, have produced considerable advances in this domain. Concerning Cestoda, for which a rich ultrastructural database is available, the use of ultrastructural characters to understand their phylogeny is unquestionable. However, in the digenleans such utilization is not yet established due to the relatively poor database. Thus, present and future studies will contribute to the enrichment of ultrastructural data on the digenlean.

Acknowledgements

Authors wish to thank the "Serveis Científics i Tècnics" of the University of Barcelona for their support in the preparation of samples. A.J.S. Bakhoum benefits from MAEC-AECID doctoral grants (refs. 2009-10 0000448019 and 2010-11 0000538055).

References

- [1] Jones A. In: Jones A, Bray RA, Gibson DI, editors. Superfamily Paramphistomoidea. Fischoeder, 1901. Keys to the Trematoda. Wallingford: CABI Publishing; 2005. p. 221–7.
- [2] Li M-M, Wang X-Y. Spermatogenesis and ultrastructure of the metaphase chromosomes in *Ceylonocotyle scoliocoelium* (Digenea: Paramphistomidae). *Acta Zool Sin* 1997;43:1–9.
- [3] Seck MT, Marchand B, Bâ CT. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Paramphistomum microbovithrium* (Fischoeder 1901; Digenea, Paramphistomidae), a parasite of *Bos taurus* in Senegal. *Parasitol Res* 2007;101: 259–68.
- [4] Seck MT, Marchand B, Bâ CT. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Cytoophoron corylophorum* (Trematoda, Digenea, Paramphistomidae), a parasite of *Bos taurus* in Senegal. *Parasitol Res* 2008;103:157–66.
- [5] Ashour AA, Garo K, Gamal IS. Spermiogenesis in two paramphistomes from Nile fish in Egypt: an ultrastructural study. *J Helminthol* 2007;81:219–26.
- [6] Seck MT, Marchand B, Bâ CT. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Carmyierius endopapillatus* (Digenea, Gastrothylacidae), a parasite of *Bos taurus* in Senegal. *Acta Parasitol* 2008;53:9–18.
- [7] Gibson DI. In: Jones A, Bray RA, Gibson DI, editors. Class Trematoda Rudolphi, 1808. Keys to the Trematoda. Wallingford: CABI Publishing; 2002. p. 1–3.
- [8] Justine J-L. Phylogeny of parasitic platyhelminthes: a critical study of synapomorphies proposed on the basis of the ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa. *Can J Zool* 1991;69:1421–40.
- [9] Justine J-L. Cladistic study in the Monogenea (Platyhelminthes), based upon a parsimony analysis of spermiogenetic and spermatozoal ultrastructural characters. *Int J Parasitol* 1991;21:821–38.
- [10] Justine J-L. Spermatozoal ultrastructure and phylogeny in the parasitic Platyhelminthes. *Mém Mus Natn Hist Nat*, Paris 1995;166:55–86.
- [11] Justine J-L. Spermatozoa as phylogenetic characters for the Eucestoda. *J Parasitol* 1998;84:385–408.
- [12] Justine J-L. Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes. In: Littlewood DTJ, Bray RA, editors. Interrelationships of the Platyhelminthes. London: Taylor and Francis; 2001. p. 231–8.
- [13] Bâ CT, Marchand B. Spermiogenesis, spermatozoa and phyletic affinities in the Cestoda. *Mém Mus Natn Hist Nat*, Paris 1995;166:87–95.
- [14] Levron C, Miquel J, Oros M, Scholz T. Spermatozoa of tapeworms (Platyhelminthes, Eucestoda): advances in ultrastructural and phylogenetic studies. *Biol Rev* 2010;85:523–43.
- [15] Quilichini Y, Foata J, Justine J-L, Bray RA, Marchand B. Spermatozoon ultrastructure of *Aponurus laguncula* (Digenea: Lecithasteridae), a parasite of *Aluterus monoceros* (Pisces, Teleostei). *Parasitol Int* 2010;59:22–8.
- [16] Quilichini Y, Foata J, Justine J-L, Bray RA, Marchand B. Ultrastructural study of the spermatozoon of *Heterolebes maculosus* (Digenea, Opistholebetidae), a parasite of the porcupinefish *Diodon hystrix* (Pisces, Teleostei). *Parasitol Int* 2010;59:427–34.
- [17] Kacem H, Bakhoum AJS, Neifar L, Miquel J. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the digenlean *Neopalaeocreadium chabaudi* (Apocreadiidae), a parasite of *Balistes capricrus* (Pisces, Teleostei). *Parasitol Int* 2010;59:358–66.
- [18] Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963;17:208–12.
- [19] Thiéry JP. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J Microsc* 1967;6:987–1018.
- [20] Ndiaye PI, Miquel J, Fons R, Marchand B. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the liver fluke *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Digenea, Fasciolidae): transmission and scanning electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. *Acta Parasitol* 2003;48:182–94.
- [21] Levron C, Ternengo S, Marchand B. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Helicometra fasciata* (Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Labrus merula* (Pisces, Teleostei). *Acta Parasitol* 2003;48:255–64.
- [22] Quilichini Y, Foata J, Orsini A, Marchand B. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Nicolla wisniewskii* (Digenea: Opecoelidae), an intestinal parasite of brown trout *Salmo trutta* (Pisces: Teleostei). *J Parasitol* 2007;93:469–78.
- [23] Levron C, Ternengo S, Marchand B. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Monorchis parvus* Looss, 1902 (Digenea, Monorchidae), a parasite of *Diplodus annularis* (Pisces, Teleostei). *Parasitol Res* 2004;93:102–10.
- [24] Agostini S, Miquel J, Ndiaye PI, Marchand B. *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 (Digenea, Dicrocoeliidae): spermiogenesis, mature spermatozoon and ultrastructural comparative study. *Parasitol Res* 2005;96:38–48.
- [25] Quilichini Y, Foata J, Orsini A, Marchand B. Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon of *Crepidostomum meteucus* (Digenea: Allocreadiidae), a parasite of *Salmo trutta* (Pisces: Teleostei). *J Parasitol* 2007;93:458–68.
- [26] Watson NA, Rohde K. Ultrastructure of sperm and spermatogenesis of *Rugogaster hydrolagi*, Schell 1973 (Platyhelminthes, Trematoda, Aspidogastrea, Rugogastriidae). *Parasitol Res* 1992;78:516–24.
- [27] Watson NA, Rohde K. Re-examination of spermiogenesis of *Multicotyle purvisii* (Platyhelminthes, Aspidogastrea). *Int J Parasitol* 1995;25:579–86.
- [28] Levron C, Suchanová E, Poddubnaya L. Spermatological characters of the aspidogastrean *Aspidogaster limacoides* Diesing, 1835. *Parasitol Res* 2009;105: 77–85.
- [29] Miquel J, Świderski Z, Mackiewicz JS, Ibraheem MH. Ultrastructure of spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Wenyonia virilis* Woodland, 1923, with reassessment of flagellar rotation in *Glaridacris catostomi* Cooper, 1920. *Acta Parasitol* 2008;53:19–29.
- [30] Bruijnská M, Scholz T, Dezfuli BS, Poddubnaya LG. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Cyathocephalus truncatus* (Pallas 1781) Kessler 1868 (Cestoda: Spathebothriidae). *J Parasitol* 2006;92:884–92.
- [31] Hidalgo C, Miquel J, Torres J, Marchand B. Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon in *Catenotaenia pusilla*, an intestinal parasite of *Mus musculus*. *J Helminthol* 2000;74:73–81.
- [32] Yoneva A, Georgieva K, Mizińska Y, Nikolov PN, Georgiev BB, Stoitsova SR. Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Anonchotaenia globata* (von Linstow, 1879) (Cestoda, Cyclophyllidea, Paruterinidae). *Acta Zool (Stockh)* 2010;91:184–92.
- [33] Ndiaye PI, Miquel J, Marchand B. Ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa of *Taenia parva* Baer, 1926 (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae), a parasite of the common genet (*Genetta genetta*). *Parasitol Res* 2003;89:34–43.
- [34] Miquel J, Świderski Z, Foronda P, Torres J, Feliu C. Ultrastructure of spermatogenesis of *Taenia taeniaeformis* (Batsch, 1786) (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) and comparison of spermatological characters in the family Taeniidae Ludwig, 1886. *Acta Parasitol* 2009;54:230–43.
- [35] Miquel J, Fournier-Chambillon C, Fournier P, Torres J. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the cranial digenean *Troglotrema acutum* (Leuckart, 1842). *J Parasitol* 2006;92:441–53.
- [36] Rees FG. The ultrastructure of the spermatozoon and spermiogenesis in *Cryptocotyle lingua* (Digenea: Heterophyidae). *Int J Parasitol* 1979;9:405–19.
- [37] Castilho F, Barandela T. Ultrastructural study on the spermiogenesis and spermatozoon of the Metacercariae of *Microphallus primas* (Digenea), a parasite of *Carcinus maenas*. *Mol Reprod Dev* 1990;25:140–6.
- [38] Foata J, Quilichini Y, Marchand B. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Deroptyasis inflata* Molin, 1859 (Digenea, Deroptyidae), a parasite of *Anguilla anguilla*. *Parasitol Res* 2007;101:843–52.
- [39] Miquel J, Feliu C, Marchand B. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Mesocestoides literatus* (Cestoda, Mesocestoididae). *Int J Parasitol* 1999;29:499–510.
- [40] Miquel J, Eira C, Świderski Z, Conn DB. *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1782) (Mesocestoididae): new data on sperm ultrastructure. *J Parasitol* 2007;93: 545–52.

- [41] Baptista-Farias M, Kohn FDA, Cohen SC. Ultrastructure of spermatogenesis and sperm development in *Saccocoeioides godoyi* Kohn & Froes, 1986 (Digenea, Haplporidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2001;96:61–70.
- [42] Ndiaye PI, Miquel J, Bâ CT, Marchand B. Ultrastructure of spermogenesis and the spermatozoon of the liver fluke *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856 (Digenea, Fasciolidae), a parasite of cattle in Senegal. J Parasitol 2004;90:30–40.
- [43] Miquel J, Nourrisson C, Marchand B. Ultrastructure of spermogenesis and the spermatozoon of *Opecoeloides furcatus* (Trematoda, Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mullus barbatus* (Pisces, Teleostei). Parasitol Res 2000;86:301–10.
- [44] Ehlers U. Phylogenetisches System der Plathelminthes. Verh Naturwiss Ver Hambg (NF) 1984;27:291–4.
- [45] Iomini C, Justine J-L. Spermiogenesis and spermatozoon of *Echinostoma caproni* (Platyhelminthes, Digenea): transmission and scanning electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. Tissue Cell 1997;29:107–18.
- [46] Quilichini Y, Foata J, Marchand B. Ultrastructural study of the spermatozoon of *Nicolla testibliquum* (Digenea, Opecoelidae) parasite of brown trout *Salmo trutta* (Pisces, Teleostei). Parasitol Res 2007;101:1295–301.
- [47] Justine J-L, Mattei X. Réinvestigation de l'ultrastructure du spermatozoïde d'*Haematoloechus* (Trematoda: Haematoloechidae). J Ultrastruc Res 1982;81: 322–32.
- [48] Quilichini Y, Foata J, Marchand B. Ultrastructural study of the spermatozoon of *Pronoprymna ventricosa* (Digenea, Baccigerinae), a parasite of the twaite shad *Alosa fallax* Lacepede (Pisces, Teleostei). Parasitol Res 2007;101:1125–30.
- [49] Ndiaye PI, Miquel J, Feliu C, Marchand B. Ultrastructure of spermogenesis and spermatozoa of *Notocotylus neyrai* González Castro, 1945 (Digenea, Notocotyliidae) intestinal parasite of *Microtus agrestis* (Rodentia: Arvicolidae) in Spain. Invertebr Reprod Dev 2003;43:105–15.
- [50] Justine J-L, Mattei X. Étude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde d'un Plathelminthe: *Gonapodasmus* (Trematoda: Didymozoidae). J Ultrastruc Res 1982;79:350–65.
- [51] Marchand B, Mattei X. La fécondation chez les acanthocéphales. I. Modifications ultrastructurales des sphères ovarianes et des spermatozoïdes après insémination des femelles de l'acanthocéphale *Neoechinorhynchus agilis*. J Ultrastruc Res 1979;66:32–9.
- [52] Marchand B, Mattei X. Fertilization in Acanthocephala. II. Spermatozoon penetration of oocyte, transformation of gametes and elaboration of the 'fertilization membrane'. J Submicrosc Cytol 1980;12:95–105.
- [53] Bâ CT, Marchand B, Mattei X. Demonstration of the orientation of the Cestodes spermatozoon illustrated by the ultrastructural study of spermogenesis of a Cyclophylliidea: *Thysaniezia ovilla*, Rivolta, 1874. J Submicrosc Cytol Pathol 1991;23:605–12.
- [54] Quilichini Y, Foata J, Justine J-L, Bray RA, Marchand B. Sperm ultrastructure of the digenetic *Siphoderina elongata* (Platyhelminthes, Cryptogonimidae) intestinal parasite of *Nemipterus furcosus* (Pisces, Teleostei). Parasitol Res 2009;105:87–95.
- [55] Levron C, Ternengo S, Marchand B. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Poracanthium furcatum* (Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mullus surmuletus* (Pisces, Teleostei). Acta Parasitol 2004;49:190–200.
- [56] Ndiaye PI, Miquel J, Bâ CT, Feliu C, Marchand B. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Scaphiostomum palaearticum* Mas-Coma, Esteban et Valero, 1986 (Trematoda, Digenea, Brachylaimidae). Acta Parasitol 2002;47:259–71.

III-3 Caractères spermatologiques de *Elstia stossichianum* (Digenea : Mesometridae), parasite intestinal de *Sarpa salpa* de Dakar (Sénégal)

Résumé

Cette étude contribue à l'ampliation de la base de données ultrastructurales chez les Digènes en vue de comprendre leurs relations phylogénétiques. Pour cela, nous décrivons ici la spermiogenèse et le spermatozoïde de *Elstia stossichianum*.

La spermiogenèse commence par la formation d'une zone de différentiation où sont observés : les deux centrioles, les deux racines striées, le noyau, plusieurs mitochondries et un corps intercentriolaire constitué de sept bandes opaques aux électrons. Chaque centriole développe un flagelle libre qui croît perpendiculairement à l'expansion cytoplasmique médiane, avant de se rabattre et devenir parallèle à ladite expansion. Après la rotation flagellaire, a lieu une fusion proximo-distale des flagelles avec l'expansion cytoplasmique médiane, mais avant cette fusion, noyau et mitochondries migrent au sein de l'expansion médiane. Finalement, l'étranglement de l'anneau de membranes arquées libère le jeune spermatozoïde du cytoplasme résiduel.

En ce qui concerne le spermatozoïde, on y observe la présence des deux axonèmes de type 9+‘1’ des Plathelminthes Trepaxonemata, du noyau, d'une mitochondrie, des microtubules corticaux, des ornementations externes, d'une expansion latérale, des corps épineux, des boutons cytoplasmiques ornementés, et des granules de glycogène.

De plus, la formation des boutons cytoplasmiques ornementés est décrite pour la première fois dans cette étude.

Mots clés :

Elstia stossichianum, Mesometridae, Microscaphidioidea, Digenea, Boutons cytoplasmiques ornementés, Spermiogenèse, Spermatozoïde, Ultrastructure

1 Spermatological characteristics of *Elstia* 2 *stossichianum* (Digenea, Mesometridae) 3 from the intestine of the cow bream 4 (*Sarpa salpa*) off Dakar, Senegal

5 **A.J.S. Bakhoum^{1,2}, P.I. Ndiaye³, C.T. Bâ³ and J. Miquel^{1,2*}**

6 ¹Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i
 7 Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona,
 8 Av. Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Spain; ²Institut de Recerca de la
 9 Biodiversitat, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal,
 10 645, E-08028 Barcelona, Spain; ³Laboratory of Evolutionary Biology,
 11 Ecology and Management of Ecosystems, Faculty of Sciences and
 12 Techniques, Cheikh Anta Diop University of Dakar, Senegal

13 (Received 20 February 2012; Accepted 9 July 2012)

14 Abstract

15 The current study was designed to increase the spermatological ultra-
 16 structural database on Digenea, thus contributing to the future establishment
 17 of phylogenetic relationships within this group based on ultrastructural
 18 characteristics of both spermiogenesis and spermatozoa. Spermiogenesis in
 19 *Elstia stossichianum* begins with the formation of a differentiation zone containing
 20 two centrioles, two striated rootlets, a nucleus, several mitochondria and
 21 an intercentriolar body constituted by seven electron-dense layers. Each
 22 centriole develops into a free flagellum growing orthogonally to the median
 23 cytoplasmic process. Proximo-distal fusion of the flagella with the median
 24 cytoplasmic process occurs after flagellar rotation. Both nucleus and
 25 mitochondria migrate before the complete proximo-distal fusion of both flagella
 26 with the median cytoplasmic process. Finally, the constriction of the ring of
 27 arched membranes gives rise to the young spermatozoon. The mature
 28 spermatozoon of *E. stossichianum* exhibits two axonemes of different length of
 29 the 9 + '1' trepaxonematan pattern, a nucleus, a mitochondrion, two bundles of
 30 parallel cortical microtubules, external ornamentation of the plasma membrane,
 31 a lateral expansion, spine-like bodies, cytoplasmic ornamented buttons and
 32 granules of glycogen. The formation of cytoplasmic ornamented buttons during
 33 the final stages of spermiogenesis is reported here for the first time.

34 Introduction

35 The family Mesometridae (Digenea) includes species
 36 that are usually found on the intestine of teleost fishes
 37 of the families Sparidae and Acanthuridae, which are
 38 generally restricted to the Mediterranean Sea. However,
 39 certain species are also present in the Atlantic and Pacific

40 oceans. To date, the family Mesometridae contains only
 41 eight recognized species belonging to five genera, named
 42 *Centroderma*, *Elstia*, *Mesometra*, *Parawardula* and *Wardula*
 43 (Jones & Blair, 2005; Pérez-del Olmo *et al.*, 2006).

44 Ultrastructural studies of spermiogenesis and sperma-
 45 tozoa in the Platyhelminthes, and in particular the
 46 Digenea, have revealed much diversity in their charac-
 47 teristics. This diversity is of great importance and
 48 usefulness for phylogenetic reconstructions (Hendelberg,
 49 1969; Euzet *et al.*, 1981; Ehlers, 1984; Świderski, 1986;

*Fax: + 34 93 402 45 04
 E-mail: jordimiquel@ub.edu

Justine, 1991, 1995, 1998, 2001; Bâ & Marchand, 1995; Bruñanská, 2010; Levron *et al.*, 2010; Quilichini *et al.*, 2010a, b). Concerning the family Mesometridae, to date there has been only one ultrastructural study that has focused on *Wardula capitellata* (see Bakhoun *et al.*, 2012). The aim of the present work was to perform an ultrastructural study of spermiogenesis and of the spermatozoon of *Elstia stossichianum*, a second mesometrid species that belongs to another of the five existing genera of this family.

Materials and methods

Living adult specimens of *E. stossichianum* (Monticelli, 1892) were collected from the intestine of naturally infected sparid teleosts, *Sarpa salpa* (Linnaeus, 1758), captured off the coast of Dakar (Senegal).

Adult worms were examined in 0.9% sodium chloride solution and subsequently processed for transmission electron microscopy. Specimens were fixed in cold (4°C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4 for 2 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4, post-fixed in cold (4°C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4, dehydrated in an ethanol series and propylene oxide, and finally embedded in Spurr resin. Ultrathin sections were obtained using a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome, placed on copper grids and double-stained with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds (1963).

The presence of glycogen was detected using the method of Thiéry (1967). Gold grids were treated in periodic acid, thiocarbohydrazide and silver proteinate

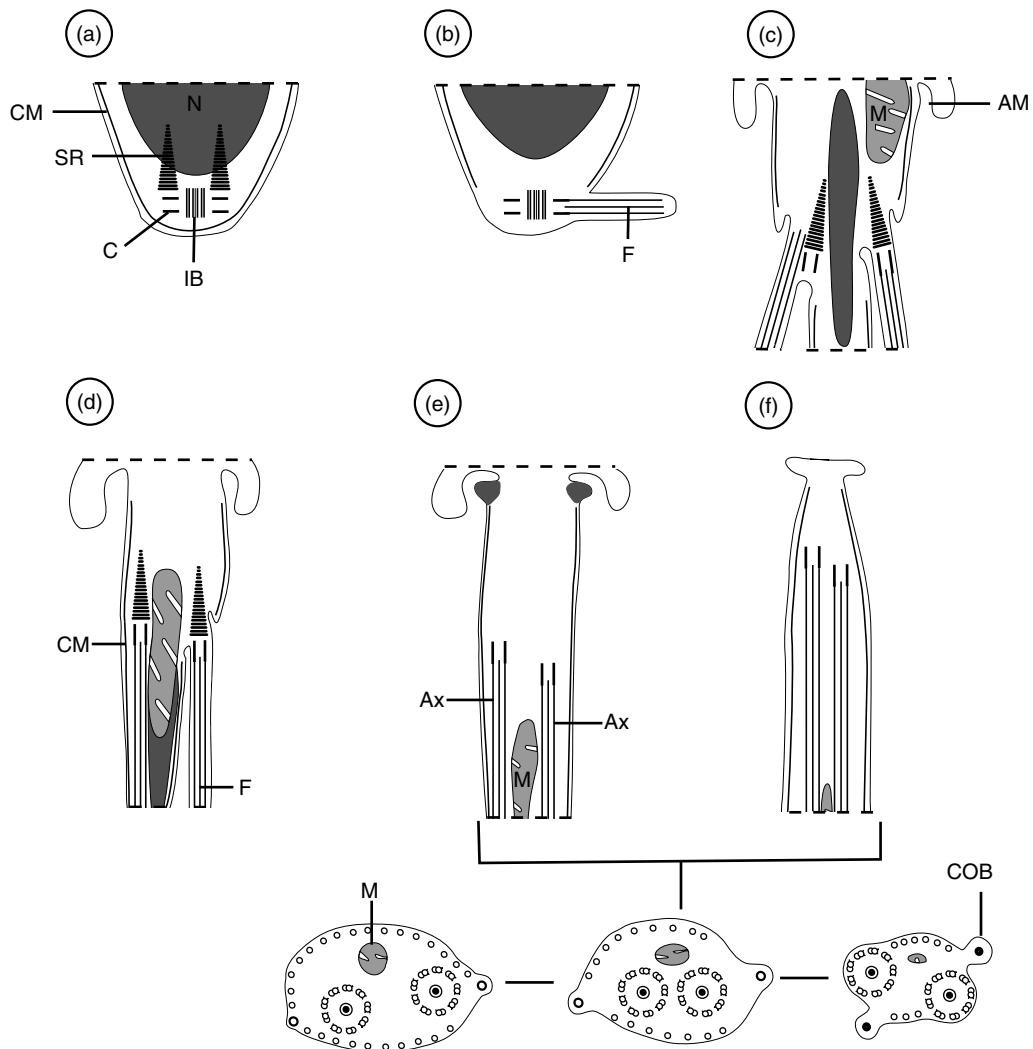


Fig. 1. Reconstruction of the main stages of spermiogenesis of *Elstia stossichianum*. AM, Arched membrane; Ax, axoneme; CM, cortical microtubules; COB, cytoplasmic ornamented button; F, flagellum; IB, intercentriolar body; M, mitochondrion; N, nucleus; SR, striated rootlet.

(PA-TCH-SP) as follows: 30 min in 10% PA, rinsed in distilled water, 24 h in TCH, rinsed in acetic solutions and distilled water, 30 min in 1% SP in the dark, and rinsed in distilled water.

Finally, both copper and gold grids were examined using a JEOL 1010 transmission electron microscope at an accelerating voltage of 80 kV.

Results

Spermiogenesis

Spermiogenesis in *E. stossichianum* begins by the formation of a differentiation zone containing a nucleus, several mitochondria, two centrioles associated with striated rootlets and an intercentriolar body (figs 1a and 2a). The intercentriolar body is made up of seven

electron-dense layers (fig. 2c). Each centriole develops a free flagellum growing orthogonally to a median cytoplasmic process (figs 1b and 2b). Later, these flagella rotate and become parallel to the median cytoplasmic process (figs 1c and 2d-g). During flagellar rotation, the nucleus and mitochondria migrate along the spermatid body (figs 1c, d, 2e, f and 3a). However, the migration of the nucleus occurs before the migration of mitochondria (figs 2f and 3a). Four attachment zones are already visible in the median cytoplasmic process before its fusion with the flagella (fig. 1g). The proximo-distal fusion is asynchronous (figs 1d, 2f and 3a). Before the total constriction of the ring of arched membranes the striated rootlets are still present in the spermatid's cytoplasm (fig. 3b). During the final stages of spermiogenesis, both lateral expansion and external ornamentation are observed in the proximal areas of the spermatid (fig. 3d).

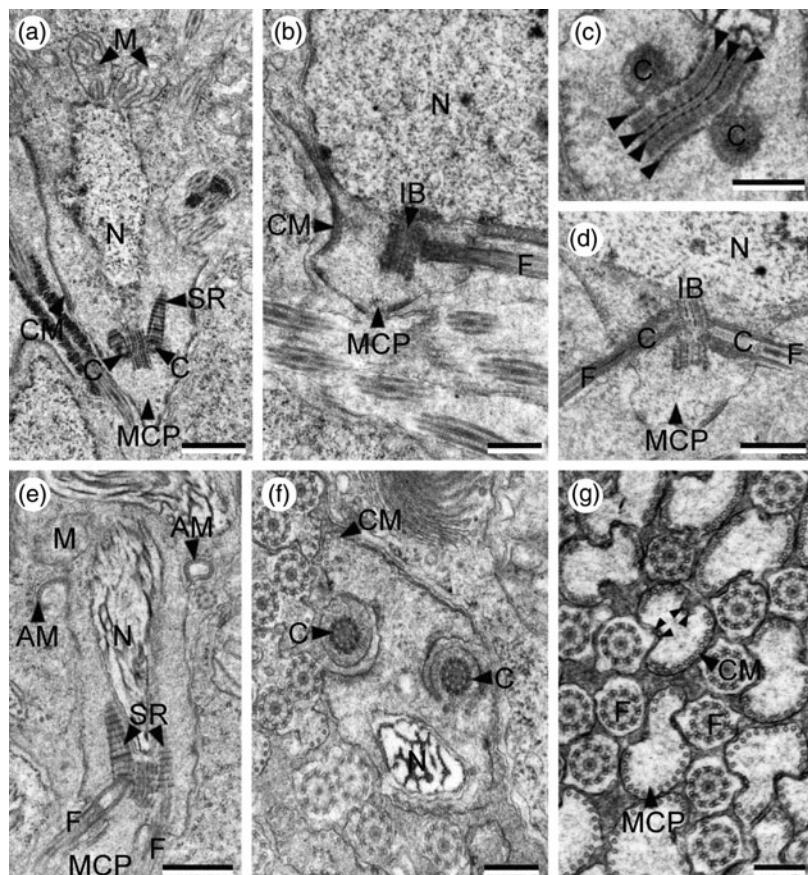


Fig. 2. Spermiogenesis of *Elstia stossichianum*. (a) Longitudinal section of a differentiation zone showing centrioles (C) associated with striated rootlets (SR) and intercentriolar body (IB). CM, Cortical microtubules; M, mitochondria; MCP, median cytoplasmic process; N, nucleus. Scale bar: 1 µm. (b) Orthogonal development of one flagellum (F). CM, Cortical microtubules; IB, intercentriolar body; MCP, median cytoplasmic process; N, nucleus. Scale bar: 0.5 µm. (c) Detail of intercentriolar body exhibiting seven electron-dense layers (arrowheads); C, centrioles. Scale bar: 0.3 µm; (d) Longitudinal section in which two flagella (F) rotate toward the median cytoplasmic process (MCP). C, Centrioles; IB, intercentriolar body; N, nucleus. Scale bar: 0.5 µm. (e) Differentiation zone with flagella (F) nearly parallel to the median cytoplasmic process (MCP) and showing the elongation of nucleus (N). AM, Arched membrane; M, mitochondrion; SR, striated rootlet. Scale bar: 0.5 µm. (f) Cross-section of a differentiation zone at the level of centrioles (C) before the proximo-distal fusion of flagella. CM, cortical microtubules; N, nucleus. Scale bar: 0.3 µm. (g) Cross-sections before the proximo-distal fusion showing free flagella (F) and median cytoplasmic processes (MCP). Note the four attachment zones (AZ) (arrowheads); CM, cortical microtubules. Scale bar: 0.3 µm.

113 Additionally, electron-dense material is observed near the
 114 ring of arched membranes, and mitochondrial migration
 115 is still occurring (figs 1e and 3c). This electron-dense
 116 material gives rise to prominent electron-dense structures
 117 in the final stage of spermiogenesis (fig. 3g) that form the
 118 forked anterior extremity in the future spermatozoon
 119 after the constriction of the ring of arched membranes
 120 (figs 1f and 3h, i). During the spermiogenesis of
 121 *E. stossichianum* it was also possible to observe for the
 122 first time the formation of cytoplasmic ornamented
 123 buttons (figs 1e, f and 3e, f).

Spermatozoon

124 The observation of numerous cross- and longitudinal
 125 sections enabled us to establish three regions (I–III) from
 126 the anterior to the posterior spermatozoon extremity
 127

128 considering the presence of different ultrastructural
 129 characteristics.

130 Region I corresponds to the anterior spermatozoon
 131 extremity with an external morphology showing a forked
 132 anterior tip (figs 4I and 5a). This anterior spermatozoon
 133 extremity contains the centrioles of two axonemes which
 134 exhibit the typical 9 + 1' pattern of the trepanemata
 135 Platyhelminthes and it also exhibits a continuous and
 136 submembranous layer of parallel cortical microtubules
 137 (fig. 5a and b). In the middle part of region I (the
 138 ornamented area), it is possible to observe a mitochon-
 139 drion, an external ornamentation, a lateral expansion,
 140 spine-like bodies and cytoplasmic ornamented buttons
 141 (figs 4I and 5c–f). In this area, initially the cortical
 142 microtubules describe a continuous layer interrupted by
 143 two attachment zones (fig. 5c and d). Later, cross-sections
 144 with two or one cytoplasmic ornamented buttons

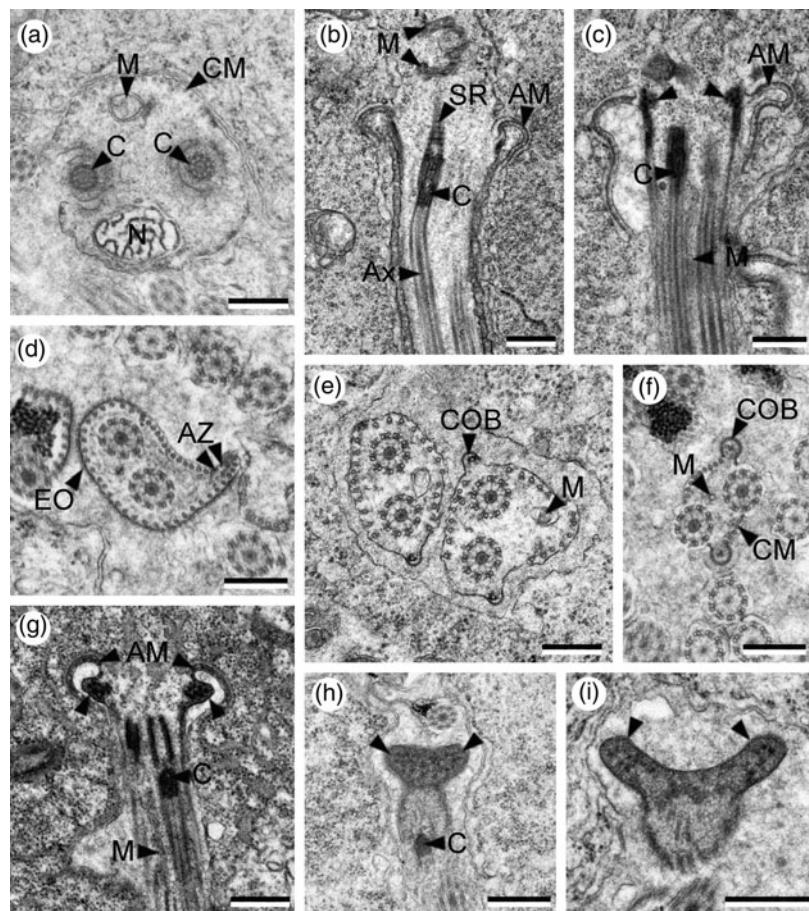


Fig. 3. Spermiogenesis of *Elstia stossichianum*. (a) Cross-section of a differentiation zone at the level of centrioles (C) indicating the asynchronous proximo-distal fusion of flagella. CM, cortical microtubules; M, mitochondrion; N, nucleus. Scale bar: 0.3 µm. (b–c) Longitudinal sections after the proximo-distal fusion in which electron-dense material (arrowheads) is observed at the arched membranes (AM) level. Ax, axoneme; C, centriole; M, mitochondrion; SR, striated rootlet. Scale bars: 0.5 µm. (d) Appearance of lateral expansion in spermiogenesis. AZ, attachment zones; EO, external ornamentation. Scale bar: 0.3 µm. (e–f) Cross-sections showing different stages of appearance of cytoplasmic ornamented buttons (COB). M, mitochondrion. Scale bars: 0.3 µm. (g) Longitudinal section showing the constriction of the ring of arched membranes (AM). Note the formation of future anterior forked extremity of the spermatozoon (arrowheads). C, centriole; M, mitochondrion. Scale bar: 0.5 µm; (h–i) Longitudinal sections after liberation of the young spermatozoon showing the progressive development of the forked anterior extremity (arrowheads); C, centriole. Scale bars: 0.5 µm (h), 0.3 µm (i).

Spermatozoa of *Elstia stossichianum*

5

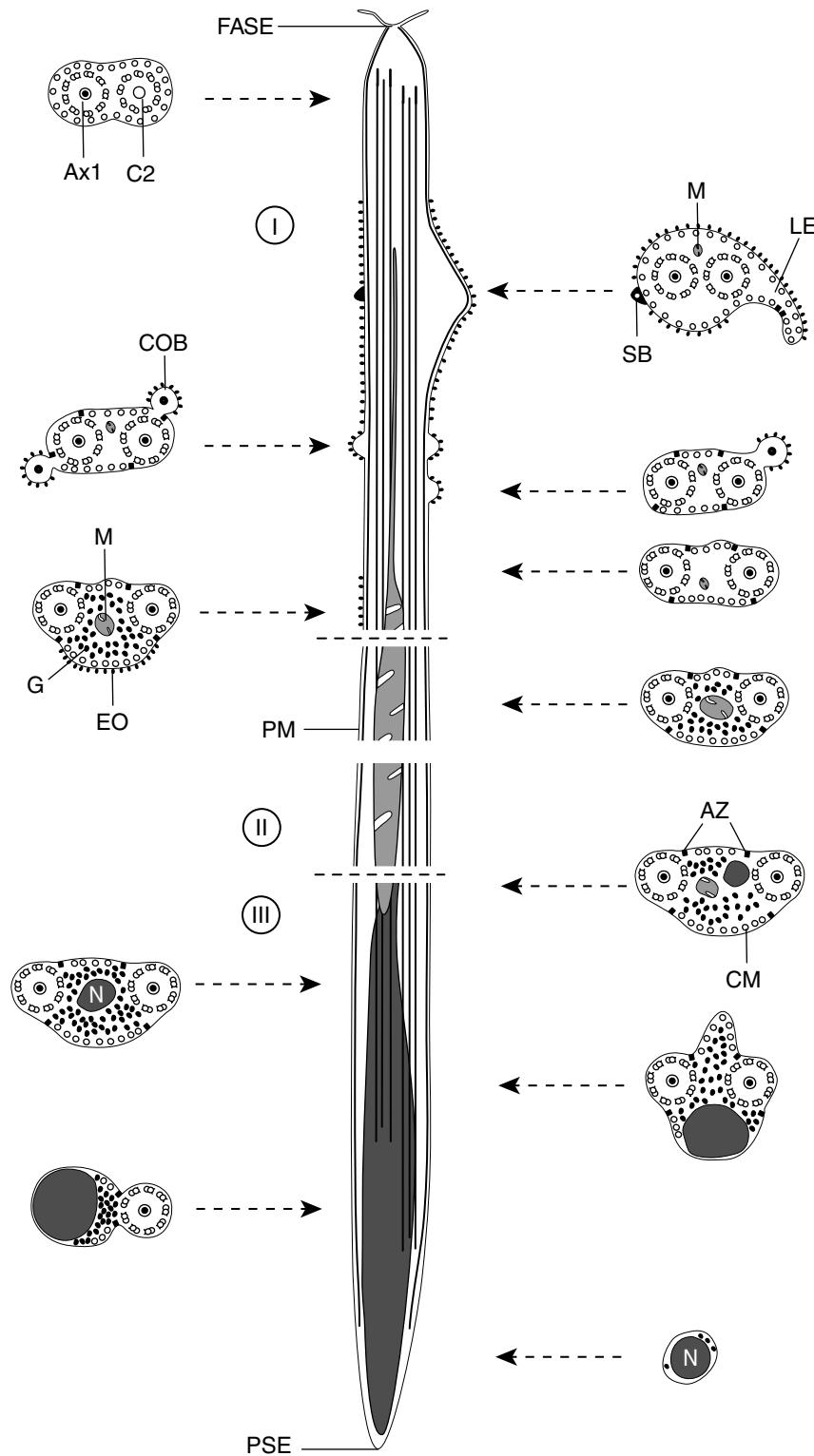


Fig. 4. Schematic reconstruction of mature spermatozoon of *Elstia stossichianum*; to simplify the drawing, granules of glycogen are not shown in the longitudinal section. Ax1, first axoneme; Ax2, second axoneme; AZ, attachment zone; C2, second centriole; CM, cortical microtubule; COB, cytoplasmic ornmented button; EO, external ornamentation; FASE, forked anterior spermatozoon extremity; G, glycogen; LE, lateral expansion; M, mitochondrion; N, nucleus; PM, plasma membrane; PSE, posterior spermatozoon extremity; SB, spine-like body.

exhibit four attachment zones and, thus, parallel cortical microtubules become arranged into two fields: the first with about 9–13 units and the second with approximately 4–9 units (fig. 5e and f). In the distal part of region I, the mature spermatozoon lacks most of these structures and exhibits only the external ornamentation and two bundles of parallel cortical microtubules (fig. 5g and h). Moreover, this distal part of region I is also characterized by the appearance of a large amount of granules of glycogen (fig. 5h), unequivocally evidenced by the test of Thiéry (1967) (fig. 6f). It is interesting to note the presence of a thin part of the mitochondrion in a large area of this region (figs 4I and 5d–h).

Region II is characterized by the increased size of the mitochondrion. This region also exhibits both axonemes, the two bundles of cortical microtubules constituted by a few units and granules of glycogen (figs 4II and 5i).

Region III is the nuclear area of the spermatozoon. The transition between regions II and III is marked by the simultaneous presence of the posterior part of the mitochondrion and the initial part of the nucleus (figs 4III and 6a). Posteriorly, when the mitochondrion disappears the nucleus progressively increases in size (fig. 6b and c). The nuclear region is also characterized by the presence of the axonemes, cortical microtubules and granules of glycogen (figs 4III and 6a–d). Near the posterior spermatozoon extremity both of the axonemes disappear (fig. 6d) one after the other (fig. 6e). Glycogen and cortical microtubules also decrease progressively and, thus, the posterior tip of the spermatozoon contains only the nucleus with a very few granules of glycogen and some microtubules (singlets from the second axoneme or cortical microtubules) (fig. 6e).

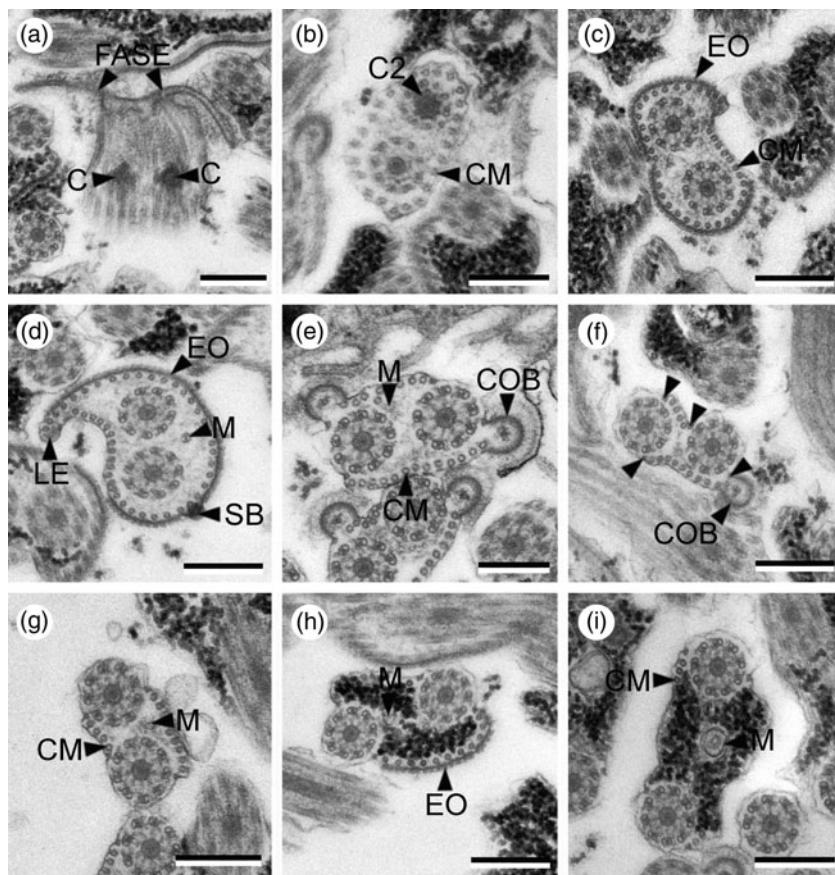


Fig. 5. Spermatozoon of *Elstia stossichianum*. (a) Forked anterior spermatozoon extremity (FASE) showing centrioles (C) of the two axonemes. Scale bar: 0.3 µm. (b) Cross-section with first complete axoneme and centriole of the second axoneme (C2). Note a continuous layer of cortical microtubules (CM). Scale bar: 0.3 µm. (c) Appearance of external ornamentation (EO) around the two axonemes; CM, cortical microtubules. Scale bar: 0.3 µm. (d) Cross-section showing lateral expansion (LE) accompanied by cortical microtubules (CM), external ornamentation of the plasma membrane (EO) and spine-like body (SB); M, mitochondrion. Scale bar: 0.3 µm. (e–f) Cross-sections showing cytoplasmic ornated buttons (COB). Note the presence of four attachment zones (arrowheads) and filiform mitochondrion (M). CM, Cortical microtubules. Scale bars: 0.3 µm. (g) Cross-section without cytoplasmic ornated buttons showing two fields of cortical microtubules (CM); M, mitochondrion. Scale bar: 0.3 µm. (h–i) Cross-sections showing the appearance of granules of glycogen (G) and the progressive increase in the size of the mitochondrion (M). CM, cortical microtubules; EO, external ornamentation. Scale bars: 0.3 µm.

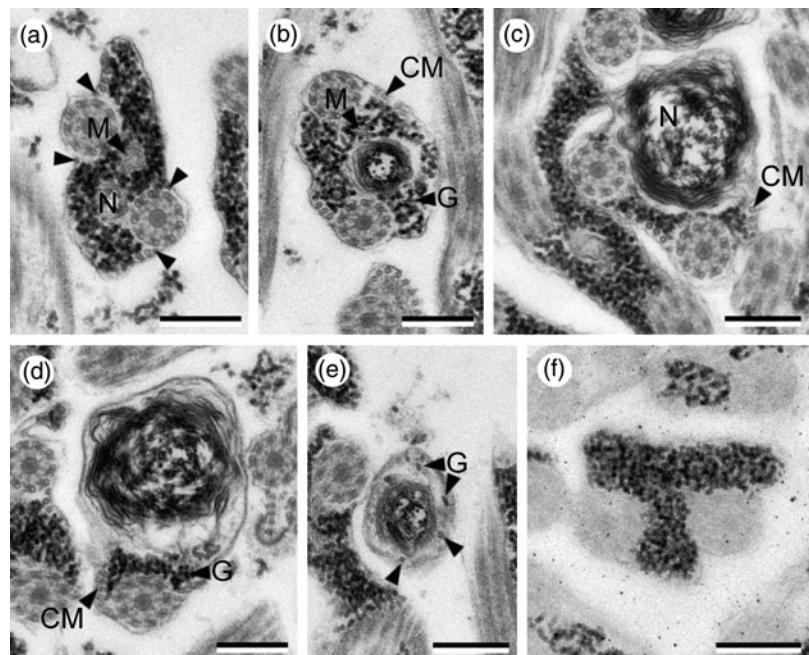


Fig. 6. Spermatozoon of *Elstia stossichianum*. (a–b) Cross-sections at nuclear area exhibiting two axonemes, mitochondrion (M) and nucleus (N). Note the position of the nucleus between axonemes. Arrowheads, attachment zones; CM, cortical microtubules; G, granules of glycogen. Scale bars: 0.3 µm. (c) Cross-section characterized by an eccentric position of the nucleus (N) and disappearance of the mitochondrion. CM, cortical microtubules. Scale bar: 0.3 µm. (d) Cross-section toward posterior spermatozoon extremity. Note the disappearance of the first axoneme. CM, cortical microtubules; G, granules of glycogen. Scale bar: 0.3 µm. (e) Posterior spermatozoon extremity exhibiting only a nucleus and a few granules of glycogen (G). Note the presence of some microtubules (arrowheads). Scale bar: 0.3 µm. (f) Granules of glycogen evidenced by the test of Thiéry (1967). Scale bar: 0.3 µm.

Discussion

Spermiogenesis

179
180
181 Spermiogenesis in *E. stossichianum* follows the general
182 pattern previously described in the Digenea apart
183 from schistosomatids and didymozoids (Justine, 2003).
184 Spermiogenesis begins by the growth of two flagella
185 and the elongation of a median cytoplasmic process
186 from the differentiation zone containing two centrioles
187 associated with striated rootlets, an intercentriolar body
188 and submembranous cortical microtubules. This pattern
189 of spermiogenesis is observed in most digenleans
190 (see Ndiaye *et al.*, 2003, 2004; Levron *et al.*, 2004; Miquel
191 *et al.*, 2006) and has also been described in *W. capitellata*,
192 the other mesometrid studied previously (table 1).

193 During spermiogenesis a flagellar rotation of 90°,
194 described generally in other digenleans species (see Foata
195 *et al.*, 2007; Seck *et al.*, 2007, 2008a, b), is also reported in
196 this study. However, in some digenleans a flagellar
197 rotation greater than 90° has been reported. This was
198 the case in *Fasciola hepatica*, *Helicometra fasciata*, *Mono-*
199 *rchis parvus*, *Dicrocoelium hospes* and *Nicolla wisniewskii*
200 (Levron *et al.*, 2003, 2004; Ndiaye *et al.*, 2003; Agostini
201 *et al.*, 2005; Quilichini *et al.*, 2007c). The importance of
202 the variability in the angle of rotation has been
203 discussed by several authors, who considered that it
204 would be useful in the interpretation of relationships
205 within the Platyhelminthes in general and within the
206 digenleans in particular (Miquel *et al.*, 2006; Bakhoum
207 *et al.*, 2011a, b).

Table 1. Ultrastructural spermatological characters of Mesometridae species.

| Species | Spermiogenesis | | | Spermatozoon | | | | | | | | References |
|-----------------------------|----------------|-----|-----|--------------|------|----|----|----|-----|---|-----|------------------------------|
| | AZ | IB | FR | ASE | FASE | LE | EO | SB | COB | M | PSE | |
| <i>Elstia stossichianum</i> | 4 | 7 | 90° | 2Ax | + | 1 | + | + | + | 1 | N | Present study |
| <i>Wardula capitellata</i> | 4 | 6–7 | 90° | 2Ax | | 2 | + | + | + | 1 | N | Bakhoum <i>et al.</i> (2012) |

ASE, anterior spermatozoon extremity; Ax, axoneme; AZ, attachment zones; COB, cytoplasmic ornamented button; EO, external ornamentation; FASE, forked anterior spermatozoon extremity; FR, flagellar rotation; IB, intercentriolar body; M, number of mitochondria; N, nucleus; PSE, posterior spermatozoon extremity; SB, spine-like body; +, presence of considered character.

With respect to the intercentriolar body, the phylogenetic interest of this characteristic is related to its progressive reduction in evolved taxa of Platyhelminthes. It is constituted by 11 electron-dense layers in aspidogastreans (sister group of digeneans) and by nine, seven, six or five layers in digeneans (see Bakhoun *et al.*, 2011a, b). Nevertheless, the most frequent situation in digeneans is the presence of seven electron-dense layers, as occurs in *E. stossichianum*.

Apart from the previously described structures, spermiogenesis in *E. stossichianum* and also in *W. capitellata* (Bakhoun *et al.*, 2012) is characterized by the presence of cytoplasmic ornamented buttons described for the first time in these species. Indeed, the formation of these buttons is observed when both flagella have already fused with the median cytoplasmic process in the advanced stages of spermiogenesis. In *E. stossichianum*, during migration of mitochondria, these buttons appear to be slightly protruding. Later, when the mitochondrion has completed its migration, the ornamented buttons increase in size and show their final morphology, and at this stage only remnants of mitochondrial migration are observed in these sections. The description of the formation of these cytoplasmic ornamented buttons is very important for understanding and interpreting their presence in the mature spermatozoon (whether related or not to lateral expansions).

Spermatozoon

In digenean spermatozoa four ultrastructural characteristics appear common to all species studied, except those belonging to the schistosomatids and didymozoids. These characteristics are: (1) two axonemes of the 9 + 1' trepanematan pattern; (2) nucleus; (3) one or more mitochondria; and (4) parallel cortical microtubules. In addition to these four classical structures, several characteristics have been described and proposed recently as interesting tools for phylogenetic purposes: lateral expansions, external ornamentation, spine-like bodies, cytoplasmic ornamented buttons and the morphologies of anterior and posterior spermatozoon extremities (see Miquel *et al.*, 2006; Quilichini *et al.*, 2010b, 2011; Bakhoun *et al.*, 2012).

The forked anterior spermatozoon tip, which was observed and described for the first time in the present study in *E. stossichianum*, has not been observed in *W. capitellata* (Bakhoun *et al.*, 2012) (table 1). However, considering this anterior spermatozoon extremity, both of the studied mesometrids (*W. capitellata* and *E. stossichianum*; Bakhoun *et al.*, 2012; present study) exhibit two axonemes slightly displaced longitudinally. Such axoneme disposition has been reported in other digenean species, namely *Haematoloechus medioplexus*, *Echinostoma caproni*, *N. testiobliquum*, *N. wisniewskii* and *Rubenstrema exasperatum* (Justine & Mattei, 1982; Iomini & Justine, 1997; Quilichini *et al.*, 2007a, c; Bakhoun *et al.*, 2011a). However, another difference is observed in the anterior spermatozoon areas of the mesometrids studied until now. In fact, two lateral expansions have been observed in the anterior spermatozoon region in *W. capitellata* (Bakhoun *et al.*, 2012), while in *E. stossichianum* only one lateral expansion has been noted. One lateral expansion

has been reported in other digenean species belonging to different families, e.g. Echinostomatidae (Iomini & Justine, 1997), Fasciolidae (Ndiaye *et al.*, 2003, 2004), Paramphistomidae (Seck *et al.*, 2008a, b), Pronocephalidae (Ndiaye *et al.*, 2011) and Troglotrematidae (Miquel *et al.*, 2006).

The external ornamentation of the plasma membrane, localized in the anterior spermatozoon region, is another interesting characteristic for phylogenetic purposes. These structures evidenced in *E. stossichianum* are also present in *W. capitellata* (Bakhoun *et al.*, 2012) and they have been reported in most digenean spermatozoa (see Iomini & Justine, 1997; Ndiaye *et al.*, 2003, 2004, 2011; Quilichini *et al.*, 2010a; Bakhoun *et al.*, 2011a, b). Nevertheless, different external ornamented areas have been distinguished in the two mesometrids studied until now: (1) external ornamentation at the level of the lateral expansions; (2) ornamentation associated with the cytoplasmic buttons; and (3) more posterior ornamentation covering only the ventral side of the spermatozoon. In this respect, Quilichini *et al.* (2007b) have proposed two groups of digeneans according to the ornamentation's location: (1) digeneans presenting an anterior external ornamentation and (2) those exhibiting posterior external ornamentation, generally observed in the mitochondrial side of the spermatozoon. In the present study we describe a discontinuous external ornamentation, as occurs in the case of the other mesometrid that has been studied, *W. capitellata* (see Bakhoun *et al.*, 2012). This discontinuity in the external ornamentation of the plasma membrane is quite exceptional, but it is interesting to remark that Justine & Mattei (1982) described two types of external ornamentations showing a discontinuity in the spermatozoon of *H. medioplexus*.

In addition to lateral expansions and external ornamentation, spine-like bodies represent another characteristic of phylogenetic interest described in the anterior region of the spermatozoa of many species (see Bakhoun *et al.*, 2011a, b). Considering the representatives of Mesometridae, spine-like bodies are observed in the area containing lateral expansion both in *W. capitellata* (Bakhoun *et al.*, 2012) and in *E. stossichianum* (present study). This is also the case with many digenean species, particularly those belonging to the families Diplodiscidae, Gastrothylacidae, Paramphistomidae and Pronocephalidae (see Seck *et al.*, 2007, 2008a, b; Bakhoun *et al.*, 2011b; Ndiaye *et al.*, 2011). The association of lateral expansion, external ornamentation and spine-like bodies observed in the above-mentioned families has been discussed by Ndiaye *et al.* (2011). In future, this association may be useful when establishing spermatozoological patterns within digeneans.

In anterior areas of the spermatozoa of the two mesometrids studied until now there is an interesting structure, cytoplasmic ornamented buttons, which were described for the first time in *W. capitellata* (Bakhoun *et al.*, 2012). In the latter study, this characteristic was interpreted as a possible reduction of the two lateral expansions, thus giving rise to cytoplasmic ornamented buttons. However, in *E. stossichianum* it was possible to observe (1) the formation of cytoplasmic ornamented buttons during spermiogenesis; and (2) the presence of only one lateral expansion in the mature spermatozoon.

These observations seem to indicate that cytoplasmic ornamented buttons and lateral expansions are unrelated structures. Thus, in our opinion, the cytoplasmic ornamented buttons, to date described only in the representatives of the family Mesometridae, should be considered new ultrastructural characteristics in digenetic spermatozoa. In future, it would be particularly interesting to perform ultrastructural spermiological studies on the other genera of Mesometridae (*Mesometra*, *Centroderma* and *Parawardula*), and also on representatives of their closely related family, Microscaphidiidae.

A posterior spermatozoon extremity exhibiting only a nucleus is described in *W. capitellata* and in *E. stossichianum*, and has also been reported in many other digenetic species, particularly in those belonging to Paramphistomoidea (Bakhoum *et al.*, 2011b), Faciolidae (Ndiaye *et al.*, 2003, 2004) and Pronocephalidae (Ndiaye *et al.*, 2011). In addition, a posterior spermatozoon extremity with a nucleus has also been reported in the aspidogastreans, which is considered a sister group of digenetics. Such similarities allow us to consider the presence of a nucleus in the posterior spermatozoon extremity as a basal characteristic in digenetics. However, more attention and studies are needed, because determination of a posterior spermatozoon extremity in digenetics has been a matter of discussion. Some authors, such as Quilichini *et al.* (2010b), have proposed ending sequences for posterior spermatozoon extremities in digenetics, while in most descriptions only the posterior element is considered.

Present spermatological knowledge reveals many similarities between ultrastructural characteristics of the two mesometrids *W. capitellata* and *E. stossichianum* (see Bakhoum *et al.*, 2012; present study) and those of species described earlier belonging to the superfamily Paramphistomoidea (see Bakhoum *et al.*, 2011b). In fact, several authors had nested Mesometridae in the superfamily Paramphistomoidea (see Cribb *et al.*, 2001). However, the systematic position of mesometrids remains controversial (see Cribb *et al.*, 2001; Jones & Blair, 2005). While the presence of lateral expansion could approach the Mesometridae to the Paramphistomoidea, the presence of cytoplasmic ornamented buttons would be a valuable and additional argument for excluding mesometrids from the superfamily Paramphistomoidea.

Acknowledgements

The authors would like to thank the personnel of 'Unitat de Microscòpia, Facultat de Medicina, Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB)' for their support in the preparation of samples. The present study was partially supported by the PCI projects (no. A/023428/09 and no. A/030039/10) of the 'Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID)'. A.J.S. Bakhoum benefits from a MAEC-AECID doctoral grant (2010-11, no. 0000538055).

References

- Agostini, S., Miquel, J., Ndiaye, P.I. & Marchand, B. (2005) *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 (Digeneta, Dicrocoeliidae): spermiogenesis, mature spermatozoon and ultrastructural comparative study. *Parasitology Research* **96**, 38–48.
- Bâ, C.T. & Marchand, B. (1995) Spermiogenesis, spermatozoa and phyletic affinities in the Cestoda. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle* **166**, 87–95.
- Bakhoum, A.J.S., Bâ, C.T., Shimalov, V.V., Torres, J. & Miquel, J. (2011a) Spermatozoal characters of the digenetic *Rubenstrema exasperatum* (Rudolphi, 1819) (Plagiorchioidea, Omphalometridae). *Parasitology Research* **108**, 1283–1293.
- Bakhoum, A.J.S., Torres, J., Shimalov, V.V., Bâ, C.T. & Miquel, J. (2011b) Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) (Paramphistomoidea, Diplodiscidae), an intestinal fluke of the pool frog *Rana lessonae* (Amphibia, Anura). *Parasitology International* **60**, 64–74.
- Bakhoum, A.J.S., Ndiaye, P.I., Sène, A., Bâ, C.T. & Miquel, J. (2012) Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of *Wardula capitellata* (Digeneta, Mesometridae) an intestinal parasite of the sparid teleost *Sarpa salpa* in Senegal. *Acta Parasitologica* **57**, 34–45.
- Bruňanská, M. (2010) Recent insights into spermatozoa development and ultrastructure in the Eucestoda. pp. 327–354 in Lejeune, T. & Delvaux, P. (Eds) *Human spermatozoa: maturation, capacitation and abnormalities*. New York, NOVA Science Publishers.
- Cribb, T.H., Bray, R.A., Littlewood, D.T.J., Pichelin, S.P. & Herniou, E.A. (2001) The Digeneta. pp. 168–185 in Littlewood, D.T.J. & Bray, R.A. (Eds) *Interrelationships of the Platyhelminthes*. London, Taylor and Francis.
- Ehlers, U. (1984) Phylogenetisches System der Plathelminthes. *Verhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg (NF)* **27**, 291–294.
- Euzet, L., Świderski, Z. & Mokhtar-Maamouri, F. (1981) Ultrastructure comparée du spermatozoïde des Cestodes. Relations avec la phylogénèse. *Annales de Parasitologie (Paris)* **56**, 247–259.
- Foata, J., Quilichini, Y. & Marchand, B. (2007) Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Deropristis inflata* Molin, 1859 (Digeneta, Deropristidae), a parasite of *Anguilla anguilla*. *Parasitology Research* **101**, 843–852.
- Hendelberg, J. (1969) On the development of different types of spermatozoa from spermatids with two flagella in the Turbellaria with remarks on the ultrastructure of the flagella. *Zoologiska Bidrag från Uppsala* **38**, 1–50.
- Iomini, C. & Justine, J.-L. (1997) Spermiogenesis and spermatozoon of *Echinostoma caproni* (Platyhelminthes, Digeneta): transmission and scanning electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. *Tissue Cell* **29**, 107–118.
- Jones, A. & Blair, D. (2005) Family Mesometridae Poche, 1926. pp. 213–219 in Jones, A., Bray, R.A. & Gibson, D.I. (Eds) *Keys to the Trematoda*. Wallingford, CABI Publishing.
- Justine, J.-L. (1991) Phylogeny of parasitic Platyhelminthes: a critical study of synapomorphies proposed on the basis of the ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa. *Canadian Journal of Zoology* **69**, 1421–1440.

- 453 Justine, J.-L. (1995) Spermatozoal ultrastructure and 511
454 phylogeny of the parasitic Platyhelminthes. *Mémoires 512*
455 du Muséum National d'Histoire Naturelle
- 456 166, 55–86. 513
- 457 Justine, J.-L. (1998) Systématique des grands groupes de 514
458 plathelminthes parasites: quoi de neuf? *Bulletin de la 515*
459 Société Française de Parasitologie
- 460 16, 34–52. 516
- 461 Justine, J.-L. (2001) Spermatozoa as phylogenetic 517
462 characters for the Platyhelminthes. pp. 231–238 in Little- 518
463 wood, D.T.J. & Bray, R.A. (Eds) *Interrelationships of the 519*
464 Platyhelminthes. London, Taylor and Francis. 520
- 465 Justine, J.-L. (2003) Ultrastructure des spermatozoïdes et 521
466 phylogénie des Neodermata. pp. 359–380 in Combes, 522
467 C. & Jourdane, J. (Eds) *Taxonomie, écologie et évolution 523*
468 des métazoaires parasites. Perpignan, PUP. 524
- 469 Justine, J.-L. & Mattei, X. (1982) Réinvestigation de 525
470 l'ultrastructure du spermatozoïde d'*Haematoloechus* 526
471 (Trematoda: Haematoloechidae). *Journal of Ultrastruc- 527*
472 ture Research
- 473 81, 322–332. 528
- 474 Levron, C., Ternengo, S. & Marchand, B. (2003) 529
475 Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon 530
476 of *Helicometra fasciata* (Digenea, Opecoelidae), a 531
477 parasite of *Labrus merula* (Pisces, Teleostei). *Acta 532*
478 Parasitologica
- 479 48, 255–264. 533
- 480 Levron, C., Ternengo, S. & Marchand, B. (2004) 534
481 Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon 535
482 of *Monorchis parvus* Looss, 1902 (Digenea, 536
483 Monorchidae), a parasite of *Diplodus annularis* (Pisces, 537
484 Teleostei). *Parasitology Research*
- 485 93, 102–110. 538
- 486 Levron, C., Miquel, J., Oros, M. & Scholz, T. (2010) 539
487 Spermatozoa of tapeworms (Platyhelminthes, Euces- 540
488 toda): advances in ultrastructural and phylogenetic 541
489 studies. *Biological Reviews*
- 490 85, 523–543. 542
- 491 Miquel, J., Fournier-Chambrillon, C., Fournier, P. & 543
492 Torres, J. (2006) Spermiogenesis and spermatozoon 544
493 ultrastructure of the cranial digenetic *Troglotrema 545*
494 acutum (Leuckart, 1842). *Journal of Parasitology*
- 495 92, 441–453. 546
- 496 Ndiaye, P.I., Miquel, J., Fons, R. & Marchand, B. (2003) 547
497 Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the liver 548
498 fluke *Fasciola hepatica* L., 1758 (Digenea, Fasciolidae): 549
499 scanning and transmission electron microscopy, and 550
500 tubulin immunocytochemistry. *Acta Parasitologica*
- 501 48, 182–194. 551
- 502 Ndiaye, P.I., Miquel, J., Bâ, C.T. & Marchand, B. (2004) 552
503 Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon 553
504 of the liver fluke *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856 554
505 (Digenea, Fasciolidae), a parasite of cattle in Senegal. 555
506 *Journal of Parasitology*
- 507 90, 30–40. 556
- 508 Ndiaye, P.I., Quilichini, Y., Sène, A., Bâ, C.T. & 557
509 Marchand, B. (2011) Ultrastructure of the spermatozoon 558
510 of the digenetic *Cricoccephalus albus* (Kuhl & van 559
511 Hasselt, 1822) Looss, 1899 (Platyhelminthes, Pronocephaloidea, 560
512 Pronocephalidae), parasite of 'the hawksbill sea turtle' *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) 561
513 in Senegal. *Zoologischer Anzeiger*
- 514 250, 215–222. 562
- 515 Pérez-del Olmo, A., Gibson, D.I., Fernández, M., 563
516 Sanisidro, O., Raga, J.A. & Kostadinova, A. (2006) 564
517 Descriptions of *Wardula bartolii* n. sp. (Digenea: 565
518 Mesometridae) and three newly recorded accidental 566
519 parasites of *Boops boops* L. (Sparidae) in the NE 567
520 Atlantic. *Systematic Parasitology*
- 521 63, 99–109. 568
- 522 Quilichini, Y., Foata, J. & Marchand, B. (2007a) 523
523 Ultrastructural study of the spermatozoon of *Nicolla 524*
524 testibliquum (Digenea, Opecoelidae) parasite of brown 525
525 trout *Salmo trutta* (Pisces, Teleostei). *Parasitology 526*
526 Research
- 527 101, 1295–1301. 527
- 528 Quilichini, Y., Foata, J. & Marchand, B. (2007b) 528
529 Ultrastructural study of the spermatozoon of *Pronto- 529*
530 *prymna ventricosa* (Digenea, Baccigerinae), parasite of 530
531 the twaite shad *Alosa fallax* Lacepede (Pisces, 531
532 Teleostei). *Parasitology Research*
- 533 101, 1125–1130. 533
- 534 Quilichini, Y., Foata, J., Orsini, A. & Marchand, B. 534
535 (2007c) Spermiogenesis and spermatozoon ultrastruc- 535
- 536 ture of *Nicolla wisniewskii* (Digenea: Opecoelidae), an 536
537 intestinal parasite of brown trout *Salmo trutta* (Pisces: 537
538 Teleostei). *Journal of Parasitology*
- 539 93, 469–478. 539
- 540 Quilichini, Y., Foata, J., Justine, J.-L., Bray, R.A. & 540
541 Marchand, B. (2010a) Spermatozoon ultrastructure of 541
542 *Aponurus laguncula* (Digenea: Lecithasteridae), a 542
543 parasite of *Aluterus monoceros* (Pisces, Teleostei). 543
544 *Parasitology International*
- 545 59, 22–28. 545
- 546 Quilichini, Y., Foata, J., Justine, J.-L., Bray, R.A. & 546
547 Marchand, B. (2010b) Ultrastructural study of the 547
548 spermatozoon of *Heterolebias maculosus* (Digenea, 548
549 Opistholebetidae), a parasite of the porcupinefish 549
550 *Diodon hystrix* (Pisces, Teleostei). *Parasitology Inter- 550*
551 *national*
- 552 59, 427–434. 552
- 553 Quilichini, Y., Foata, J., Justine, J.-L., Bray, R.A. & 553
554 Marchand, B. (2011) Spermatozoon ultrastructure of 554
555 *Gyliauchen* sp. (Digenea: Gyliauchenidae), an intestinal 555
556 parasite of *Siganus fuscescens* (Pisces: Teleostei). 556
557 *Biological Bulletin*
- 558 221, 197–205. 558
- 559 Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as 559
560 an electron-opaque stain in electron microscopy. 560
561 *Journal of Cell Biology*
- 562 17, 208–212. 562
- 563 Seck, M.T., Marchand, B. & Bâ, C.T. (2007) Ultrastructure 563
564 of spermiogenesis and the spermatozoon of *Para- 564*
565 *mphistomum microbothrium* (Fischeder 1901; Digenea, 565
566 Paramphistomidae), a parasite of *Bos taurus* in Senegal. 566
567 *Parasitology Research*
- 568 101, 259–268. 568
- 569 Seck, M.T., Marchand, B. & Bâ, C.T. (2008a) Spermiogen- 569
570 esis and sperm ultrastructure of *Cotylophoron coto- 570*
571 *phorum* (Trematoda, Digenea, Paramphistomidae), a 571
572 parasite of *Bos taurus* in Senegal. *Parasitology Research* 572
573 103, 157–166. 573
- 574 Seck, M.T., Marchand, B. & Bâ, C.T. (2008b) Spermiogen- 574
575 esis and sperm ultrastructure of *Carmylerius endopapillatus* 575
576 (Digenea, Gastrothylacidae), a parasite of *Bos taurus* in 576
577 Senegal. *Acta Parasitologica*
- 578 53, 9–18. 578
- 579 Świderski, Z. (1986) Three types of spermiogenesis 579
580 in cestodes. pp. 2959–2960 *Proceedings of the XIth 580*
581 International Congress of Electron Microscopy. Kyoto, 581
582 Japan. 582
- 583 Thiéry, J.P. (1967) Mise en évidence des polysaccharides 583
584 sur coupes fines en microscopie électronique. *Journal of 584*
585 Microscopy
- 586 6, 987–1018. 586

III-4 Ultrastructure du spermatozoïde de *Euryhelmis squamula* (Rudolphi, 1819) (Digenea : Opisthorchioidea : Heterophyidae), parasite intestinal de *Mustela vison* (Carnivora : Mustelidae)

Résumé

Cette étude représente la première description de l'organisation ultrastructurale du spermatozoïde de *Euryhelmis squamula* par le biais de la microscopie électronique à transmission. Les spécimens adultes de *E. squamula* ont été isolés de l'intestin du vison américain (*Mustela vison*) capturé en France.

Le spermatozoïde mûr de *E. squamula* est filiforme et effilé dans ces deux extrémités. Il est caractérisé par la présence de deux axonèmes de longueur distincte et du type 9+1' des Trepaxonemata, deux rangées de microtubules corticaux parallèles, trois mitochondries, un noyau et des granules de glycogène. Ces caractères ultrastructuraux sont comparés avec ceux décrits chez d'autres Digènes Opisthorchioidés étudiés jusqu'à nos jours, avant de discuter sur leur future intérêt. La présence d'un des axonèmes au niveau des deux extrémités, la présence des ornements externes de la membrane plasmique, et la présence de plus d'une mitochondrie sont des aspects qui caractérisent le spermatozoïde des Digènes Opisthorchioidés.

Concernant les Cryptogonimidae, la présence de corps épineux et d'un axonème incomplet dans l'extrémité antérieure peuvent être des aspects discriminants entre cette famille et les autres familles d'Opisthorchioidés.

Mots clés :

Euryhelmis squamula, Heterophyidae, Opisthorchioidea, Digenea, Spermatozoïde, Ultrastructure

Artículo Original

Spermatozoon ultrastructure of *Euryhelmis squamula* (Rudolphi, 1819) (Digenea, Opisthorchiodea, Heterophyidae), an intestinal parasite of *Mustela vison* (Carnivora, Mustelidae)

ABDOU LAYE JACQUE SACODOU BAKHOU¹, CHEIKH TIDIANE BA², CHRISTINE FOURNIER-CHAMBRILLON³, JORDI TORRES¹, PASCAL FOURNIER¹ and JORDI MIQUEL¹

¹ Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n, E-08028 Barcelona, Spain.

² Laboratoire de Parasitologie-Helminthologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, B.P. 5005, Dakar, Sénégal.

³ GREGE, Route de Préchac, F-33730 Villandraut, France.

ABSTRACT

This study presents the first data on the ultrastructural characters of the mature spermatozoon of *Euryhelmis squamula* by means of transmission electron microscopy. Mature specimens of *E. squamula* were obtained from the intestinal duct of an American mink (*Mustela vison*) captured in France. The mature spermatozoon of *E. squamula* is filiform and tapered at both extremities. It is characterized by the presence of two axonemes of different lengths presenting the 9+1' trepaxonematan pattern, two bundles of parallel cortical microtubules, three mitochondria, nucleus and granules of glycogen. These ultrastructural characters are compared with other *Opisthorchiodea digeneans* studied until now and the interest of different spermatological features is discussed. The absence of one of the axonemes in both extremities, the presence of external ornamentation of the plasma membrane and the presence of more than one mitochondrion characterize the spermatozoon of *Opisthorchiodea digeneans*. Concerning the Cryptogonimidae, the presence of spine-like bodies and the presence of an incomplete axoneme in the anterior extremity may be discriminating characters between this family and other opisthorchiodeans.

Key words: Digenea, Opisthorchiodea, Heterophyidae, *Euryhelmis squamula*, spermatozoon, ultrastructure.

RESUMEN

En el presente estudio se describe por primera vez la organización ultraestructural del espermatozoide

Received: 27 March 2009, Accepted: 30 April 2009.

Corresponding: Jordi Miquel

Laboratori de Parasitologia Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries Facultat de Farmàcia Universitat de Barcelona. Av. Joan XXIII, s/n, E-08028 Barcelona, Spain.
E-mail: jordimiquel@ub.edu

de *Euryhelmis squamula* mediante microscopía electrónica de transmisión. Los ejemplares adultos de *E. squamula* se han aislado a nivel intestinal en un visón americano (*Mustela vison*) capturado en Francia. El espermatozoide de *E. squamula* es filiforme y aguzado en sus dos extremidades. Se caracteriza por la presencia de dos axonemas de distinta longitud que están desplazados uno respecto al otro. Estos axonemas se corresponden al tipo 9+1' característico de los Trepaxonemata. El espermatozoide, además se caracteriza por presentar dos haces de microtúbulos corticales paralelos, tres mitocondrias, núcleo y gránulos de glicógeno. Se comparan estos caracteres ultraestructurales con los presentes en otros digénidos Opisthorchioidea estudiados hasta la fecha y se discute el interés de los distintos caracteres espermatológicos. La ausencia de uno de los axonemas en ambos extremos, la presencia de ornamentación extramembranar y la presencia de más de una mitocondria son aspectos que caracterizan el espermatozoide de los Opisthorchioidea. En relación a los Cryptogonimidae, la presencia de cuerpos espinosos y de un axonema incompleto en la extremidad anterior pueden ser aspectos discriminantes entre especies de esta familia y otros Opisthoichoidea.

Palabras clave: Digenea, Opisthorchioidea, Heterophyidae, *Euryhelmis squamula*, ultraestructura.

INTRODUCTION

In southwestern Europe *Euryhelmis squamula* (Rudolphi, 1819) (Heterophyidae) is a rather common intestinal digenetic of riparian mustelids, which feed on amphibians harbouring their metacercaria (Torres *et al.*, 1996, 2003, 2008). The polecat (*Mustela putorius* L., 1758) contributes much more to the maintenance of the life cycle of *E. squamula* than the European mink, *Mustela lutreola* (L., 1761) or the American mink, *M. vison* Schereber, 1777 in areas where all these mustelids are sympatric.

In the last years there has been a significant consensus about the usefulness of spermatological characters for phylogenetic inference in the Platyhelminthes (Justine, 1991, 1995, 1998, 2001; Bâ and Marchand, 1995; Hoberg *et al.* 1997, 2001; Świderski and Mackiewicz, 2002). In particular, the variation of the spermatozoon ultrastructural characters allows for their use in phylogenetic analysis. With respect to spermiogenesis, several patterns have been described and its utility has been evidenced in several studies concerning Cestodes (reviewed in Justine, 1998). However, when referring to digenetics, most of the many studies on the ultrastructure of sperm features (see Levron *et al.*, 2004a, 2004b; Agostini *et al.*, 2005; Miquel *et al.*, 2006; Ternengo *et al.*, 2009 and Quilichini *et al.*, in press) are incomplete and present misinterpretations. In fact, the potential of such data for phylogenetic purposes is yet to be clarified. This is particularly

evident when considering the reduced variability found in digenetic spermiogenesis processes in contrast to the different patterns described for cestodes (Świderski, 1986; Bâ and Marchand, 1995; Świderski and Mackiewicz, 2002). Concerning the mature spermatozoon, a relatively large number of ultrastructural features can be useful for phylogenetic purposes. The most interesting characters are: (1) the extremities (anterior and posterior), (2) the cytoplasmic expansions, (3) the external ornamentation of the plasma membrane, (4) the spine-like bodies and (5) the number of mitochondria.

To date, available information on spermatozoon ultrastructure of the Opisthorchioidea digenetics refers to eight species: *Clonorchis sinensis*, *Metorchis orientalis* and *Aphalloides coelomicola* (Opisthorchiidae), *Neochasmus* sp., *Anisocoelium capitellatum* and *Siphoderina elongata* (Cryptogonimidae), *Cryptocotyle lingua* and *Metagonimus yokogawai* (Heterophyidae) (Rees, 1979; Jamieson and Daddow, 1982; Jeong and Rim, 1984; Liu and Pan, 1990; Ahn *et al.*, 1991; Justine, 1995; Ternengo *et al.*, 2009; Quilichini *et al.*, in press). However, for some of these species the available data refer only to scarce published TEM micrographs or contain numerous misinterpretations. The aim of the present study is to elucidate the ultrastructural organization of the mature spermatozoon of *E. squamula* thus providing the first data on the genus *Euryhelmis* while adding new data on the Heterophyidae family.

UTRUCTURE OF EURYHELMIS SQUAMULA A PARASITE OF MUSTELA VISON

MATERIALS AND METHODS

Adult specimens of *E. squamula* analyzed in the present study were obtained alive from the intestinal duct of a naturally infected free-ranging female American mink *Mustela vison* Schreber, 1777 captured in February of 2006 in Saint-Gor (Landes, France). A total of 35 specimens were obtained and processed for ultrastructural studies. Two of these digenleans were finally analyzed by transmission electron microscopy.

American minks were trapped as part of the control program of the Southwestern French feral population, one of the main actions included in the conservation action plan (Barrault et al, 2003) for the European mink *M. lutreola* (Linnaeus, 1761) in France.

The living digenleans were placed in a 0.9% NaCl solution. After dissection, different portions containing testes and seminal vesicle were routinely processed for TEM examination. Specimens were fixed in cold (4°C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2 for 1 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, postfixed in cold (4°C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, dehydrated in an ethanol series and propylene oxide, and finally embedded in Spurr's resin. Ultrathin sections were obtained using a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome, placed on copper grids and double-stained with uranyl acetate and lead citrate. Ultrathin sections were examined using a JEOL 1010 transmission electron microscope.

RESULTS

The ultrastructure of the mature spermatozoon of *E. squamula* is illustrated in Figures 1-19. The observation of several longitudinal and cross-sections by means of transmission electron microscopy has enabled to establish five (I-V) different regions in the mature spermatozoon (Fig. 19I-V). The mature sperm is a filiform cell, tapered at both extremities, containing two axonemes of different lengths of the 9+1' pattern of trepaxonemata Platylhelminthes, two bundles of parallel cortical microtubules, three mitochondria, the nucleus and granules of glycogen.

Region I (Figures 1-3, 19I) corresponds to the anterior extremity of the spermatozoon. The anterior tip exhibits a single axoneme (Figure 1) whereas the submembranous layer of cortical microtubules (Figures 1-3, 19I) and the second axoneme appear soon after the first axoneme (Figures 2, 3, 19I). In this area, where both axonemes are present, the cortical microtubules describe a continuous submembranous layer lacking attachment zones (Figures 2, 3, 19I).

Region II (Figs. 3-8, 18, 19II) is the mitochondrial area of sperm and is characterized by the presence of two axonemes, three mitochondria, two bundles of cortical microtubules, external ornamentation of the plasma membrane, attachment zones and granules of glycogen. The cortical microtubules describe two parallel bundles localized in the dorsal and ventral face of the spermatozoon (Figures 6, 7, 19II). The anterior area of this Region presents two mitochondria of different lengths, which coincide with the external ornamentation of the plasma membrane (Figures 3-5, 19II). The middle area of Region II lacks mitochondria and is characterized by the presence of all the remaining features (Figures 6, 7, 19II). Finally, the third mitochondrion appears in the posterior area of this Region (Figures 8, 19II), extending down to the nuclear region. It is noticeable the absence of external ornamentation of the plasma membrane at this level. Also, a large amount of granules of glycogen are irregularly distributed along this Region (Figures 5, 6, 8, 19II).

Region III (Figures 9-12, 19III) is characterized by the simultaneous presence of the third mitochondrion and the nucleus. In the posterior area of Region III the disorganization of the first axoneme occurs (Figures 10, 19III). First the central core disappears and later the peripheral doublets loose their arms and become disorganized before its transformation into singlets. The two bundles of cortical microtubules and a large amount of glycogen granules are also present in this Region (Figures 9-12, 19III).

Region IV (Figures 13, 14, 19IV) is characterized by the presence of only an axoneme and the nucleus. Granules of glycogen are also observed in this Region (Figures 13, 14, 19IV). In the posterior area of this Region the cortical microtubules stop their parallel course along

Table 1. Some ultrastructural characters of the spermatozoon in Opisthorchiodea digeneans

| Families and species | Ase | Eo | Sb | M | Pse | References |
|----------------------------------|-----|----|----|---|-------|------------------------------|
| Cryptogonimidae | | | | | | |
| <i>Neochasmus sp.</i> | D* | + | - | 2 | D** | Jamieson and Daddow (1982) |
| <i>Siphoderina elongata</i> | D* | + | + | 2 | D*** | Quilichini et al. (in press) |
| <i>Anisocoelium capitellatum</i> | D* | + | + | 3 | 1Ax | Ternengo et al. (2009) |
| Heterophyidae | | | | | | |
| <i>Cryptocotyle lingua</i> | 1Ax | - | - | 1 | 1Ax | Rees (1979) |
| <i>Euryhelmis squamula</i> | 1Ax | + | - | 3 | 1Ax | Present study |
| Opisthorchiidae | | | | | | |
| <i>Aphalooides coelomicola</i> | | | + | | | Justine (1995) |
| <i>Metorchis orientalis</i> | 2Ax | | | | 1Ax-N | Liu and Pan (1990) |

Ase, anterior spermatozoon extremity; Ax, axoneme; D, doublets; Eo, external ornamentation of the plasma membrane; M, mitochondria; N, nucleus; Pse, posterior spermatozoon extremity; Sb, spine-like body. +/-, presence/absence of considered character. *Anterior extremities without complete axoneme before the appearance of the second axoneme. **Disorganization of the axoneme is observed in nuclear region. ***Complete axoneme after nuclear region is not observed.

the spermatozoon and the nucleus progressively decreases in section and disappears (Figures 14, 19IV).

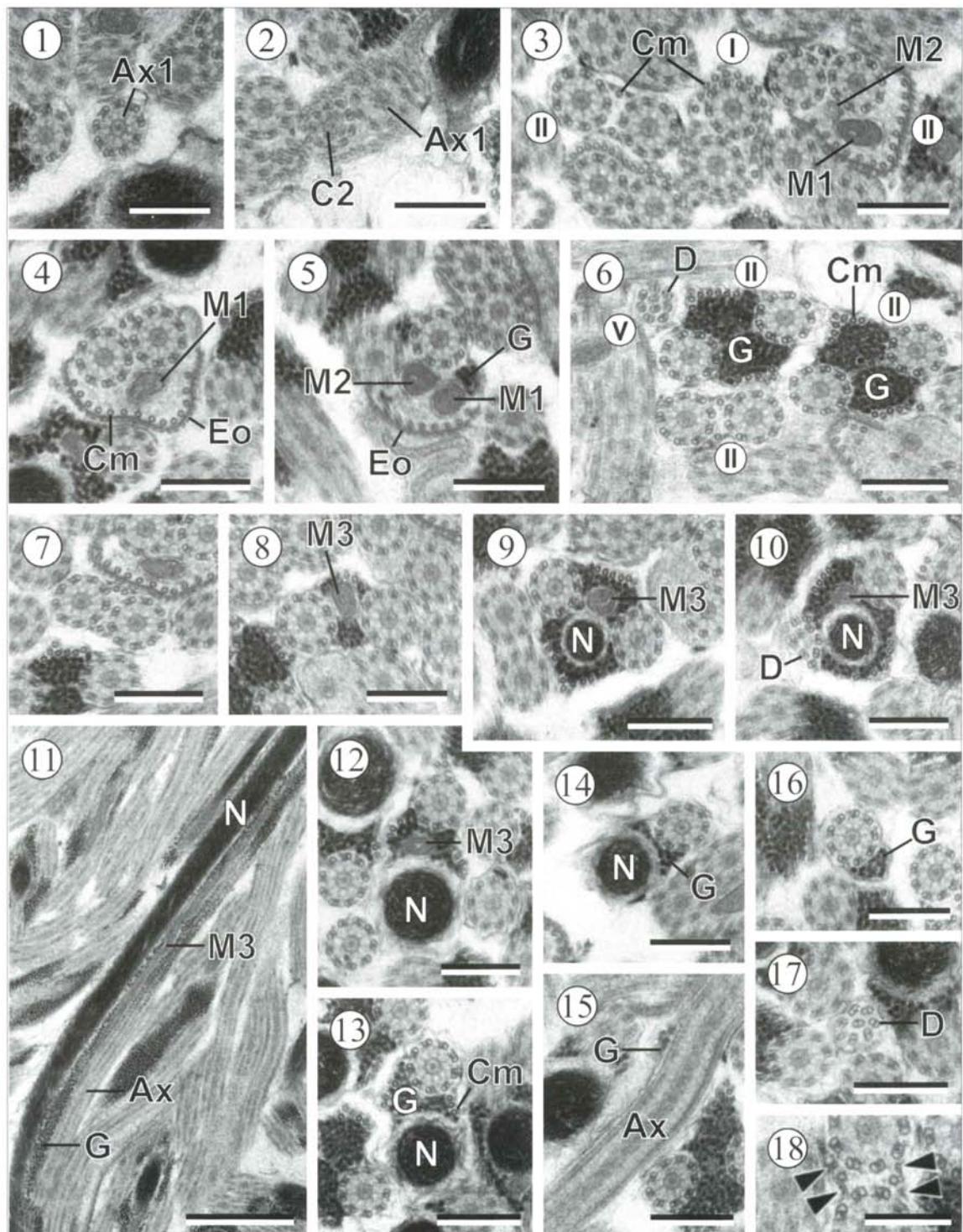
Region V (Figures 15-17, 19V) constitutes the posterior extremity of the male gamete and contains only one axoneme and some granules of glycogen (Figures 15, 16). This axoneme disorganizes toward the posterior tip of the mature spermatozoon (Figures 17, 19V).

DISCUSSION

The anterior tip of the mature spermatozoon in the Digenea presents a reduced morphological variability. The most frequent situation is the presence of a single axoneme as in the case of *E. squamula* and other digeneans. The other studied heterophyid (*Cryptocotyle lingua*) shows the same ultrastructural morphology of the anterior extremity (Rees, 1979). Concerning the remaining opisthorchioideans, a particular situation is described in the Cryptogonimidae species: *Neochasmus* sp., *Siphoderina elongata* and *Anisocoelium capitellatum* exhibit axonemal doublets in the anterior extremity of the male gamete (Jamieson and Daddow, 1982; Ternengo et al, 2009; Quilichini et al, in press). Finally, the opisthorchiid *Metorchis orientalis* presents

two axonemes in the anterior extremity of its spermatozoon (Liu and Pan, 1990). The anterior extremity of the spermatozoon in *E. squamula* is characterized by the lack of attachment zones. During spermiogenesis, the formation of this region probably takes place in a proximal area of the spermatid, where proximodistal fusion does not occur. This would explain the formation of a continuous submembranous layer of cortical microtubules around both axonemes.

There are different beliefs in what concerns the number of mitochondria present in the mature spermatozoon of Digenea. According to Burton (1972), during spermiogenesis, several mitochondria present in the differentiation zone penetrate into the spermatid body. They accompany the nucleus in its migration along the spermatid and later these multiple mitochondria fuse to form a long mitochondrion. In fact, most of the studies on the sperm of digeneans describe the presence of a single mitochondrion in the male gamete. However, in order to make a logical interpretation of the ultrastructural characters' position along the mature spermatozoon several authors described the presence of more than one mitochondrion. The mature sperm cell of *E. squamula* presents two mitochondria in its anterior area and another one in the posterior area that coincides partially with the nuclear

ULTRASTRUCTURE OF *EURYHELMIS SQUAMULA* A PARASITE OF *MUSTELA VISON*

Figures 1-18. Sperm ultrastructure of *Euryhelmis squamula*. **Figure 1.** Cross-section of Region I near the anterior spermatozoon extremity showing the first axoneme (Ax1). Bar = 0.3 mm. **Figure 2.** Cross-section of Region I showing the appearance of the second axoneme. Ax1, first axoneme; C2, centriole of the second axoneme. Bar = 0.3 mm. **Figure 3.** Cross-sections of Regions I and II. Note the absence of external ornamentation of the plasma membrane in the cross-

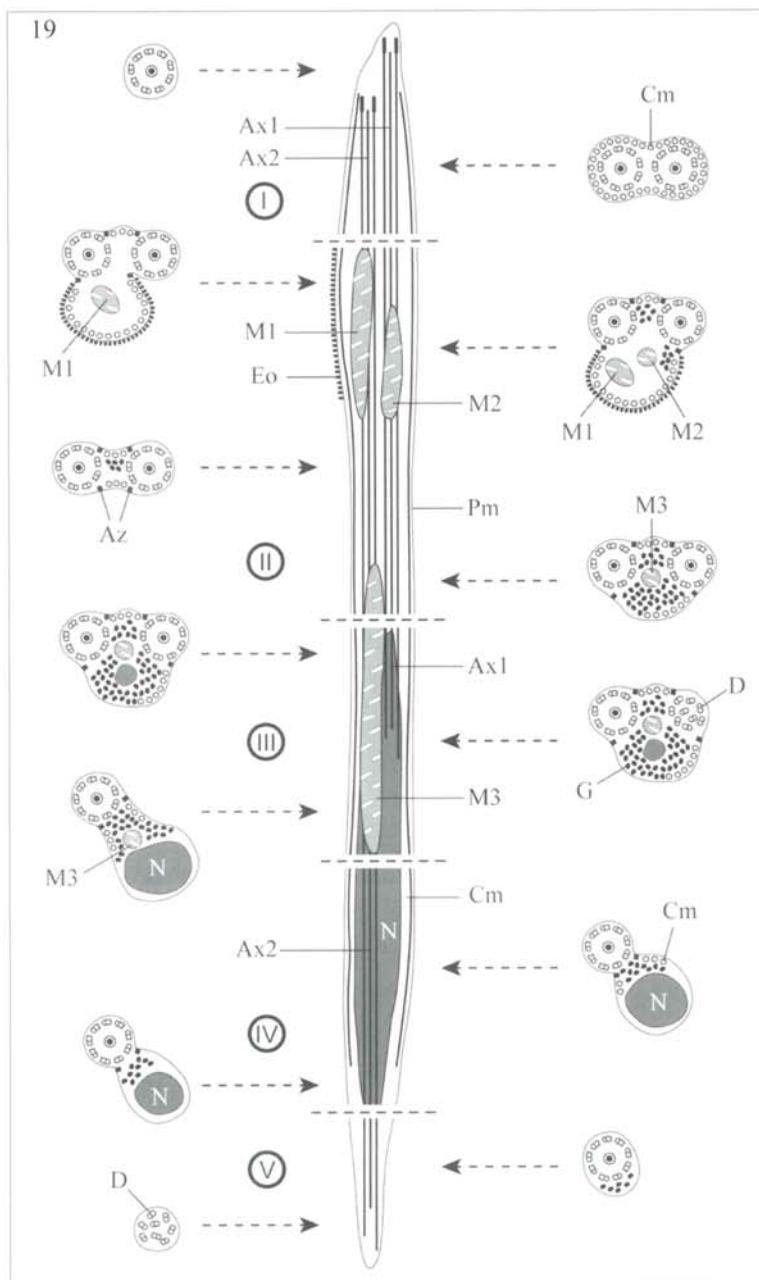


Figure 15. Longitudinal section of Region V. Ax2, second axoneme; G, glycogen. Bar = 0.3 mm. **Figure 16.** Cross-section of Region V showing the second axoneme and the scarce amount of glycogen (G). Bar = 0.3 mm. **Figure 17.** Cross-section of Region V near the posterior spermatozoon extremity showing the disorganization of the second axoneme. D, doublets. Bar = 0.3 mm. **Figure 18.** Detail of attachment zones (arrow heads). Bar = 0.2 mm. **Figure 19.** Schematic diagram showing the ultrastructural organization of the spermatozoon of *Euryhelmis squamula*. Ax1, first axoneme; Ax2, second axoneme; Az, attachment zone; Cm, cortical microtubules; D, doublets; Eo, external ornamentation of the plasma membrane; G, glycogen; M1, first mitochondrion; M2, second mitochondrion; M3, third mitochondrion; N, nucleus; Pm, plasma membrane.

section of the intermitochondrial area of Region II (left section of Region II). Cm, cortical microtubules; M1, first mitochondrion; M2, second mitochondrion. Bar = 0.3 mm.

Figures 4 and 5. Cross-sections of Region II showing the presence of external ornamentation of the plasma membrane (Eo) in its mitochondrial area. Cm, cortical microtubules; M1, first mitochondrion; M2, second mitochondrion. Bars = 0.3 mm.

Figure 6. Cross-sections of Region II and Region V. In the middle part of Region II we can observe areas with and without glycogen (G). The cross-section of Region V shows the disorganization of the second axoneme near the posterior spermatozoon extremity. Cm, cortical microtubules; D, doublets. Bar = 0.3 mm.

Figure 7. Cross-section of the middle area of Region II. Bar = 0.3 mm.

Figure 8. Cross-section of the posterior area of Region II showing the third mitochondrion (M3). Bar = 0.3 mm.

Figure 9. Cross-section of Region III showing the simultaneous presence of nucleus (N) and mitochondrion (M3). Bar = 0.3 mm.

Figure 10. Cross-section of Region III showing the disorganization of the first axoneme. D, doublets; M3, third mitochondrion; N, nucleus. Bar = 0.3 mm.

Figure 11. Longitudinal section of Region III. Ax, axoneme; G, glycogen; M3, third mitochondrion; N, nucleus. Bar = 1 mm.

Figure 12. Cross-section of Region III showing the presence of the second axoneme, nucleus (N) and mitochondrion (M3). Bar = 0.3 mm.

Figures 13 and 14. Cross-sections of Region IV showing the gradual reduction of glycogen granules (G) and nuclear section (N). Note the absence of cortical microtubules (Cm) in the posterior area of this Region. Bars = 0.3 mm.

ULTRASTRUCTURE OF EURYHELMIS SQUAMULA A PARASITE OF MUSTELA VISON

region. Three mitochondria are also described in two other digenleans, *Sandonia sudanensis* (Paramphistomidae) and *A. capitellatum* (Ashour et al, 2007 and Ternengo et al, 2009, respectively). However, the positioning of mitochondria along the sperm cell is different. *Euryhelmis squamula* as occurs in *A. capitellatum* (Ternengo et al., 2009) presents two anterior mitochondria and the third mitochondrion in the nuclear region, while *S. sudanensis* (Ashour et al, 2007) exhibits one anterior mitochondrion and two mitochondria in the nuclear region. The Opisthorchioidea digenleans *Neochasmus* sp. (Jamieson and Daddow, 1982) and *S. elongata* (Quilichini et al., in press) exhibit two mitochondria in their spermatozoa, while the remaining studied species present one mitochondrion (see Table 1). Two mitochondria are also present in other digenleans such as *Dicrocoelium hospes* (Dicrocoeliidae) (Agostini et al, 2005), *Postorchigenes gymnesicus* (Lecithodendriidae) (Gracenea et al, 1997), *Maritrema lingua* (Microphallidae) (Hendow and James, 1988), *Monorchis parvus* (Monorchiidae) (Levron et al., 2004c), *Notocotylus neyrai* (Notocotylidae) (Ndiaye et al, 2003a), *Poracanthium furcatum* (Opecoelidae) (Levron et al, 2004a) and *Troglotrema acutum* (Miquel et al, 2006). Considering that it is very difficult to observe longitudinal sections showing the transition between mitochondria, it is only possible to infer about the number of mitochondria after observing a very large number of transverse sections.

Numerous flukes present an external ornamentation in the plasma membrane of their spermatozoa. This is also the case of *E. squamula* and most of opisthorchioideans (see Table 1). However this external ornamentation is not evidenced in the spermatozoon of *C. lingua* (Rees, 1979). These ornamentations are normally present in the anterior areas of the spermatozoon and usually they do not cover all the perimeter of the cell. Ornamentations of the membrane have never been observed in the median cytoplasmic process during spermiogenesis and, consequently, their appearance probably occurs in the final stages of spermiogenesis after fusion of the flagella. Nevertheless, Justine and Mattei (1982) describe the presence of external ornamentation coinciding with cortical microtubules in the zone of

differentiation of *Haematoloechus* sp. According to these authors, the zone of differentiation is preserved in the mature sperm cell. Therefore, in the spermatozoon of digenleans two different regions with external ornamentation have been described: (1) anterior areas, probably originated from the zone of differentiation, where cortical microtubules surround totally the sperm cell body and (2) a more posterior area, originated after the fusion of flagella, in which attachment zones are observed. In *Haematoloechus* sp. these two regions with external ornamentation of the plasma membrane were observed (Justine and Mattei, 1982). Concerning opisthorchioideans, a discontinuity in the external ornamentation was also described in *Neochasmus* sp. (Jamieson and Daddow 1982). This ornamentation is present in the anterior area of the spermatozoon surrounding the doublets of the second axoneme and the second axoneme, and also in the ventral face of the sperm cell at the level of the first mitochondrial area. As occurs in most digenleans and in the remaining opisthorchioideans, in *E. squamula* the external ornamentation is restricted to the mitochondrial area of the male gamete, thus originating after the proximodistal fusion of the flagella (with four attachment zones). In the future, the presence/absence and the variability of the external ornamentation positioning on the plasma membrane may be applicable to phylogenetic analysis in this group of Platyhelminthes.

The spine-like bodies reported for the first time by Miquel et al (2000) in the spermatozoon of *Opecoeloides furcatus* (Opecoelidae) were described as submembranous and electron-dense structures containing a spherical vesicle. In opisthorchioideans, spine-like bodies are described in the spermatozoon of two out of the three studied species of the Cryptogonimidae family: *A. capitellatum* (Ternengo et al, 2009) and *S. elongata* (Quilichini et al, in press). Other digenleans showing these structures in their spermatozoa are *D. hospes* (Agostini et al, 2005), *F. hepatica* and *F. gigantica* (Ndiaye et al, 2003b, 2004), *Notocotylus neyrai* (Ndiaye et al, 2003a), *P. furcatum* (Levron et al, 2004a) and *T. acutum* (Miquel et al, 2006). In all digenleans presenting spine-like bodies, such structures are always present in the anterior areas of the spermatozoon and associated with the external ornamentation of the plasma membrane,

usually in the mitochondrial region of the gamete. This character will probably be of great interest in the future with respect to the elucidation of relationships between digenleans at the family level.

Similarly to the anterior extremity of spermatozoa, posterior tips are morphologically variable within Digenea in general (see Agostini et al, 2005), particularly among the Opisthorchioidea (see Table 1). As in *E. squamula*, digenleans usually present one axoneme in the spermatozoon's posterior tip. However, among opisthorchioideans there are different cases concerning the posterior organization of sperm. In the case of *A. capitellatum* and *S. elongata*, authors observed the presence of axonemal doublets (Ternengo et al, 2009; Quilichini et al, in press). With respect to *M. orientalis*, Liu and Pan (1990) described a posterior spermatozoon extremity with the presence of both nucleus and axoneme. The remaining opisthorchioideans show a single axoneme that later disorganizes (see Table 1).

The ultrastructural organization of the male gamete of *E. squamula* is quite similar to that described in most digenleans studied until now. Concerning the Opisthorchioidea, it seems that the spermatozoon is characterized by the following features: 1) the absence of one of the axonemes in both anterior and posterior extremities, 2) the presence of external ornamentation of the plasma membrane and 3) the presence of more than one mitochondrion. As regards the Cryptogonimidae, the presence of spine-like bodies and the presence of an incomplete axoneme constituted by several doublets in the anterior extremity characterize the sperm cell of species belonging to this family.

REFERENCES

- AGOSTINI S, MIQUEL J, NDIAYE PI, MARCHAND B. 2005. *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 (Digenea, Dicrocoeliidae): spermiogenesis, mature spermatozoon and ultrastructural comparative study. Parasitol Res 96: 38-48.
- AHN H, RIM HJ, KIM SJ. 1991. Antigenic localities in the tissues of *Metagonimus yokogawai* observed by immunogoldlabeling method. Korean J Parasitol 29: 245-57.
- ASHOUR AA, GARO K, GAMIL IS. 2007. Spermiogenesis in two paramphistomes from Nile fish in Egypt: an ultrastructural study. J Helminthol 81: 219-26.
- BÂ CT, MARCHAND B. 1995. Spermiogenesis, spermatozoa and phyletic affinities in the Cestoda. Mém Mus natn Hist Nat, Paris, 166: 87-95.
- BARRAULT P, ARLOT P, CRABOS F, DUCOURNAU Y, GIRARD A, JOUBERT L, LABORDE JP, MOZZI R, LALANNE JJ, SABATHÉ F, TRICHET S, FOURNIER P. 2003. The control of the feral American mink (*Mustela vison*) population of South-western France: methodology and preliminary results. Proc Int Conf Conserv European Mink 34-5.
- BURTON PR. 1972. Fine structure of the reproductive system of a frog lung-fluke. III The spermatozoon and its differentiation. J Parasitol 58: 68-83.
- GRACENEAM, FERRERJR, GONZÁLEZ-MORENO O, TRULLOLS M. 1997. Ultrastructural study of spermatogenesis and spermatozoon in *Postorchigenes gymnesicus* (Trematoda, Lecithodendriidae). J Morphol 234: 223-32.
- HENDOW HT, JAMES BL. 1988. Ultrastructure of spermatozoon and spermatogenesis in *Maritrema linguailla* (Digenea: Microphallidae). Int J Parasitol, 18, 53-63.
- HOBERG E P, MARIAUX J, BROOKS DR. 2001. Phylogeny among orders of the Eucestoda (Cercoconomorphae): Integrating morphology, molecules and total evidence. In Littlewood, D.T.J. and Bray, R.A. (eds). Interrelationships of the Platyhelminthes, pp. 112-126, Taylor and Francis, London.
- HOBERG EP, MARIAUX J, JUSTINE JL, BROOKS DR, WEEKES PJ. 1997. Phylogeny of the orders of the Eucestoda (Cercoconomorphae) based on comparative morphology: historical perspectives and a new working hypothesis. J Parasitol, 83: 1128-47.
- JAMIESON BGM, DADDOW LM. 1982. The ultrastructure of the spermatozoon of *Neochasmus* sp. (Cryptogonimidae, Digenea, Trematoda) and its phylogenetic significance. Int J Parasitol 12: 547-59.
- JUSTINE JL. 1991. Phylogeny of parasitic platyhelminthes: a critical study of synapomorphies proposed on the basis of the ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa. Can J Zool 69: 1421-40.
- JUSTINE JL. 1995. Spermatozoal ultrastructure and phylogeny of the parasitic Platyhelminthes. Mém Mus natl Hist Nat, Paris 166: 55-86.
- JUSTINE JL. 1998. Spermatozoa as phylogenetic characters for the Eucestoda. J Parasitol 84: 385-408.
- JUSTINE JL. 2001. Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes. In Littlewood, D.T.J. and Bray, R.A. (eds). Interrelationships of the Platyhelminthes, pp. 231-238, Taylor and Francis, London.
- JUSTINE JL, MATTEI X. 1982. Réinvestigation de l'ultrastructure du spermatozoïde d'*Haematoloechus* (Trematoda: Haematoloechidae). J Ultrastruc Res 81: 322-32.
- LEVRON C, TERNENGO S, MARCHAND B. 2004a. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Poracanthium furcatum* (Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mullus surmuletus* (Pisces, Teleostei). Acta Parasitol 49: 190-200.
- LEVRON C, TERNENGO S, MARCHAND B.

ULTRASTRUCTURE OF EURYHELMIS SQUAMULA A PARASITE OF MUSTELA VISON

- 2004b. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Diphterostomum brusinae* (Digenea, Zoogonidae), a parasite of *Diplodus annularis* (Pisces, Teleostei). Parasitol Res 94: 147-54.
19. LEVRON C, TERNENGO S, MARCHAND B. 2004c. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Monorchis parvus* Looss, 1902 (Digenea, Monorchiidae), a parasite of *Diplodus annularis* (Pisces, Teleostei). Parasitol Res, 93: 102-10.
20. LIU Y, PAN Y. 1990. Electron microscope studies of *Metorchis orientalis*. The spermatozoon and spermiogenesis. J Shanghai Agric College 8: 1.
21. MIQUEL J, FOURNIER-CHAMBRILLON C, FOURNIER P, TORRES J. 2006. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the cranial digenetic *Troglotrema acutum* (Leuckart, 1842). J Parasitol 92: 441-53.
22. MIQUEL J, NOURRISSON C, MARCHAND B. 2000. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Opecoeloides furcatus* (Trematoda, Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mullus barbatus* (Pisces, Teleostei). Parasitol Res 86: 301-10.
23. NDIAYE PI, MIQUEL J, BÂ CT, MARCHAND B. 2004. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of the liver fluke *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856 (Digenea, Fasciolidae), a parasite of cattle in Senegal. J Parasitol 90: 30-40.
24. NDIAYE PI, MIQUEL J, FELIU C, ARCHAND B. 2003a. Ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa of *Notocotylus neyrai* González Castro, 1945 (Digenea, Notocotylidae), intestinal parasite of *Microtus agrestis* (Rodentia: Arvicolidae) in Spain. Invert Reprod Dev 43: 105-15.
25. NDIAYE PI, MIQUEL J, FONS R, MARCHAND B. 2003b. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the liver fluke *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Digenea, Fasciolidae): Transmission and scanning electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. Acta Parasitol 48: 182-94.
26. QUILICHINI Y, FOATA J, JUSTINE JL, BRAY RA, MARCHAND B. 2009. Sperm ultrastructure of the digenetic *Siphoderina elongata* (Platyhelminthes, Cryptogenimidae) intestinal parasite of *Nemipterus furcosus* (Pisces, Teleostei). Parasitol Res, in press.
27. REES FG. 1979. The ultrastructure of the spermatozoon and spermiogenesis in *Cryptocotyle lingua* (Digenea: Heterophyidae). Int J Parasitol 9: 405-19.
28. ŚWIDERSKI Z. 1986. Three types of spermiogenesis in cestodes. Proc XIth Int Congr Electron Microsc, Kyoto, Japan, 2959-60.
29. ŚWIDERSKI Z, MACKIEWICZ JS. 2002. Ultrastructure of spermatogenesis and spermatozoa of the caryophyllidean cestode *Gliridacris catostomi* Cooper, 1920. Acta Parasitol 47: 83-104.
30. TERNENGO S, QUILICHINI Y, KATHARIOS P, MARCHAND B. 2009. Sperm ultrastructure of the gall bladder fluke *Anisocoelium capitellatum* (Digenea: Cryptogenimidae), a parasite of *Uranoscopus scaber* (Pisces: Uranoscopidae). Parasitol Res 104: 801-7.
31. TORRES J, FELIU C, MIQUEL J, CASANOVA JC, GARCÍA-PEREAR, GISBERT J. 1996. Helmintoфауна de *Mustela putorius* Linnaeus, 1758 (Carnivora: Mustelidae) en la península Ibérica. Boll Soc Hist Nat Balears 39: 155-65.
32. TORRES J, MAÑAS S, PALAZÓN S, CEÑA JC, MIQUEL J, FELIU C. 2003. Helminth parasites of *Mustela lutreola* (Linnaeus, 1761) and *M. vison* Schreber, 1777 in Spain. Acta Parasitol 48: 55-9.
33. TORRES J, MIQUEL J, FOURNIER P, FOURNIER-CHAMBRILLON C, LIBERGE M, FONS R, FELIU C. 2008. Helminth communities of the autochthonous mustelids *Mustela lutreola* and *M. putorius* and the introduced *Mustela vison* in Southwestern France. J Helminthol 82: 349-55.

Acknowledgements: Authors wish to thank the "Serveis Científics i Tècnics" of the University of Barcelona for their support in the preparation of samples. This study was partially supported by the Spanish project 2005-SGR-00576 from the "DURSI, Generalitat de Catalunya" and the "Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID)" of the "Ministerio de Asuntos Exteriores" of Spain.

III-5 Spermiogenèse et spermatozoïde de *Mediogonimus jordanei* (Microphalloidea : Prosthognomidae), parasite de *Myodes glareolus* (Rodentia : Cricetidae)

Résumé

Les caractères spermatologiques de *Mediogonimus jordanei* sont étudiés à l'aide des microscopes électroniques à transmission (MET) et à balayage (MEB).

La spermiogenèse débute par la formation d'une zone de différenciation contenant les deux centrioles, associés chacun à une racine striée et séparés par un corps intercentriolaire exhibant sept bandes opaques aux électrons. Les deux centrioles donnent naissance à deux flagelles libres, qui croissent en directions opposées avant d'effectuer une rotation de 90° et fusionner avec l'expansion cytoplasmique médiane. Avant cette fusion des flagelles, aussi bien la migration nucléaire que celle mitochondriale prennent place au niveau de l'expansion cytoplasmique médiane. Finalement, la constriction de l'anneau de membranes arquées donne naissance au jeune spermatozoïde.

Le spermatozoïde mûr de *M. jordanei*, qui mesure environ 260 µm, présente deux axonèmes de longueur différente de type 9+‘1’ caractéristique des Trepaxonemata, deux rangées de microtubules corticaux parallèles, une mitochondrie, un noyau et des granules de glycogène. À part l'apport de nouvelles données concernant la famille Prosthognomidae, la présente étude compare également l'organisation spermatologique de *M. jordanei* à celle d'autres espèces, en particulier celles appartenant aux Microphalloidea. Ainsi, une analyse globale de l'ensemble des espèces de Microphalloidea étudiées à ce jour, nous a permis de différencier certains caractères observés chez *Maritrema linguilla* et *Ganeo tigrinum* de ceux du reste des espèces décrites.

Mots clés :

Mediogonimus jordanei, Prosthognomidae, Microphalloidea, Digenea, Spermiogenèse, Spermatozoïde, Ultrastructure, MET, MEB

Spermiogenesis and spermatozoon of the liver fluke *Mediogonimus jourdanei* (Microphalloidea: Prosthogonimidae), a parasite of *Myodes glareolus* (Rodentia: Cricetidae)

Abdoulaye J.S. Bakhoum^{1,2}, Carlos Feliu^{1,2}, Cheikh Tidiane Bâ³ and Jordi Miquel^{1,2}

¹Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n, E-08028 Barcelona, Spain;

²Institut de Recerca de la Biodiversitat, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 645, E-08028 Barcelona, Spain;

³Laboratoire de Parasitologie-Helminthologie, Département de Biologie animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, B.P. 5005, Dakar, Senegal

Abstract: Spermatological characters of the liver fluke *Mediogonimus jourdanei* Mas-Coma et Rocamora, 1978 were studied by means of transmission and scanning electron microscopy. Spermiogenesis begins with the formation of the differentiation zone containing two centrioles associated with striated rootlets and an intercentriolar body. These two centrioles originate two free flagella that undergo a 90° rotation before fusing with the median cytoplasmic process. Both nuclear and mitochondrial migrations toward the median cytoplasmic process occur before the proximodistal fusion of flagella. Finally, the constriction of the ring of arched membranes gives rise to the young spermatozoon. The mature sperm of *M. jourdanei* measures about 260 µm and presents two axonemes of different lengths with the typical pattern of the Trepaxonemata, two bundles of parallel cortical microtubules, one mitochondrion, a nucleus and granules of glycogen. An analysis of all the microphalloidean species studied to date emphasised some differences in certain characters found in *Maritrema linguilla* Jägerskiöld, 1908 and *Ganeo tigrinum* Mehra et Negi, 1928 in comparison to those in the remaining microphalloideans. The presence and variability of such ultrastructural characters according to family, superfamily or order have led several authors to propose their use in the analysis of trematode relationships and phylogeny. Therefore, apart from producing new data on the family Prosthogonimidae, the present study also compares the spermatological organization of *M. jourdanei* with other available ultrastructural studies focusing on the Microphalloidea.

Keywords: *Mediogonimus jourdanei*, Prosthogonimidae, Microphalloidea, Digenea, ultrastructure, SEM, TEM, spermiogenesis, spermatozoon

The genus *Mediogonimus* Woodhead et Malewitz, 1936 includes liver parasites of arvicoline and murine rodents from North America and Europe (see Jones 2008). To date, this genus includes only two species, namely *Mediogonimus ovilacus* Woodhead et Malewitz, 1936 and *Mediogonimus jourdanei* Mas-Coma et Rocamora, 1978. The genus *Mediogonimus* was initially placed in the subfamily Prosthogoniminae Lühe, 1909 in the family Prosthogonimidae Lühe, 1909. Later, other authors included this subfamily in the family Plagiorchiidae Lühe, 1901 or Lepodermatidae Odhner, 1910 (now synonymized with Plagiorchiidae). The classification and taxonomic status of Prosthogonimidae have varied considerably according to authors. The Prosthogonimidae have been considered a family closely related to the Cephalogonimidae Looss, 1899, both families included in the superfamily Plagiorchioidea Lühe, 1901, due to morphoanatomical aspects

(see Jones 2008). Brooks et al. (1989), who accept the latter family status, propose placing it in the superfamily Microphalloidea Ward, 1901, although it is unclear how they reached this conclusion based on their morphological phylogenetic analysis (see Cribb et al. 2001). Recently, the relationship between cephalogonimids and prosthogonimids was not corroborated by molecular analysis (Olson et al. 2003). According to the latter authors, they represent different clades and prosthogonimids are the sister group of the microphalloidean family Pleurogenidae Travassos, 1921. These results are in agreement with Jones (2008) who considers that the family Prosthogonimidae should belong to the superfamily Microphalloidea.

The controversies concerning this family are common to most digenetic taxa, being recurrent problems to the establishment of relationships within the Platyhelminthes. In order to help clarifying such relationships in the Platy-

helminthes, several authors suggest the use of reproduction-related ultrastructural characters (spermiogenesis and/or spermatozoon) (Brooks et al. 1985, Bâ and Marchand 1995, Justine 1998, 2001, 2003, Levron et al. 2010). Concerning digeneans, the use of ultrastructural characters for phylogenetic purposes is not yet applied basically due to: (i) the insufficient amount of ultrastructural studies and (ii) the great diversity of this class, containing about 18,000 species (see Cribb et al. 2001). However, the recent increase of ultrastructural studies allowed proposing several characters as potentially useful to phylogenetic inferences (Levron et al. 2004b, Miquel et al. 2006, Bakhoum et al. 2009, Ternengo et al. 2009). The aim of the present study is to produce the first data on the family Prosthogonimidae, contributing to the ultrastructural database concerning the Digenea. We also compare our results with the available data on digenous spermatology, in particular with those species belonging to the superfamily Microphalloidea.

MATERIALS AND METHODS

A naturally infected bank vole, *Myodes glareolus* (Schreber, 1780) was captured in the Nature Reserve of Py (Pyrenean Mountains, France) during June 2009. Live mature specimens of *Mediogonimus jourdanei* were collected from the liver and placed in a 0.9% NaCl solution and routinely processed for TEM and SEM examination.

Transmission electron microscopy (TEM) examination

After dissection, specimens were fixed in cold (4°C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1M sodium cacodylate buffer at pH 7.4 for 2 h, rinsed in a 0.1M sodium cacodylate buffer at pH 7.4, postfixed in cold (4°C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h, rinsed in a 0.1M sodium cacodylate buffer at pH 7.4, dehydrated in an ethanol series and propylene oxide, and finally embedded in Spurr's resin. Ultrathin sections were obtained using a Reichert-Jung Ultracut Electronic ultramicrotome, placed on copper grids and double-stained with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds (1963).

Gold grids were made to reveal the presence of glycogen according the Thiéry (1967) methodology. Ultrathin sections placed on gold grids were treated in periodic acid, thiocarbohydrazide, and silver proteinate (PA-TCH-SP) as follows: 30 min in 10% PA, rinsed in Milli-Q water, 24 h in TCH, rinsed in acetic solutions and Milli-Q water, 30 min in 1% SP in the dark, and rinsed in Milli-Q water.

All ultrathin sections were examined using a JEOL 1010 transmission electron microscope operated at 80 kV.

Scanning electron microscopy (SEM) examination

Sections of flukes containing seminal vesicle were placed in Tyrode solution to allow for the liberation of the spermatozoa (Bedford 1975). Thus, the solution containing living spermatozoa was fixed in cold (4°C) 8% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer at pH 7.4 (1 volume of sample with 3 volumes of fixative). Then, the solution was placed in a centrifuge at 500 to 1000 rpm. After agitation the solution was postfixed in cold (4°C) 2% glutaraldehyde, rinsed in 0.1M phosphate buffer at pH 7.4 and in MilliQ water. Later, 100 µl of this solution was deposited on cover glasses with poly-L-lysine before dehydration in an alcohol series. The samples were critical-point-dried with

a Polaron CPD 7501 system (VG Microtech, UK), using hexamethyldisilazane before coating with gold (15–20 nm thick) using a SC510 sputter coater (Fisons Instruments). Finally, samples were examined using a Zeiss DSM 940 scanning electron microscope at 15 kV to a distance of 4 mm.

RESULTS

Spermiogenesis

The beginning of the spermiogenesis of *Mediogonimus jourdanei* is marked by the formation of the differentiation zone. This zone is bordered by cortical microtubules and contains the nucleus, an intercentriolar body located between two centrioles, which will originate two free flagella (Figs. 1a, c, 3a). The intercentriolar body consists of seven electron-dense layers, with three thicker dark external plates on each side of a thinner central plate (Fig. 1b). A cross-section of the differentiation zone in an early stage of spermiogenesis exhibits the median cytoplasmic process, nucleus, centrioles, intercentriolar body, and cortical microtubules (Fig. 1c). After their orthogonal growth, both flagella begin their rotation to become parallel to the median cytoplasmic process (Figs. 1a, d, e, 3a, b). Cross-sections at this stage show the median cytoplasmic process containing a nucleus, a mitochondrion and two fields of cortical microtubules, along with two external free flagella on each side of the median cytoplasmic process (Fig. 1f). In distal areas of the differentiation zone before the fusion, several cross-sections show the median cytoplasmic processes and the free flagella (Fig. 2a). The asynchronous fusion of flagella with the median cytoplasmic process is demonstrated in cross-sections exhibiting the nucleus, one axoneme, and a mitochondrion while the other flagellum is still free (Fig. 2b).

After the fusion of both flagella, the ring of arched membranes initiates its constriction. In an early stage of this progressive constriction process, the striated rootlets are still present in the spermatid body. At this stage, both longitudinal and cross-sections show that mitochondria are still migrating (Fig. 2c, d). Finally, in a terminal stage of the constriction process, striated rootlets disappear and the young spermatozoon detaches from the residual cytoplasm (Figs. 2e, 3d).

Spermatozoon

The ultrastructural aspects of the mature spermatozoon of *M. jourdanei* are illustrated in Figs. 4–6. The spermatozoon is filiform and measures about 260 µm (Fig. 4a). It is characterized by the presence of two axonemes of different lengths exhibiting the 9+“1” trepanematan pattern, a nucleus, one mitochondrion, two sets of parallel submembranous cortical microtubules, an external ornamentation, spine-like bodies and granules of glycogen (Fig. 5a–r). The interpretation of several cross and longitudinal sections allows us to establish three distinctive regions from the anterior to the posterior extremity of the spermatozoon of *M. jourdanei*.

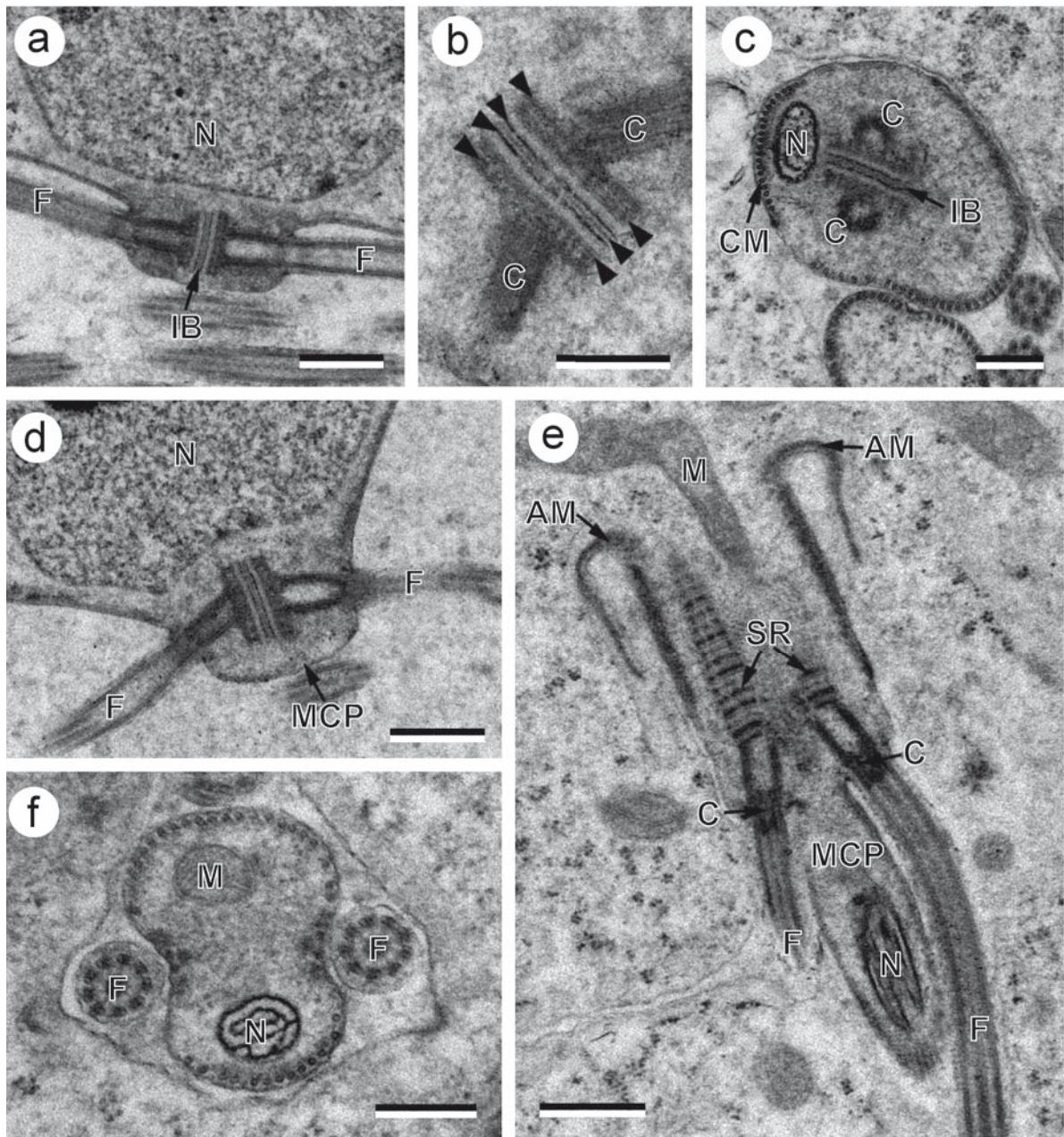


Fig 1. Transmission electron micrographs of spermiogenesis of *Mediogonimus jourdanei*. **a** – Initial stage of the zone of differentiation showing the development of the two flagella; **b** – Detail of the intercentriolar body; **c** – Cross-section of the differentiation zone at the level of centrioles; **d** – Intermediate stage during flagellar rotation; **e** – Longitudinal section showing the two flagella parallel to the median cytoplasmic process; **f** – Cross-section before flagellar fusion showing nuclear and mitochondrial migrations. Abbreviations: AM – arched membranes; C – centriole; CM – cortical microtubules; F – flagellum; IB – intercentriolar body; M – mitochondrion; MCP – median cytoplasmic process; N – nucleus; SR – striated rootlets. Scale bars: a–f = 0.5 μ m.

Region I

It corresponds to the anterior spermatozoon extremity presenting a sharp morphology (Figs. 4b, 5a, b, 6I). Both longitudinal and cross-sections in this region show centrioles surrounded by a continuous layer of parallel cortical microtubules (Figs. 5c, d, 6I). Cross-sections in more posterior areas of the anterior spermatozoon extremity exhibit two axonemes also surrounded by a continuous

layer of cortical microtubules (about 34 to 39). Note that in this area the attachment zones are not observed (Fig. 5e). The central part of region I is an ornamented zone, characterized by the presence of external ornamentation of the plasma membrane associated with cortical microtubules and spine-like bodies (Figs. 5f, g, 6I). Moreover, the external ornamentation appears only in those areas where the cortical microtubules are present and surrounds one

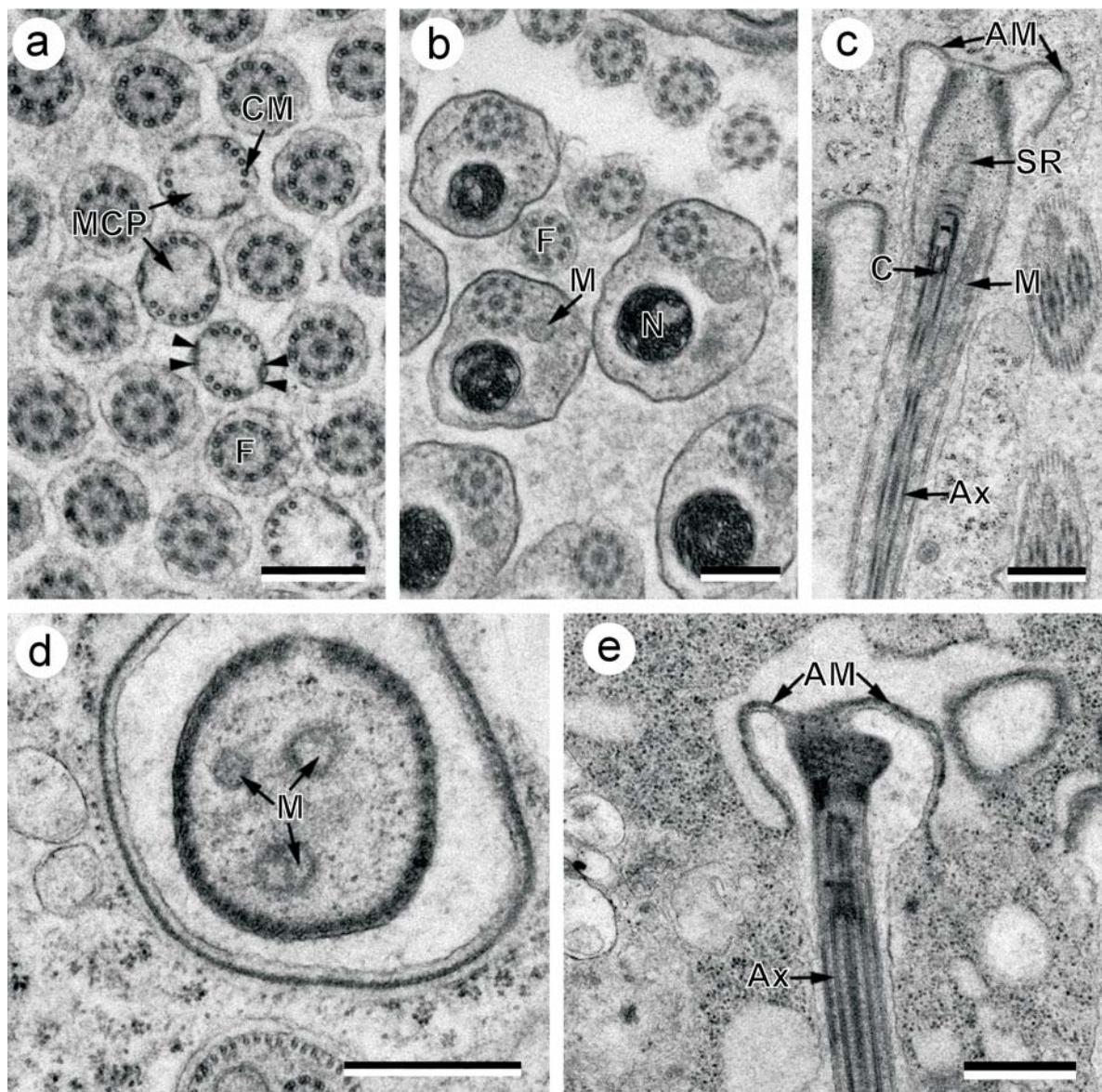


Fig 2. Transmission electron micrographs of spermiogenesis of *Mediogonimus jourdanei*. **a** – Cross-sections showing median cytoplasmic processes before their fusion with flagella; arrowheads indicate attachment zones; **b** – Several cross-sections showing the asynchronous fusion of flagella; **c** – Longitudinal section after flagellar rotation; note the mitochondrial migration and the presence of striated rootlets; **d** – Cross-section at the level of arched membranes showing several mitochondria; **e** – Advanced stage during the constriction of the ring of arched membranes; note the absence of striated rootlets. Abbreviations: AM – arched membranes; Ax – axoneme; C – centriole; CM – cortical microtubules; F – flagellum; M – mitochondrion; MCP – median cytoplasmic process; N – nucleus; SR – striated rootlets. Scale bars: a, b, d = 0.3 µm; c, e = 0.5 µm.

of the axonemes (Figs. 5f, 6I). It is also noticeable that only two attachment zones are present in this area (Figs. 5f, 6I). The end of region I is marked by the presence of cortical microtubules organized in two fields and by the appearance of granules of glycogen (Figs. 5h, i, 6I). Glycogen has been evidenced by the cytochemical test of Thiéry (Fig. 5r). This zone that exhibits another four attachment zones marks the transition between regions I and II (Figs. 5h, i).

Region II

In this region the mitochondrion is accompanied by the nucleus, both axonemes and a reduced number of cortical microtubules present in a nuclear or dorsal face (about 4–5) and in a mitochondrial or ventral face (about 7) (Figs. 4c, 5j–l, 6II). Granules of glycogen are also observed in this area. When the diameter of the nucleus increases, the cortical microtubules form two lateral bundles (Fig. 5l, m). The posterior part of region II is characterized by the

disappearance of one axoneme. At this level, it is possible to observe the axoneme, nucleus, mitochondrion, granules of glycogen and a reduced number of cortical microtubules (about 2–4) (Figs. 5m, 6II).

Region III

It corresponds to the posterior spermatozoon extremity, being characterised by the disappearance of the mitochondrion and cortical microtubules, and showing only a single axoneme, the nucleus and granules of glycogen (Figs. 5n, 6III). Several cross-sections toward the posterior extremity exhibit the progressive reduction of the nucleus diameter and its disappearance. The posterior extremity of the nucleus was also observed by means of SEM (Fig. 4d). Finally, the single axoneme begins its disorganization characterised by the presence of doublets and singlets that reach the posterior spermatozoon extremity (Figs. 5o–q, 6III). The posterior tip of the spermatozoon exhibits only singlets and some granules of glycogen (Figs. 5q, 6III).

DISCUSSION

Spermiogenesis

Despite the great similarities observed between the spermiogenesis processes of *M. jourdanei* and those of other digenleans, the present study allowed observing variations of some characters.

Spermiogenesis of *M. jourdanei* begins with the formation of the differentiation zone at the periphery of each early spermatid. This zone is delimited by a ring of arched membranes and contains the intercentriolar body between two centrioles, which are associated to striated rootlets. This differentiation zone characterises the spermiogenesis of neodermatans (see Justine 2003). Each centriole gives rise to a flagellum that grows orthogonally to a median cytoplasmic process before fusing with it. A flagellar rotation of 90° was described in all microphalloidean species studied to date (see Table 1) and also in other digenleans [e.g. *Opecoeloides furcatus* (Bremser in Rudolphi, 1819) by Miquel et al. (2000), *Poracanthium furcatum* Dollfus, 1948 by Levron et al. (2004b), *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) by Cifrian et al. (1993), *Corrigia vitta* (Dujardin, 1845) by Robinson and Halton (1982), *Troglotrema acutum* (Leuckart, 1842) by Miquel et al. (2006), *Neoapocreadium chabaudi* Kohn et Fernandes, 1982 by Kacem et al. (2010), or *Deropristis inflata* (Molin, 1859) by Foata et al. (2007)]. In other digenleans a flagellar rotation greater than 90° was described. This is the case of *Helicometra fasciata* (Rudolphi, 1819), *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, *Nicolla wisniewskii* (Slusarski, 1958), *Dicrocoelium hospes* (Looss, 1907), *Monorchis parvus* Looss, 1902, and *Crepidostomum metoecus* (Braun, 1900) (Levron et al. 2003, 2004c, Ndiaye et al. 2003, Agostini et al. 2005, Quilichini et al. 2007a,b). The importance of this flagellar rotation resides in the comparison between trematodes and cestodes. In fact, in the

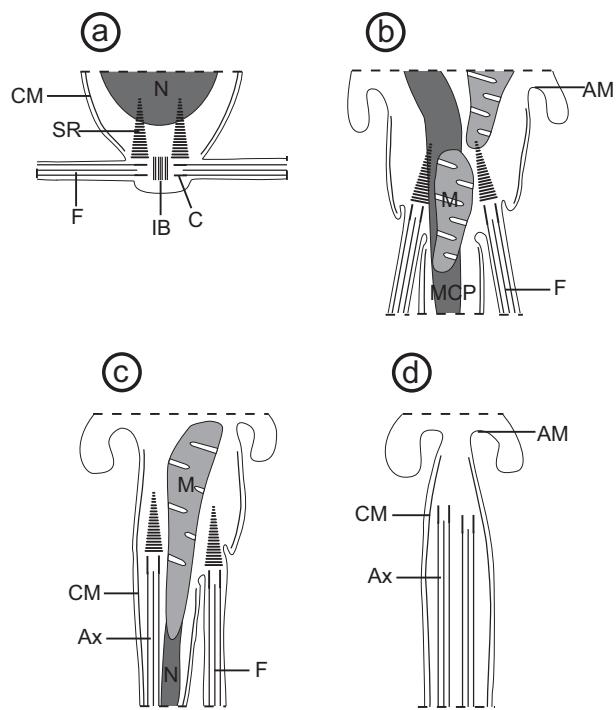


Fig 3. Schematic reconstruction of the spermiogenesis of *Medicogonimus jourdanei*. Abbreviations: AM – arched membranes; Ax – axoneme; C – centriole; CM – cortical microtubules; F – flagellum; IB – intercentriolar body; M – mitochondrion; MCP – median cytoplasmic process; N – nucleus; SR – striated rootlets.

cestodes the flagellar rotation decreases from 90° until 0° in some cyclophyllideans (see Miquel et al. 2009). Nevertheless, some cestodes present a flagellar rotation greater than 90° (Bruňanská et al. 2006, Miquel et al. 2008). All these aspects allow interpreting this variability as a gradual reduction of the angle of rotation of free flagellum/a from the more basal to the more evolved Platyhelminthes (see Miquel et al. 2006).

The intercentriolar body is another plesiomorphic character present in the Digenea and also in most cestodes, except for tetrabothriideans and cyclophyllideans (Justine 1998, 2001). The variability in the number of its constitutional plates according to parasitic Platyhelminthes emphasises its importance for phylogenetic purposes (see Bakhoun et al. 2011a, b). In fact, some aspidogastreans present an intercentriolar body with 11 electron-dense plates (see Levron et al. 2009). In digenleans most species present an intercentriolar body with seven electron-dense plates as described in *M. jourdanei* and other microphalloideans (Table 1). However, an intercentriolar body with nine electron-dense layers has been described in *Cryptocotyle lingua* (Creplin, 1825) and in *M. parvus* (Rees 1979, Levron et al. 2004c). Moreover, Levron et al. (2003) observed five to seven electron-dense layers in *H. fasciata* and Foata et al. (2007) described six electron-dense layers in *D. inflata*. The absence of this character

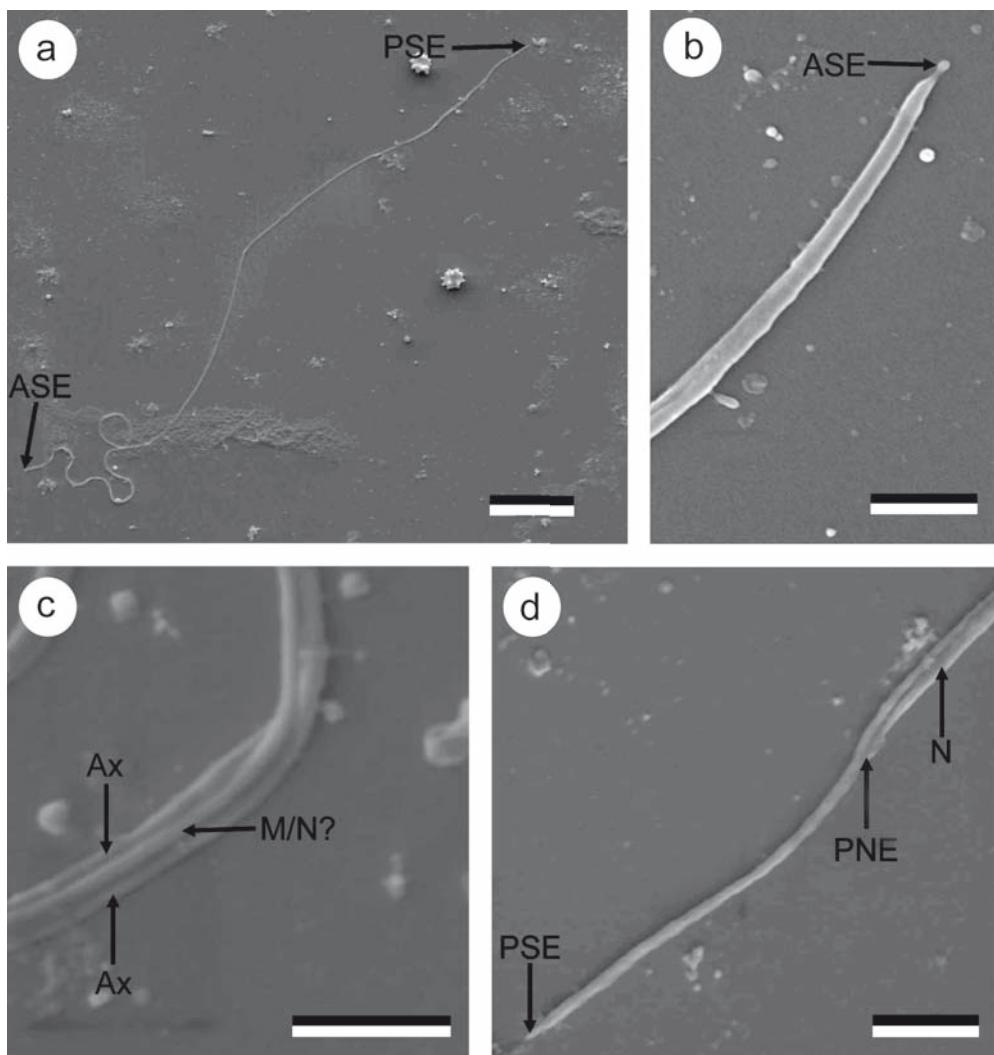


Fig 4. Scanning electron micrographs of the spermatozoon of *Mediogonimus jourdanei*. **a** – Entire spermatozoon; **b** – Morphology of anterior spermatozoon extremity; **c** – Median region of the spermatozoon exhibiting both axonemes with mitochondrion and/or nucleus; **d** – Posterior spermatozoon extremity; note the posterior nuclear extremity. Abbreviations: ASE – anterior spermatozoon extremity; Ax – axoneme; M – mitochondrion; N – nucleus; PNE – posterior nuclear extremity; PSE – posterior spermatozoon extremity. Scale bars: a = 20 μ m; b, d = 2 μ m; c = 3 μ m.

is reported in some schistosomatids and didymozoids (Justine and Mattei 1984, Pamplona-Basílio et al. 2001). Within cestodes, which are considered the most evolved Platyhelminthes, a gradual reduction of the intercentriolar body is also observed (Justine 2001, Levron et al. 2010).

In the mature spermatozoon of *M. jourdanei*, as in other digenleans, the intercentriolar body and the striated rootlets are absent. According to Burton (1972) these structures remain in the residual cytoplasm after the total constriction of the ring of arched membranes or degenerate by a process of depolymerisation (see Justine and Mattei 1982, Levron et al. 2004c).

Spermatozoon

The mature spermatozoon of *M. jourdanei* presents the principal structures described previously in the male gamete of digenleans. Like the remaining microphalloideans

described to date, the mature spermatozoon of *M. jourdanei* exhibits two axonemes of different length presenting the 9+“1” pattern of trepanemata (Ehlers 1984), a nucleus, one mitochondrion, two sets of parallel cortical microtubules, an external ornamentation accompanied by spine-like bodies, and granules of glycogen irregularly distributed along the spermatozoon except for the anterior extremity. It is interesting to remark that some of these characters and also the morphology of both extremities could be potential candidates for phylogenetic analysis.

The anterior spermatozoon extremity of *M. jourdanei* exhibits two centrioles corresponding to two axonemes. Such description is also reported in *Microphallus primas* (Jägerskiöld, 1908) by Castilho and Barandela (1990), contrarily to the remaining microphalloideans that present only a single axoneme (see Table 1) as most digenleans studied to date (see Agostini et al. 2005, Quilichini et al.

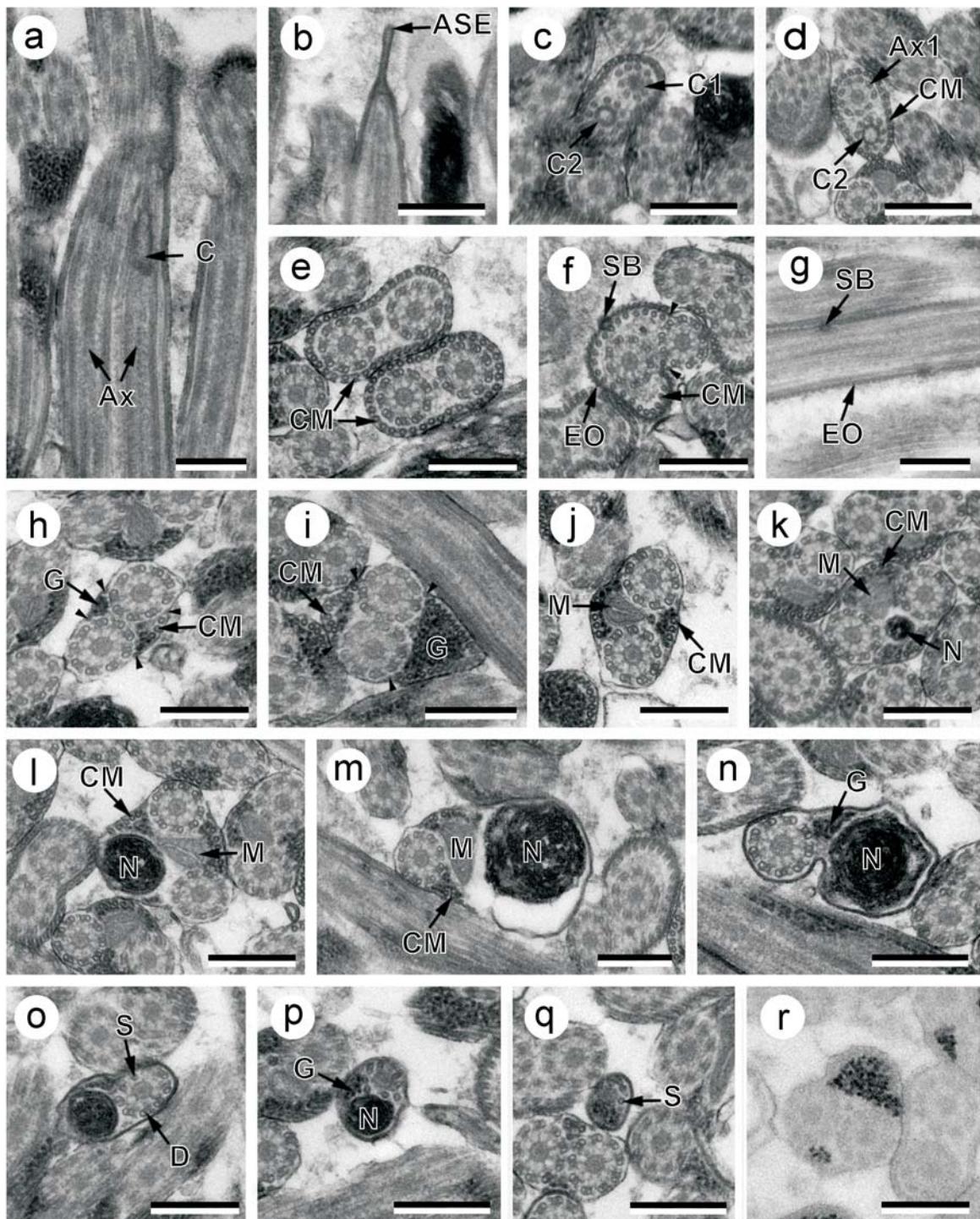


Fig 5. Transmission electron micrographs of the spermatozoon of *Mediogonimus jourdanei*. **a, b** – Longitudinal sections of the anterior spermatozoon extremity; **c–e** – Cross-sections showing the progressive appearance of the first and second axoneme; note the continuous layer of cortical microtubules surrounding both centrioles and/or axonemes; **f, g** – Cross and longitudinal sections in the ornamented area exhibiting the spine-like body; arrowheads indicate the presence of only two attachment zones; **h, i** – Transitional zone between regions I and II of the spermatozoon; note the appearance of glycogen granules; arrowheads indicate the presence of four attachment zones; **j–l** – Several cross-sections of region II showing the presence of nucleus, mitochondrion, cortical microtubules, both axonemes and granules of glycogen; **m** – Cross-section of the posterior area of region II characterized by the disappearance of one axoneme; **n–q** – Serial cross-sections of region III exhibiting only one axoneme, nucleus and glycogen granules; note the absence of cortical microtubules; **r** – Cross-section showing the result of Thiéry staining for glycogen. Abbreviations: ASE – anterior spermatozoon extremity; Ax – axoneme; Ax1 – first axoneme; C – centriole; C1 – first centriole; C2 – second centriole; CM – cortical microtubules; D – doublet; EO – external ornamentation; G – granules of glycogen; M – mitochondrion; N – nucleus; S – singlet; SB – spine-like body. Scale bars: a–r = 0.3 µm.

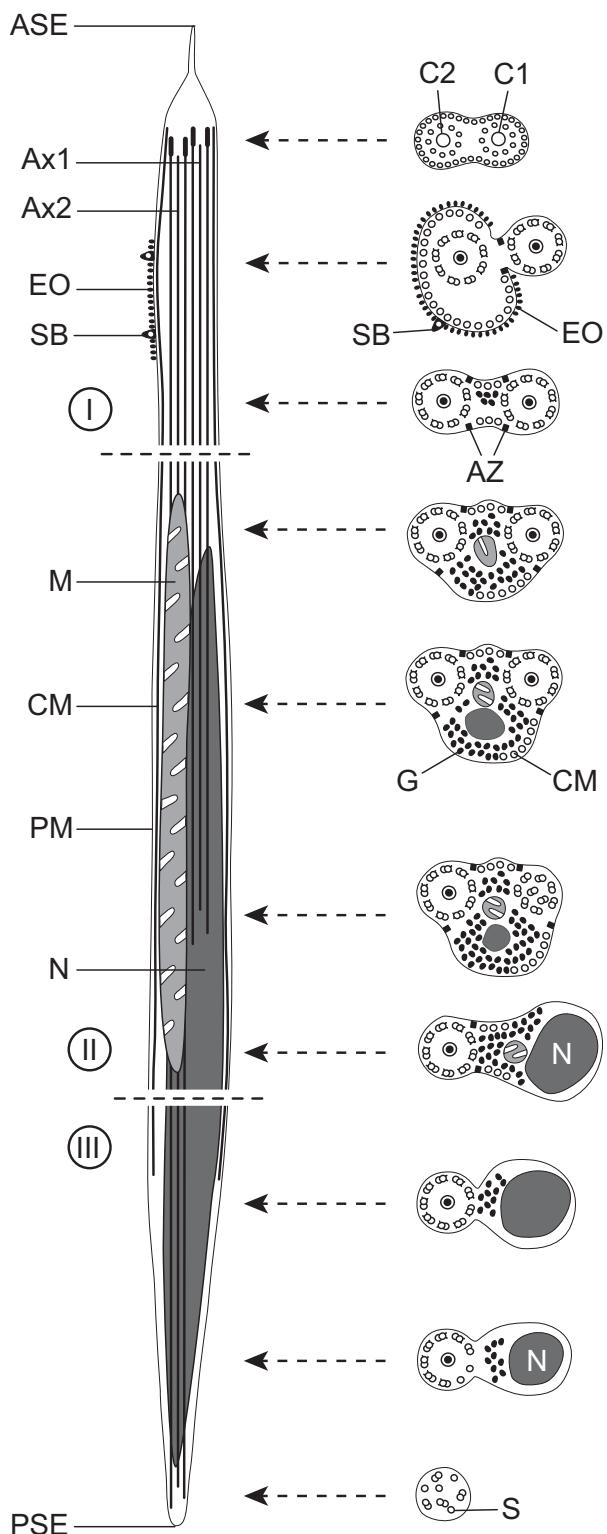


Fig 6. Schematic illustration of the mature spermatozoon of *Mediogonimus jourdanei*. Abbreviations: ASE – anterior spermatozoon extremity; Ax1 – first axoneme; Ax2 – second axoneme; AZ – attachment zone; C1 – first centriole; C2 – second centriole; CM – cortical microtubules; EO – external ornamentation; G – granules of glycogen; M – mitochondrion; N – nucleus; PM – plasma membrane; PSE – posterior spermatozoon extremity; S – singlet; SB – spine-like body.

2009). Additionally, a different morphology of the anterior spermatozoon extremity has been recently evidenced by Kacem et al. (2010) in *N. chabaudi*. The latter authors observed that the anterior tip of the spermatozoon in this species is constituted by cortical microtubules accompanied by external ornamentation.

It is also noticeable to remark the absence of glycogen granules in all sections between the anterior tip of the spermatozoon and the ornamented area. We think that the lack of glycogen could be used in some cases to locate sections belonging to the anterior region of the spermatozoon. This variability in the morphology of the anterior spermatozoon extremity emphasises the importance of this region in the analysis of relationships within the Digenea.

The external ornamentation, present in the anterior region of the spermatozoon, represents a structure generally described in the mature spermatozoon of digenous (see Miquel et al. 2006, Bakhoum et al. 2011b). However, external ornamentation of the plasma membrane is not exclusive to digenous. A similar structure was reported in the polyopisthocotylean *Pseudomazocraes monsivaisae* Caballero et Bravo, 1955 by Justine and Mattei (1985).

With respect to digenous, Quilichini et al. (2007c) proposed two different groups of digenous according to the localisation of external ornamentations. However, there are some digenous without external ornamentation in the sperm cell (see Cifrian et al. 1993, Levron et al. 2003) and it is also remarkable the recent description of a species presenting an external ornamentation throughout the full length of the anterior region (see Kacem et al. 2010). This variability highlights the need for more ultrastructural studies that may allow establishing different patterns according to different families or superfamilies.

The external ornamentation is generally accompanied by cortical microtubules as described in *M. jourdanei* (present study) and also in other microphalloidean species, except for *Maritrema linguilla* and *Ganeo tigrinum* (see Table 1). Therefore, the systematic status of the latter genera is controversial (see Tkach et al. 2003, Jones 2008).

In some digenous presenting more than one mitochondrion, the external ornamentation appears in the mitochondrial region accompanied by cortical microtubules and spine-like bodies. For example, such description is observed in the troglotrematid *T. acutum* (Miquel et al. 2006), or in the cryptogonimids *S. elongata* (see Quilichini et al. 2009), and *Anisocoelium capitellatum* (Rudolphi, 1819) (Ternengo et al. 2009). Thus, the presence, absence and the variability in the disposition of the external ornamentation are other aspects of importance to use for achieving a better understanding of phylogenetic relationships within the digenous at a family or superfamily levels.

In the ornamented area, some electron-dense elements appear under the cytoplasmic membrane. Miquel et al.

Table 1. Spermatological characters in the superfamily Microphalloidea.

| Families and species | Spermatological characters | | | | | | | | References |
|----------------------------------|----------------------------|----|-----|----|-----|-----|---------------------------|-------|-------------------------------|
| | IB | AZ | FR | EO | SB | M | ASE | PSE | |
| Faustulidae | | | | | | | | | |
| <i>Pronoprymna ventricosa</i> | | + | - | 1 | 1Ax | 1Ax | Quilichini et al. (2007c) | | |
| Lecithodendriidae | | | | | | | | | |
| <i>Ganeo tigrinum</i> | | - | - | 1 | ? | 1Ax | Sharma and Rai (1995) | | |
| Microphallidae | | | | | | | | | |
| <i>Microphallus primas</i> | ? | 4 | ? | + | - | 1 | 2Ax | 1Ax | Castilho and Barandela (1990) |
| <i>Maritrema linguilla</i> | ? | 4 | 90° | - | - | 2 | ? | 1Ax | Hendow and James (1988) |
| Phaneropsolidae | | | | | | | | | |
| <i>Postorchigenes gymnesicus</i> | 7 | 4 | 90° | + | - | 2 | 1Ax | 1Ax+G | Gracenea et al. (1997) |
| Prosthogonimidae | | | | | | | | | |
| <i>Mediogonimus jourdanei</i> | 7 | 4 | 90° | + | + | 1 | 2Ax | 1Ax | Present study |
| Zoogonidae | | | | | | | | | |
| <i>Diphtherostomum brusinae</i> | 7 | 4 | 90° | + | - | 1 | 1Ax | N+G | Levron et al. (2004a) |

Abbreviations: ASE – anterior spermatozoon extremity; Ax – axoneme; AZ – attachment zone; EO – external ornamentation; FR – flagellar rotation; G – granules of glycogen; IB – intercentriolar body; M – mitochondrion; N – nucleus; PSE – posterior spermatozoon extremity; SB – spine-like body.

(2000) reported such structures named spine-like bodies for the first time in the spermatozoon of the opecoelid *O. furcatus*. In all digeneans with spine-like bodies, this structure is located in the anterior area of the spermatozoon, being usually associated with the external ornamentation of the plasma membrane. Nevertheless, in *N. chabaudi* the ornamented zone is anterior to the spine-like bodies (Kacem et al. 2010). Similar structures were previously observed in the spermatozoon of other digeneans. Concerning the superfamily Microphalloidea, spine-like bodies were observed in *M. jourdanei* only (present study). In fact, the observation of micrographs published in older studies reveals several cross-sections where electron-dense structures are present (probably spine-like bodies), for example in the anterior region of the spermatozoon of *Haematoloechus medioplexus* Stafford, 1902 (Justine and Mattei 1982). Unfortunately, the latter authors did not mention these electron-dense structures. Thus, it is possible that in several older studies spine-like bodies have been omitted or misinterpreted as artifacts.

The spine-like bodies seem to be very interesting at a family, superfamily or order level. Much like external ornamentations, some authors have suggested that the formation of spine-like bodies takes place in the last stages of spermiogenesis (Miquel et al. 2000) as observed in *M. jourdanei*. However, in *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) and *Rubenstrema exasperatum* (Rudolphi, 1819), spine-like bodies are observed at an early stage of spermiogenesis, before the fusion of both flagella with the median cytoplasmic process (Bakhoun et al. 2011a, b).

Concerning mitochondria, several viewpoints have been given to explain their number in the mature spermatozoon of Digenea. Burton (1972) argued that the mitochondria observed in the differentiation zone during spermiogenesis fuse and form one mitochondrion after their migration within the median cytoplasmic process. In *M. jourdanei*, while several mitochondria migrate along the spermatid in the late stage of spermiogenesis, only

one mitochondrion was observed in the mature spermatozoon. In the Microphalloidea, one mitochondrion has been described in three species (see Table 1). This is also the case in most digenetic species (see Quilichini et al. 2007a). The real difficulty in evaluating the number of mitochondria lies in the impossibility of observing their entire form in longitudinal sections. However, several authors assume the existence of more than one mitochondrion after making logical interpretations of many cross and longitudinal sections. For instance, two mitochondria were observed in the spermatozoon of the microphalloideans *Postorchigenes gymnesicus* Mas-Coma, Bargues et Esteban, 1981 (Gracenea et al. 1997) and *M. linguilla* (Hendow and James 1988), but also in other digeneans such as *F. hepatica* (Ndiaye et al. 2003), *D. hospes* (Agostoni et al. 2005) or *T. acutum* (Miquel et al. 2006). Three mitochondria were described in the male gamete of *Basidioculus ectorchus* Fischthal et Kuntz, 1959, *Sandonia sudanensis* McClelland, 1957, *E. squamula* and *Anisocoelium capitellatum* Rudolphi, 1819 (Ashour et al. 2007, Bakhoun et al. 2009, Ternengo et al. 2009). The number of mitochondria and their location raise several controversies, which have led researchers to propose the use of some techniques such as mitochondria labelling to assess the real variability in the number of mitochondria (see Miquel et al. 2006).

The posterior spermatozoon extremity also presents a great variability. In *M. jourdanei* the posterior spermatozoon extremity is devoid of cortical microtubules and exhibits one of the axonemes. Within the superfamily, the spermatozoon of all the species described presents a single axoneme in the posterior extremity except for *Diphtherostomum brusinae* (Stossich, 1888) (Levron et al. 2004a), which contains the nucleus. Quilichini et al. (2010) have proposed three morphological types of spermatozoon posterior extremities according to the relative position of several characters. In other study, Bakhoun et al. (2011b) proposed the use of only the terminal character to de-

fine the posterior spermatozoon extremity, instead of the character sequence toward the terminal extremity. These morphological differences of the posterior spermatozoon extremity could be interesting arguments to include in a future phylogenetic analysis of the Digenea.

A comparison of ultrastructural studies with molecular analyses shows some concordances in the Microphalloidea. In a phylogenetic analysis of this superfamily based on molecular data, Tkach et al. (2003) discuss the incongruent status of the genus *Maritrema*. In our study, the global analysis of the studied microphalloidean species emphasises that external ornamentation is a significant difference between the ultrastructural organisation of spermatozoa of *M. primas* (Castilho and Barandela 1990), *P. gymnesicus* (Gracenea et al. 1997), *D. brusinae* (Levron et al. 2004a), *Pronoprymna ventricosa* (Rudolphi, 1819) (Quilichini et al. 2007c) and *M. jordanei* (present study), and that of the spermatozoa of the remaining species, *G. tigrinum* (Sharma and Rai 1995) and *M. linguilla* (Hendow and James 1988). Spermatozoal characters cor-

roborate that the systematic position of *Maritrema* is confusing, in agreement with the above mentioned molecular study (Tkach et al. 2003). This is also the case of the genus *Ganeo*, excluded to the family Lecithodendriidae Lühe, 1901 and considered *incertae sedis* by Bray (2008). In this context, more ultrastructural studies, particularly those of species belonging to the unexplored families of Microphalloidea would be useful to highlight ultrastructural characters of interest at the superfamily level.

Acknowledgements. Authors wish to thank the staff of the Nature Reserve of Py (Claude Guisset and David Morichon, in particular) (Pyrenean Mountains, France) for their hospitality and valuable help during the fieldwork. We also thank Nuria Cortedellas and Almudena García from the “Unitat de Microscòpia, Facultat de Medicina, Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB)” for their support in the preparation of samples. This study was partially supported by the DURSI Project 2009SGR-403. A.J.S. Bakhoum benefits from a MAEC-AECID doctoral grant (2010–11, No. 0000538055).

REFERENCES

- AGOSTINI S., MIQUEL J., NDIAYE P.I., MARCHAND B. 2005: *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 (Digenea, Dicrocoeliidae): spermiogenesis, mature spermatozoon and ultrastructural comparative study. Parasitol. Res. 96: 38–48.
- ASHOUR A.A., GARO K., GAMIL I.S. 2007: Spermiogenesis in two paramphistomes from Nile fish in Egypt: an ultrastructural study. J. Helminthol. 81: 219–226.
- BÀ C.T., MARCHAND B. 1995: Spermiogenesis, spermatozoa and phyletic affinities in the Cestoda. In: B.G.M. Jamieson, J. Ausió and J.-L. Justine (Eds.), Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mém. Mus. Natl. Hist. Nat. 166: 87–95.
- BAKHOUM A.J.S., BÀ C.T., FOURNIER-CHAMBRILLON C., TORRES J., FOURNIER P., MIQUEL J. 2009: Spermatozoon ultrastructure of *Euryhelmis squamula* (Rudolphi, 1819) (Digenea, Opisthorchiidae, Heterophyidae), an intestinal parasite of *Mustela vison* (Carnivora, Mustelidae). Rev. Ibero-latinoam. Parasitol. 1: 32–45.
- BAKHOUM A.J.S., BÀ C.T., SHIMALOV V.V., TORRES J., MIQUEL J. 2011b: Spermatological characters of the digenean *Rubenstrema exasperatum* (Rudolphi, 1819) (Plagiorchiidae, Omphalometridae). Parasitol. Res. 108: 1283–1293.
- BAKHOUM A.J.S., TORRES J., SHIMALOV V.V., BÀ C.T., MIQUEL J. 2011a: Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) (Paramphistomoidea, Diplodiscidae), an intestinal fluke of the pool frog *Rana lessonae* (Amphibia, Anura). Parasitol. Int. 60: 64–74.
- BEDFORD J.M. 1975: The functional anatomy of the spermatozoon. Proceedings of the Second International Symposium, Wennergren Center, Stockholm, August 1973: xi + 373 pp.
- BRAY R.A. 2008: Superfamily Microphalloidea Ward, 1901. In: R.A. Bray, A. Jones and D.I. Gibson (Eds.), Keys to the Trematoda. Vol. 3. CABI, Wallingford, UK, pp. 447–450.
- BROOKS D.R., BANDONI S.M., MACDONALD C.A., O'GRADY R.T. 1989: Aspects of the phylogeny of the Trematoda Rudolphi, 1808 (Platyhelminthes: Cercomeria). Can. J. Zool. 67: 2609–2624.
- BROOKS D.R., O'GRADY R.T., GLEN D.R. 1985: Phylogenetic analysis of the Digenea (Platyhelminthes: Cercomeria) with comments on their adaptative radiation. Can. J. Zool. 63: 411–443.
- BRUÑANSKÁ M., SCHOLZ T., DEZFULI B.S., PODDUBNAYA L.G. 2006: Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Cyathocephalus truncatus* (Pallas, 1781) Kessler, 1868 (Cestoda: Spathebothriidae). J. Parasitol. 92: 884–892.
- BURTON P.R. 1972: Fine structure of the reproductive system of a frog lung-fluke. III. The spermatozoon and its differentiation. J. Parasitol. 58: 68–83.
- CASTILHO F., BARANDELA T. 1990: Ultrastructural study on the spermiogenesis and spermatozoon of the metacercariae of *Microphallus primas* (Digenea), a parasite of *Carcinus maenas*. Mol. Reprod. Dev. 25: 140–146.
- CIFRIAN B., GARCIA-CORRALES P., MARTINEZ-ALOS S. 1993: Ultrastructural study of the spermatogenesis and mature spermatozoa of *Dicrocoelium dendriticum* (Plathelminthes, Digenea). Parasitol. Res. 79: 204–212.
- CRIBB T.H., BRAY R.A., LITTLEWOOD D.T.J., PICHELIN S.P., HERNIQU E.A. 2001: The Digenea. In: D.T.J. Littlewood and R.A. Bray (Eds.), Interrelationships of the Platyhelminthes, Taylor and Francis, London, UK, pp. 168–185.
- EHLERS U. 1984: Phylogenetisches System der Plathelminthes. Verh. Natwiss. Ver. Hamburg, NF, 27: 291–294.
- FOATA J., QUILICHINI Y., MARCHAND B. 2007: Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Deropristis inflata* Molin, 1859 (Digenea, Deropristidae), a parasite of *Anguilla anguilla*. Parasitol. Res. 101: 843–852.
- GRACENEÀ M., FERRER J.R., GONZÁLEZ-MORENO O., TRULLOLS M. 1997: Ultrastructural study of spermatogenesis and spermatozoon in *Postorchigenes gymnesicus* (Trematoda, Lecithodendriidae). J. Morphol. 234: 223–232.
- HENDOW H.T., JAMES B.L. 1988: Ultrastructure of spermatozoon and spermatogenesis in *Maritrema linguilla* (Digenea: Microphallidae). Int. J. Parasitol. 18: 53–63.

- JONES A. 2008: Family Prosthogonimidae Lühe, 1909. In: R.A Bray, D.I Gibson and A. Jones (Eds.), Keys to the Trematoda. Vol. 3. CABI, Wallingford, UK, pp. 577–590.
- JUSTINE J.-L. 1998: Systématique des grands groupes de plathelminthes parasites: quoi de neuf? Bull. Soc. Fr. Parasitol. 16: 34–52.
- JUSTINE J.-L. 2001: Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes. In: D.T.J. Littlewood and R.A. Bray (Eds.), Interrelationships of the Platyhelminthes. Taylor and Francis, London, UK, pp. 231–238.
- JUSTINE J.-L. 2003: Ultrastructure des spermatozoïdes et phylogénie des Neodermata. In: C. Combes and J. Jourdane (Eds.), Taxonomie, Écologie et Évolution des Métazoaires Parasites. PUP, Perpignan, France, pp. 359–380.
- JUSTINE J.-L., MATTEI X. 1982: Réinvestigation de l'ultrastructure du spermatozoïde d'*Haematoloechus* (Trematoda: Haematolöechidae). J. Ultrastr. Res. 81: 322–332.
- JUSTINE J.-L., MATTEI X. 1984: A typical spermiogenesis in a parasitic flatworm, *Didymozoon* (Trematoda: Digenea: Didymozoidae). J. Ultrastr. Res. 87: 106–111.
- JUSTINE J.-L., MATTEI X. 1985: Particularités ultrastructurales des spermatozoïdes de quelques Monogènes Polyopisthocotylea. Ann. Sci. Nat. Zool., Paris, 7: 143–152.
- KACEM H., BAKHOU A.J.S., TORRES J., NEIFAR L., MIQUEL J. 2010: Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of *Neoapocreadium chabaudi* Kohn & Fernandes, 1982 (Digenea, Apocreadiidae), a parasite of *Ballistes capriscus* (Pisces, Teleostei). Parasitol. Int. 59: 358–366.
- LEVRON C., MIQUEL J., OROS M., SCHOLZ T. 2010: Spermatozoa of tapeworms (Platyhelminthes, Eucestoda): advances in ultrastructural and phylogenetic studies. Biol. Rev. 85: 523–543.
- LEVRON C., SUCHANOVÁ E., PODDUBNAYA L., OROS M., SCHOLZ T. 2009: Spermatological characters of the aspidogastrean *Aspidogaster limacoides* Diesing, 1835. Parasitol. Res. 105: 77–85.
- LEVRON C., TERNENGO S., MARCHAND B. 2003: Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Helicometra fasciata* (Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Labrus merula* (Pisces, Teleostei). Acta Parasitol. 48: 255–264.
- LEVRON C., TERNENGO S., MARCHAND B. 2004a: Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Diphterostomum brusinae* (Digenea, Zoogonidae), a parasite of *Diplodus annularis* (Pisces, Teleostei). Parasitol. Res. 94: 147–154.
- LEVRON C., TERNENGO S., MARCHAND B. 2004b: Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Poracanthium furcatum* (Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mullus surmuletus* (Pisces, Teleostei). Acta Parasitol. 49: 190–200.
- LEVRON C., TERNENGO S., MARCHAND B. 2004c: Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Monorchis parvus* Looss, 1902 (Digenea, Monorchiidae), a parasite of *Diplodus annularis* (Pisces, Teleostei). Parasitol. Res. 93: 102–110.
- MIQUEL J., FOURNIER-CHAMBRILLON C., FOURNIER P., TORRES J. 2006: Spermiogenesis and spermatozoon of the cranial digenetic *Troglotrema acutum* (Leuckart, 1842). J. Parasitol. 92: 441–453.
- MIQUEL J., NOURRISON C., MARCHAND B. 2000: Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Opecoeloides furcatus* (Trematoda, Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mullus barbatus* (Pisces, Teleostei). Parasitol. Res. 86: 301–310.
- MIQUEL J., ŚWIDERSKI Z., FORONDA P., TORRES J., FELIU C. 2009: Ultrastructure of spermatogenesis of *Taenia taeniaeformis* (Batsch, 1786) (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) and comparison of spermatological characters in the family Taeniidae Ludwig, 1886. Acta Parasitol. 54: 230–243.
- MIQUEL J., ŚWIDERSKI Z., MACKIEWICZ J.S., IBRAHEEM M.H. 2008: Ultrastructure of spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Wenyonia virilis* Woodland, 1923, with re-assessment of flagellar rotation in *Glaridacris catostomi* Cooper, 1920. Acta Parasitol. 53: 19–29.
- NDIAYE P.I., MIQUEL J., FONS R., MARCHAND B. 2003: Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the liver fluke *Fasciola hepatica* L., 1758 (Digenea, Fasciolidae): scanning and transmission electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. Acta Parasitol. 48: 182–194.
- OLSON P.D., CRIBB T.H., TKACH V.V., BRAY R.A., LITTLEWOOD D.T.J. 2003: Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). Int. J. Parasitol. 33: 733–755.
- PAMPLONA-BASILIO M.C., BAPTISTA-FARIAS M.F.D., KOHN A. 2001: Spermatogenesis and spermiogenesis in *Didymocystis wedli* Ariola, 1902 (Didymozoidae, Digenea). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96: 1153–1159.
- QUILICHINI Y., FOATA J., JUSTINE J.-L., BRAY R.A., MARCHAND B. 2009: Sperm ultrastructure of the digenetic *Siphoderina elongata* (Platyhelminthes, Cryptogenitidae) intestinal parasite of *Nemipterus furcosus* (Pisces, Teleostei). Parasitol. Res. 105: 87–95.
- QUILICHINI Y., FOATA J., JUSTINE J.-L., BRAY R.A., MARCHAND B. 2010: Ultrastructural study of the spermatozoon of *Heterolebes maculosus* (Digenea, Opistholebetidae), a parasite of the porcupinefish *Diodon hystrix* (Pisces, Teleostei). Parasitol. Int. 59: 427–434.
- QUILICHINI Y., FOATA J., MARCHAND B. 2007c: Ultrastructural study of the spermatozoon of *Pronoprymna ventricosa* (Digenea, Baccigerinae), parasite of the twaite shad *Alosa fallax* Lacepede (Pisces, Teleostei). Parasitol. Res. 101: 1125–1130.
- QUILICHINI Y., FOATA J., ORSINI A., MARCHAND B. 2007a: Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon of *Crepidostomum metoecus* (Digenea: Allocreadiidae), a parasite of *Salmo trutta* (Pisces: Teleostei). J. Parasitol. 93: 458–468.
- QUILICHINI Y., FOATA J., ORSINI A., MARCHAND B. 2007b: Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Nicolla wisniewskii* (Digenea: Opecoelidae), an intestinal parasite of brown trout *Salmo trutta* (Pisces: Teleostei). J. Parasitol. 93: 469–478.
- REES F.G. 1979: The ultrastructure of the spermatozoon and spermiogenesis in *Cryptocotyle lingua* (Digenea: Heterophyidae). Int. J. Parasitol. 9: 405–419.
- REYNOLDS E.S. 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208–212.
- ROBINSON R.D., HALTON D.W. 1982: Fine structural observations on spermatogenesis in *Corrigia vitta* (Trematoda: Dicrocoeliidae). Z. Parasitenkd. 68: 53–72.
- SHARMA P.N., RAI N. 1995: Ultrastructural study on spermatogenesis in *Ganeo trigrinum*, an intestinal trematode of *Rana tigrina*. J. Helminthol. 69: 77–84.
- TERNENGO S., QUILICHINI Y., KATHARIOS P., MARCHAND B. 2009: Sperm ultrastructure of the gall bladder fluke *Anisocoelium capitellatum* (Digenea: Cryptogenitidae) a parasite of *Uranoscopus scaber* (Pisces: Uranoscopidae). Parasitol. Res. 104: 801–807.
- THIÉRY J.P. 1967: Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microsc. 6: 987–1018.
- TKACH V.V., LITTLEWOOD T.D.J., OLSON P.D., KINSELLA M., ŚWIDERSKI Z. 2003: Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). Syst. Parasitol. 56: 1–15.

Received 12 September 2011

Accepted 7 October 2011

III-6 Ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde de *Robphildolfusium fractum* (Digenea : Gyliauchenidae), parasite intestinal de *Sarpa salpa* (Pisces : Teleostei)

Résumé

La spermiogenèse chez *Robphildolfusium fractum* débute par la formation d'une zone de différenciation contenant : deux centrioles surmontés chacun d'une racine striée, un noyau, des mitochondries et un corps intercentriolaire constitué de sept bandes opaques aux électrons. Des deux centrioles émergent deux flagelles libres qui croissent orthogonalement, subissent une rotation et fusionnent de façon proximo-distale avec l'expansion cytoplasmique médiane. Avant cette fusion proximo-distale, noyau et mitochondries effectuent leurs migrations au sein de la spermatide. Finalement, la constriction de l'anneau de membranes arquées donne naissance au jeune spermatozoïde.

Le spermatozoïde mûr chez *R. fractum* présente deux axonèmes de type 9+1' des Trepaxonemata, un noyau, deux mitochondries, deux champs de microtubules corticaux parallèles, des ornements externes, des corps épineux et des granules de glycogène. De plus, l'axonème court n'atteignant pas la région nucléaire, le matériel antérieur opaque aux électrons et la morphologie des extrémités antérieure et postérieure permettent de distinguer le spermatozoïde de *R. fractum*.

Mots clés :

Robphildolfusium fractum, Gyliauchenidae, Lepocreadioidea, Digenea, Spermiogenèse, Spermatozoïde, Ultrastructure



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Comptes Rendus Biologies

www.sciencedirect.com



Development and reproduction biology/Biologie du développement et de la reproduction

Spermiogenesis and the spermatozoon ultrastructure of *Robphildolfusium fractum* (Digenea: Gyliauchenidae), an intestinal parasite of *Sarpa salpa* (Pisces: Teleostei)*Ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde de Robphildolfusium fractum (Digenea : Gyliauchenidae), parasite intestinal de Sarpa salpa (Pisces : Teleostei)*Abdoulaye J.S. Bakhoum ^{a,b}, Aminata Sène ^c, Papa Ibnou Ndiaye ^c, Cheikh Tidiane Bâ ^c, Jordi Miquel ^{a,*b}^a Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avinguda Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Spain^b Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBIO), Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal, 645, 08028 Barcelona, Spain^c Laboratory of Evolutionary Biology, Ecology and Management of Ecosystems, Faculty of Sciences and Techniques, Cheikh Anta Diop University of Dakar, Dakar, Senegal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 May 2012

Accepted after revision 13 June 2012

Available online 15 July 2012

Keywords:

Robphildolfusium fractum

Gyliauchenidae

Lepocreadioidea

Spermiogenesis

Spermatozoon

ABSTRACT

Spermiogenesis in *Robphildolfusium fractum* begins with the formation of a differentiation zone containing: two centrioles, each bearing striated rootlets, nucleus, several mitochondria and an intercentriolar body constituted by seven electron-dense layers. The two centrioles originate two free flagella growing orthogonally to the median cytoplasmic process. Later, the free flagella rotate and undergo proximodistal fusion with the median cytoplasmic process. Nuclear and mitochondrial migrations occur before this proximodistal fusion. Finally, the young spermatozoon detaches from the residual cytoplasm after the constriction of the ring of arched membranes. The spermatozoon of *R. fractum* exhibits two axonemes of different length of the 9 + '1' trepaxonematan pattern, nucleus, two mitochondria, two bundles of parallel cortical microtubules, external ornamentation of the plasma membrane, spine-like bodies and granules of glycogen. Additionally, a shorter axoneme, which does not reach the nuclear region, the presence of an electron-dense material in the anterior spermatozoon extremity and the morphologies of both spermatozoon extremities characterize the mature sperm of *R. fractum*.

© 2012 Published by Elsevier Masson SAS on behalf of Académie des sciences.

RÉSUMÉ

La spermiogenèse chez *Robphildolfusium fractum* débute par la formation d'une zone de différentiation contenant : deux centrioles surmonté chacun d'une racine striée, un noyau, des mitochondries et un corps intercentriolaire constitué des sept bandes opaques aux électrons. Des deux centrioles émergent deux flagelles libres qui croissent orthogonalement, subissent une rotation et fusionnent de façon proximo-distale avec l'expansion

Mots clés :

Robphildolfusium fractum

Gyliauchenidae

Lepocreadioidea

Spermiogenèse

Spermatozoïde

* Corresponding author.

E-mail address: jordimiquel@ub.edu (J. Miquel).

cytoplasmique médiane. Avant cette fusion proximo-distale, le noyau et les mitochondries effectuent leurs migrations au sein de la spermatide. En définitive, la constriction de l'anneau des membranes arquées donne naissance au jeune spermatozoïde. Le spermatozoïde mûr chez *R. fractum* présente deux axonèmes de type 9 + '1' des Trepaxonemata, un noyau, deux mitochondries, deux champs de microtubules corticaux parallèles, une ornementation externe, des corps épineux et granules de glycogène. De plus, l'axonème court n'atteignant pas la région nucléaire, le matériel antérieur opaque aux électrons et la morphologie des extrémités antérieures et postérieures permettent de distinguer le spermatozoïde de *R. fractum*.

© 2012 Publié par Elsevier Masson SAS pour l'Académie des sciences.

1. Introduction

During the last years, several studies have been carried out concerning the ultrastructural characters of spermiogenesis and/or the spermatozoon in digenean trematodes [1–11]. All these studies have mentioned the usefulness of ultrastructural spermatozoa characters in understanding systematic and phylogenetic relationships within the Digenea.

The present contribution represents the first study concerning the description of the ultrastructure of both spermiogenesis and mature spermatozoon of the gyliauchenid species *Robphildolfusium fractum* Paggi and Orecchia, 1963 and the fifth within the superfamily Lepocreadioidea Odhner, 1905, which includes the family Gyliauchenidae Fukui, 1929. Moreover, the present article constitutes the first description of spermiogenesis in a gyliauchenid. In addition to our contribution towards increasing the ultrastructural knowledge of digenean spermatozoa, we also compare spermatological features of *R. fractum* to those of other digeneans, particularly lepocreadioideans, in order to highlight the phylogenetic usefulness of these ultrastructural characters.

2. Materials and methods

2.1. Specimens

Live adult specimens of *R. fractum* were collected from the digestive tract of a naturally infected *Sarpa salpa* (Teleostei, Sparidae) captured off the coast of Dakar (Senegal).

2.2. Microscopy

After dissection, live digeneans were routinely processed for TEM examination. They were fixed in cold (4 °C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4 for a minimum of 2 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4, postfixed in cold (4 °C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4, dehydrated in an ethanol series and propylene oxide, and finally embedded in Spurr resin. After localization of testes and seminal vesicle in semithin sections, ultrathin sections were made using a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome, placed on copper grids and double-stained with uranyl acetate and lead citrate according to the Reynolds [12] technique. To evidence glycogen, gold grids were also

processed according to the Thiéry [13] test. They were treated in periodic acid, thiocarbohydrazide, and silver proteinate (PA-TCH-SP) as follows: 30 min in 10% PA, rinsed in milli-Q water, 24 h in TCH, rinsed in acetic solutions and milli-Q water, 30 min in 1% SP in the dark, and rinsed in milli-Q water. All ultrathin sections were examined using a JEOL 1010 transmission electron microscope operating at 80 kv.

3. Results

3.1. Spermiogenesis

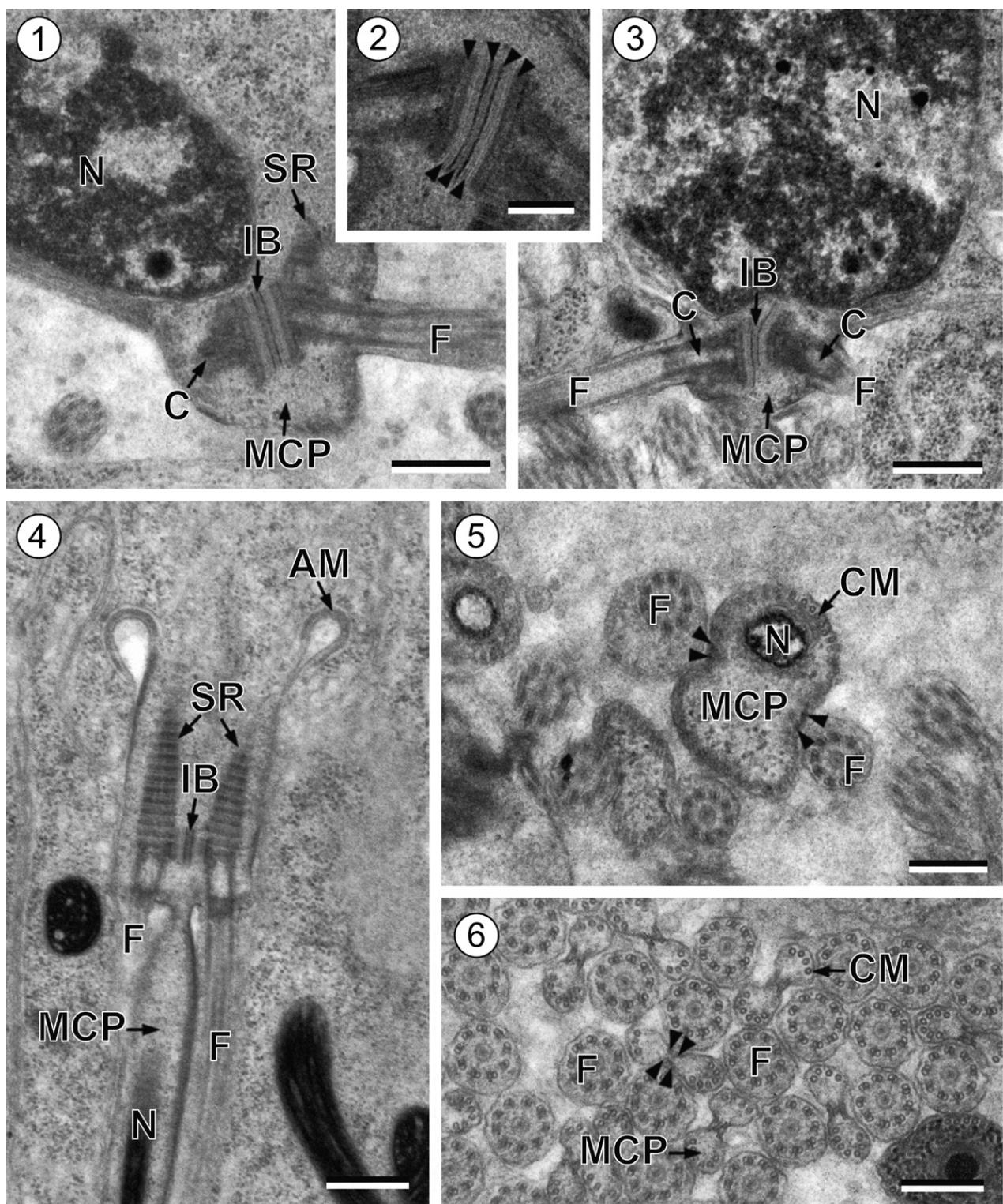
The main stages of spermiogenesis in *R. fractum* are illustrated in Figs. 1–9.

Spermiogenesis begins by the formation of the differentiation zone in which each centriole, associated with a striated rootlet, originates a free flagellum that grows orthogonally to a median cytoplasmic process (Figs. 1, 3 and 9a). Within this differentiation zone, there is also an intercentriolar body with seven electron-dense layers (Fig. 2). Later, both flagella begin their rotation to become nearly parallel to the median cytoplasmic process (Figs. 4 and 9b). In this stage cross and longitudinal sections of the proximal area of the differentiation zone show the nucleus in migration into the median cytoplasmic process (Figs. 4 and 5) while sections of the distal area show only the median cytoplasmic process (Fig. 6). Moreover, in this stage four attachment zones are already present in the median cytoplasmic process (Figs. 5 and 6). After the proximodistal fusion of the flagella with the median cytoplasmic process, the ring of arched membranes initiates its constriction (Figs. 7–9c,d). In an early stage of this progressive constriction, the striated rootlets are still present in the spermatid body and a pear shaped electron-dense material is observed as a central element of both centrioles (Figs. 7 and 9c). In the final stage of the constriction of the ring of arched membranes, the striated rootlets disappear and it is noticeable that the mitochondrion is still migrating (Figs. 8 and 9d).

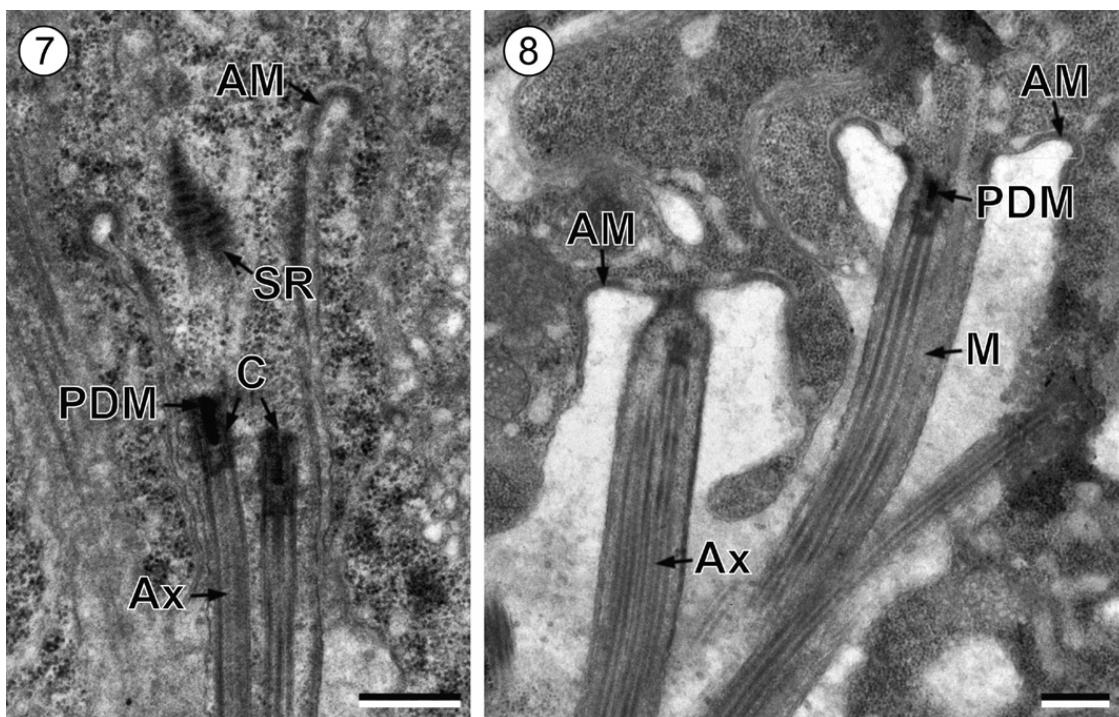
3.2. Spermatozoon

The interpretation of several cross and longitudinal sections of the mature spermatozoon of *R. fractum* allows us to establish three distinctive regions from the anterior to the posterior spermatozoon extremity (Figs. 10–30).

Region I or anterior spermatozoon extremity (Figs. 10–20 and 30I) is characterized by the presence of two



Figs. 1–6. Spermiogenesis of *Robphildolfusium fractum*. (1) Longitudinal section of a differentiation zone showing the orthogonal development of one flagellum and the intercentriolar body. (2) Detail of the intercentriolar body. (3–4) Longitudinal sections in the differentiation zone when flagella begin their rotation and become parallel to the median cytoplasmic process. Note also nuclear migration in this area. (5–6) Several cross-sections in the proximal area of the differentiation zone showing nucleus in migration and in the distal area exhibiting only median cytoplasmic processes and free flagella. Note the attachment zones in the median cytoplasmic processes (arrowheads). AM: arched membranes; C: centriole; CM: cortical microtubules; F: flagellum; IB: intercentriolar body; MCP: median cytoplasmic process; N: nucleus; SR: striated rootlets. Scale bars: 0.5 µm (Figs. 1, 3, 4), 0.2 µm (Fig. 2), 0.3 µm (Figs. 5 and 6).



Figs. 7 and 8. Spermiogenesis of *Robphildolfusium fractum*. (7) Longitudinal section before the fusion of flagella with the median cytoplasmic process in which striated rootlets are still present in the spermatid. (8) Advanced stages during the constriction of the ring of arched membranes showing mitochondrion in migration. AM: arched membranes; Ax: axoneme; C: centriole; M: mitochondrion; PDM: pear shaped electron-dense material; SR: striated rootlets. Scale bars: 0.5 μm.

axonemes of the 9 + '1' trepaxonematan pattern, a pear shaped electron-dense material at the level of centrioles, an electron-dense material at the periphery of spermatozoon, external ornamentations of the plasma membrane, parallel cortical microtubules, spine-like bodies and the first mitochondrion. This region could be subdivided in three parts:

- the anterior part of region I exhibits the anterior spermatozoon extremity with a sharp tip (Figs. 10 and 11). The two axonemes are slightly displaced longitudinally to each other (Fig. 12). In the area containing the two axonemes, there is an electron-dense material beneath the plasma membrane surrounding one of the axonemes and only two cortical microtubules (Figs. 12 and 13). It is also remarkable the presence of only two attachment zones (Figs. 12 and 13);
- in the middle part of region I the number of cortical microtubules increases and show its typical pattern into two fields, each limited by the two attachment zones (Figs. 14 and 15). This area exhibits the maximum number of cortical microtubules, six on the dorsal side and 15 on the ventral side (Figs. 14 and 15). This area also shows spine-like bodies (Figs. 15 and 16);
- the posterior part of region I is characterized by the presence of the first mitochondrion and the reduction in the number of cortical microtubules (Figs. 17–20). External ornamentations of the plasma membrane, spine-like bodies and granules of glycogen are also present (Figs. 17–20). It is interesting to note that spine-like bodies probably mark the transition from the non-ornamented to the ornamented portion of region I (Figs. 15–17).

Region II (Figs. 21–24, 29 and 30II) corresponds to a transitional region before the nuclear area. Cross-sections in this region show the two axonemes, a reduced number of parallel cortical microtubules divided into two sub-membranous bundles and granules of glycogen (Figs. 21 and 22). Note the disorganization of one axoneme before the appearance of a second mitochondrion located between the disorganized area of the axoneme and the appearance of the nucleus (Figs. 22–24).

Region III (Figs. 24–29 and 30III) represents the nuclear region and the posterior spermatozoon extremity. In its proximal area, cross-sections show the nucleus, one axoneme and granules of glycogen and cortical microtubules with progressive reduction (Figs. 24 and 25). When cortical microtubules disappear, cross-sections are characterized only by the presence of nucleus and the disorganized axoneme, which exhibits the nine doublets and the central core (Fig. 26). Additionally, during the disorganization of the second axoneme, doublets are located around the nucleus (Fig. 27). Finally, the posterior spermatozoon tip exhibits only the nucleus (Fig. 28). Glycogen was evidenced by the test of Thiéry (Fig. 29).

4. Discussion

4.1. Spermiogenesis

Concerning the superfamily Lepocreadioidea, spermiogenesis has been described in two species: the apocreadiid *Neoapocreadium chabaudi* [14] and the deropristiid *Dero- pristis inflata* [15]. Spermiogenesis in these species is

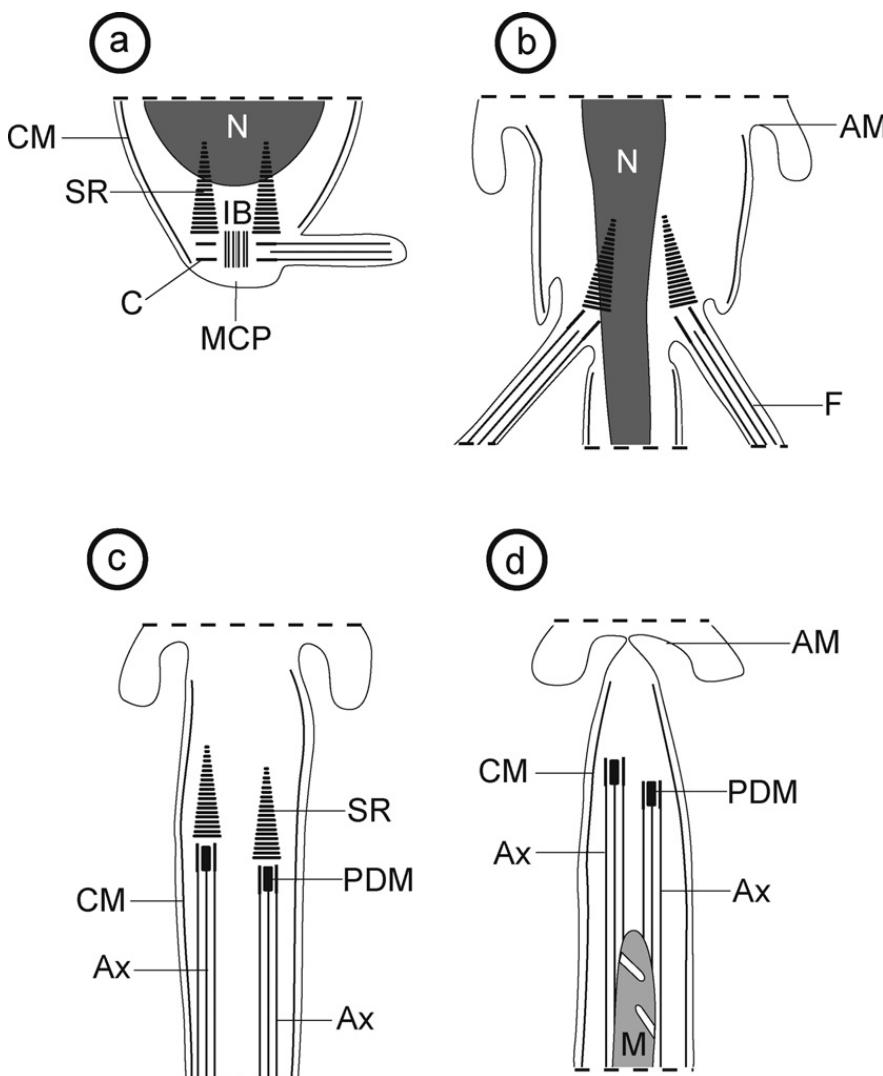


Fig. 9. a-d: schematic drawing showing the main stages of spermiogenesis of *Robphildolfusium fractum*. AM: arched membranes; Ax: axoneme; C: centriole; CM: cortical microtubules; F: flagellum; IB: intercentriolar body; M: mitochondrion; MCP: median cytoplasmic process; PDM: pear shaped electron-dense material; N: nucleus; SR: striated rootlets.

similar to that observed in *R. fractum* in the present study and in most digenetic species. It is characterized by the formation of the differentiation zone surrounded by cortical microtubules, delimited at its base by a ring of arched membranes and containing a nucleus, numerous mitochondria, and two centrioles associated with striated rootlets and with an intercentriolar body. The centrioles originate two free flagella that grow orthogonally to the median cytoplasmic process. A flagellar rotation of 90° is also reported in most digenetics [5,6,16–19], although a flagellar rotation greater than 90° is described in some species [7,20–24].

Concerning the intercentriolar body, seven electron-dense layers are observed in *R. fractum* and *N. chabaudi* [14] as described in general in Digenetics [9,10]. In the case of *D. inflata*, the intercentriolar body is constituted of six electron-dense plates [15]. Other digenetics exhibit an intercentriolar body formed by five to seven [21] or nine electron-dense layers [7].

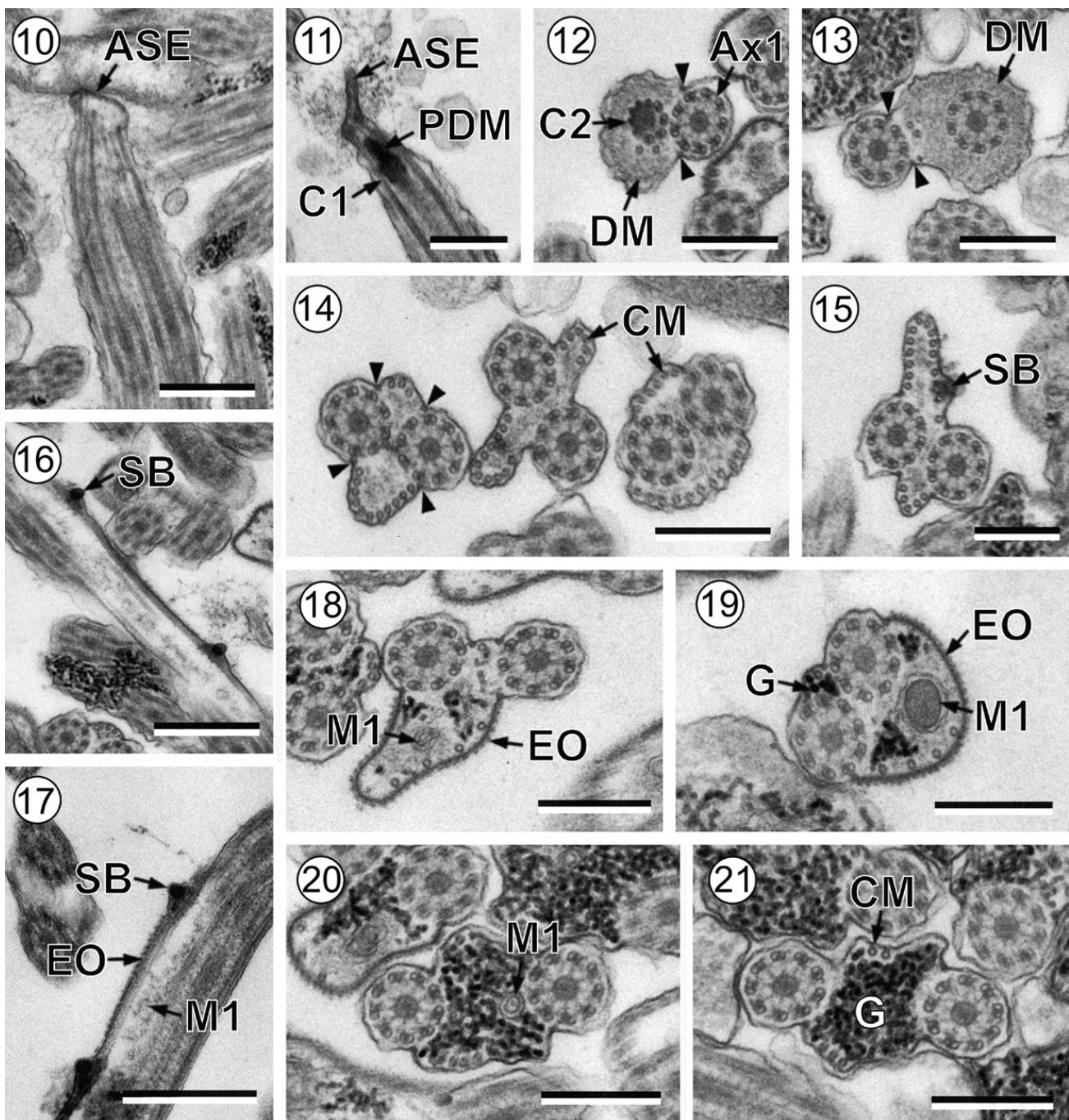
Both flagellar rotation and the number of electron-dense layers of the intercentriolar body have been

regarded to be interesting arguments in the interpretation of digenetic relationships [9,17].

4.2. Spermatozoon

Most ultrastructural characters described previously in digenetics are present in the mature spermatozoon of *R. fractum*. These are: two axonemes of the 9 + '1' pattern of the Trepaxonemata [25], two parallel bundles of cortical microtubules, two mitochondria, a nucleus and granules of glycogen. In addition to these characters, the presence/absence of an external ornamentation of the plasma membrane, a pear shaped electron-dense material, spine-like bodies, an electron-dense material beneath the plasma membrane, and the morphologies of both anterior and posterior spermatozoon extremities are also compared, particularly with the Lepocreadioidea.

An anterior spermatozoon extremity containing two axonemes very slightly longitudinally displaced to one another has been reported in *R. fractum* and in all the lepocreadioid species described until now (Table 1).

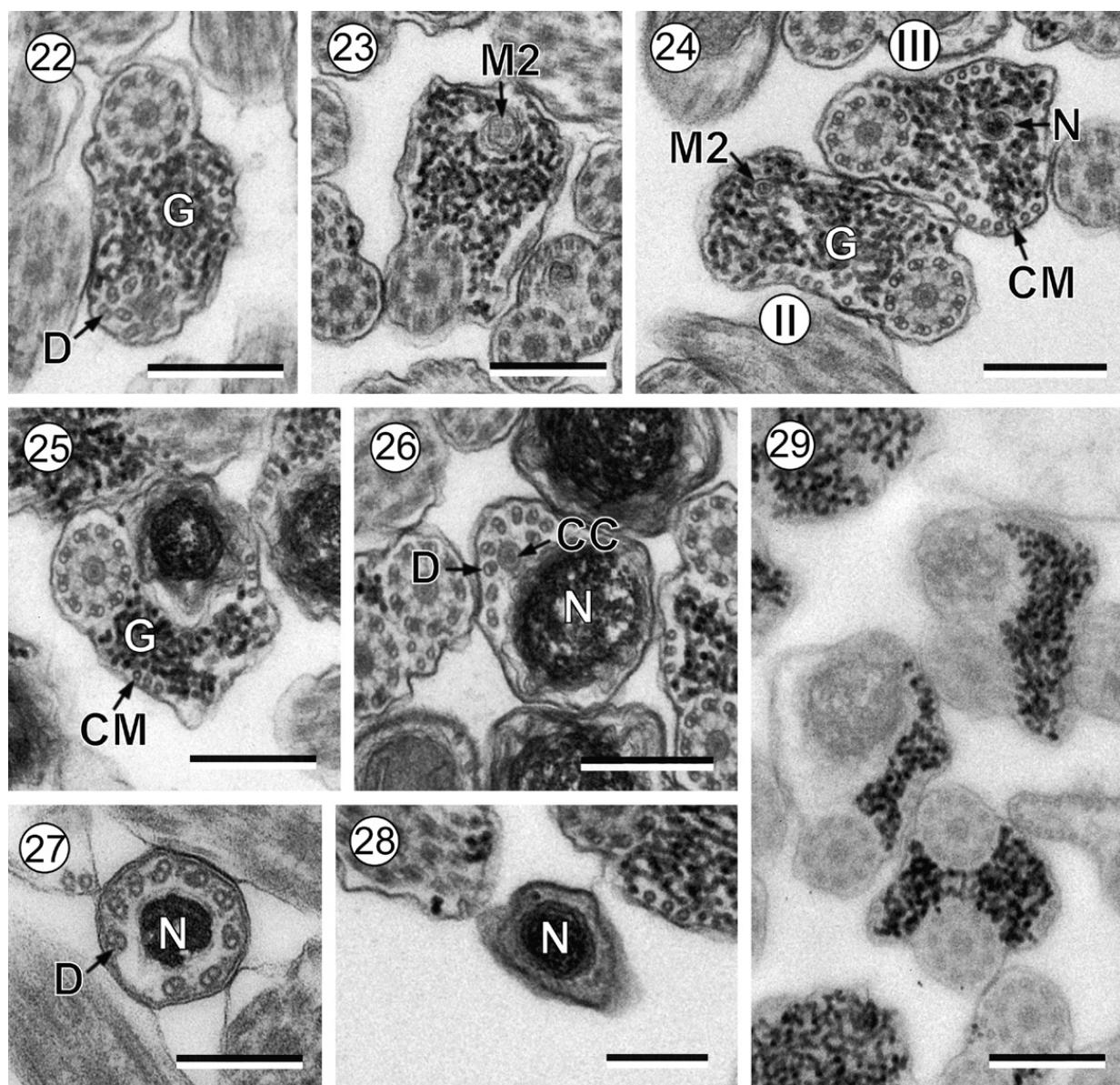


Figs. 10–21. Mature spermatozoon of *Robphildolfusium fractum*. (10–11) Longitudinal sections in the anterior spermatozoon extremity. (12–13) Cross-sections of anterior areas of region I showing the electron-dense material and only two attachment zones. (14) Cross-sections exhibiting two parallel bundles of cortical microtubules. (15–16) Cross and longitudinal section showing spine-like bodies in an area lacking external ornamentation. (17) Longitudinal section showing the presence of spine-like bodies in the transition between non-ornamented and ornamented areas. (18–20) Cross-sections of region I showing the first mitochondrion and the progressive appearance of granules of glycogen. (21) Cross-section of region II. ASE: anterior spermatozoon extremity; Ax1: first axoneme; C1: centriole of the first axoneme; C2: centriole of the second axoneme; CM: cortical microtubules; D: doublet; DM: electron-dense material; EO: external ornamentation of the plasma membrane; G: granules of glycogen; M1: first mitochondrion; PDM: pear shaped electron-dense material; SB: spine-like body; arrowhead: attachment zones. Scale bars: 0.5 µm (Figs. 10, 16, 17); 0.3 µm (Figs. 11–15, 18–21).

However, some differences were noted within the studied Lepocreadioidea. In fact, an electron-dense material appears around the second axoneme in the lepocreadiid *Holorchis micracanthum* [26] and in the gyliauchenid *Gyliauchen* sp. [27] as observed in *R. fractum* (present study). However, this electron-dense material was absent in the apocreadiid *N. chabaudi* [14] and in the deropristid

D. inflata [15]. With respect to *N. chabaudi* [14], the authors observed cortical microtubules accompanied by external ornamentation of the plasma membrane in the tip of the spermatozoon.

Concerning the pear shaped electron-dense material, it has previously been observed during spermiogenesis in *D. inflata*, *Echinostoma caproni* and *Brachycoelium salaman-*



Figs. 22–29. Mature spermatozoon of *Robphildolfusium fractum*. (22) Cross-section showing the disorganization of the first axoneme. (23) Cross-section showing the second mitochondrion. (24) Two cross-sections showing the second mitochondrion and the nucleus in the transitional area between regions II and III. (25–28) Consecutive cross-sections in the nuclear region showing reduction of cortical microtubules, disorganization of the second axoneme and posterior tip of the spermatozoon. (29) Revelation of the granules of glycogen according to the Thiéry's test. CC: central core; CM: cortical microtubules; D: doublet; G: granules of glycogen; M2: second mitochondrion; N: nucleus. Scale bars: 0.3 µm.

dreae [15,28,29]. However, the present study constitutes the first description of this character in the mature spermatozoon.

An association of external ornamentation and spine-like bodies was also observed in the anterior area of the spermatozoon in most digenleans [4,6,10,30,31]. However, there are other digenleans presenting spermatozoa with external ornamentation but lacking spine-like bodies. This is the case of the faustulid *Pronoprymna ventricosa* [32], the phaneropsolid *Postorchigenes gymnesicus* [33], or the zoogonid *Diphtherostomum brusinae* [34]. Moreover, in several older studies previous to the description of spine-like bodies [4], these structures could have been misinterpreted, considered as artefacts or omitted, as occurred in *Haematoloechus* sp. [35] and *Paragonimus*

ohirai [36]. Within the Lepocreadioidea, spine-like bodies are absent in the mature sperm of *D. inflata* [15] and *H. micracanthum* [26] (Table 1), while in *N. chabaudi* [14] and *Gyliauchen* sp. [27], they are present but not in the ornamented area of the spermatozoon. Concerning *R. fractum* (present study), spine-like bodies have been observed in both areas. Thus, these structures mark the transition between ornamented and not ornamented area. The particular disposition of spine-like bodies in relation to the ornamented area needs more attention in phylogenetic analyses within the Lepocreadioidea.

Variability of the number of mitochondria is observed within the digenleans in general and in the studied lepocreadioid species in particular (Table 1). Although the determination of the number of mitochondria depends

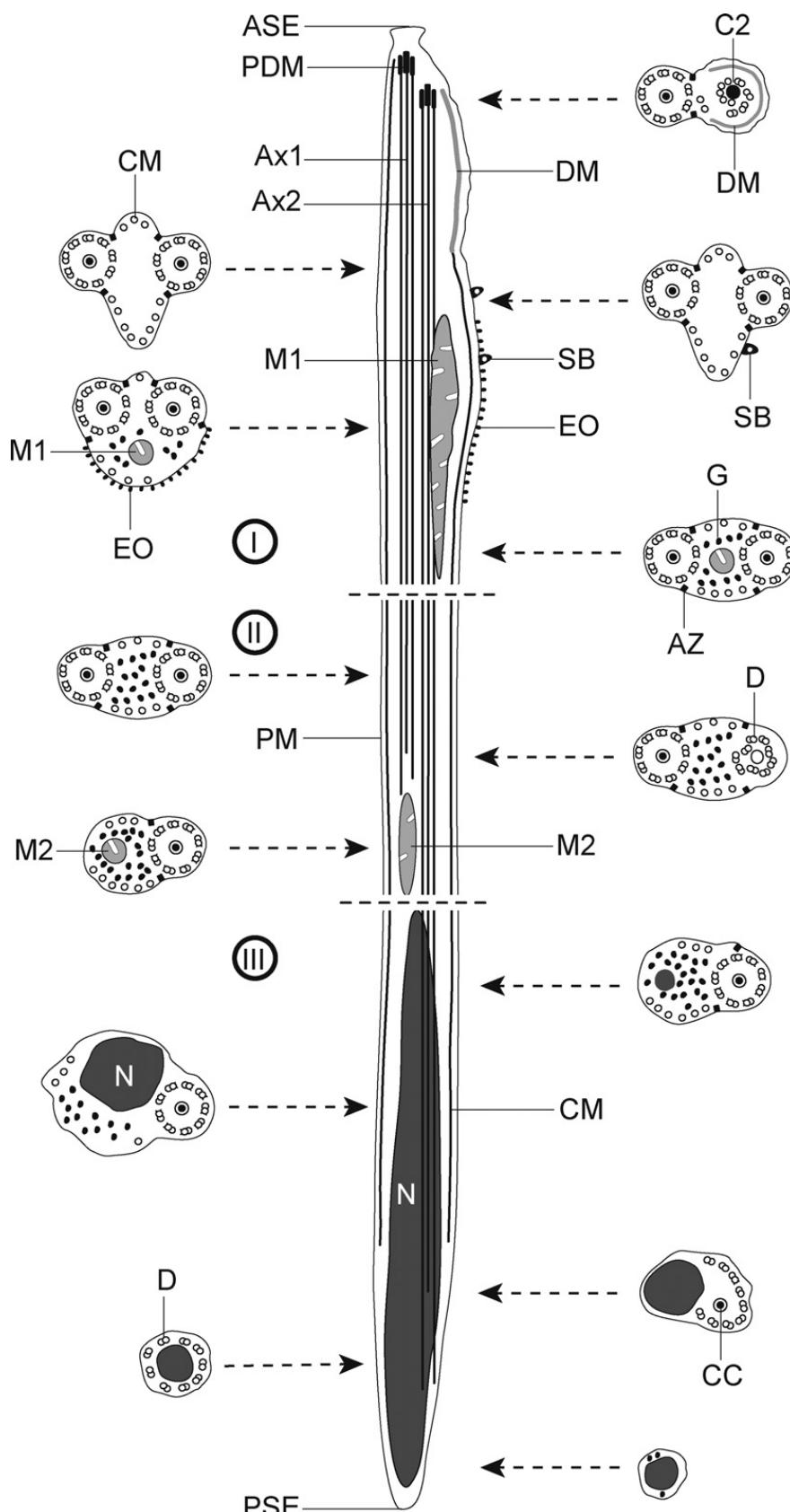


Fig. 30. I–III: schematic drawing of the mature spermatozoon of *Robphildolfusium fractum*. ASE: anterior spermatozoon extremity; Ax1: first axoneme; Ax2: second axoneme; AZ: attachment zones; C2: centriole of the second axoneme; CC: central core; CM: cortical microtubules; D: doublet; DM: electron-dense material; EO: external ornamentation of the plasma membrane; M1: first mitochondrion; M2: second mitochondrion; N: nucleus; PDM: pear shaped electron-dense material; PM: plasma membrane; PSE: posterior spermatozoon extremity; SB: spine-like body.

Table 1

Ultrastructural characters of spermiogenesis and the spermatozoon in the Lepocreadioidea.

| Family and species [reference] | Spermiogenesis | | Spermatozoon | | | | | |
|---|----------------|-----|----------------|----|----|----|---|------|
| | IB | FR | ASE | DM | EO | SB | M | PSE |
| Apocreadiidae | | | | | | | | |
| <i>Neoapocreadium chabaudi</i> [14] | 7 | 90° | 1 Ax + CM + EO | – | + | + | 2 | N |
| Deropristidae | | | | | | | | |
| <i>Deropristis inflata</i> [15] | 6 | 90° | 1 Ax | – | + | – | 2 | 1 Ax |
| Gyliauchenidae | | | | | | | | |
| <i>Gyliauchen</i> sp. [27] | N/A | N/A | 1 Ax | + | + | + | 1 | 1 Ax |
| <i>Robphildolfusium fractum</i> [present study] | 7 | 90° | 1 Ax | + | + | + | 2 | N |
| Lepocreadiidae | | | | | | | | |
| <i>Holorchis micracanthum</i> [26] | N/A | N/A | 1 Ax | + | + | – | 1 | 1 Ax |

ASE: anterior spermatozoon extremity; Ax: axoneme; CM: cortical microtubules; DM: electron-dense material; EO: external ornamentation of the plasma membrane; FR: flagellar rotation; IB: number of plates of the intercentriolar body; M: number of mitochondria; N: nucleus; N/A: non-accessible data; PSE: posterior spermatozoon extremity; SB: spine-like body; +/-: presence/absence of character.

on each author's considerations [11,17,37], at least one mitochondrion is observed in all digenetic species studied until now. This criterion would be of great interest in phylogenetic interpretations within the Platyhelminthes considering that the absence of mitochondrion is a recognized synapomorphy for the Eucestoda [10,27].

The posterior spermatozoon extremity of *R. fractum* containing the nucleus would correspond to a type 2 posterior spermatozoon extremity [38], according to the terminal character in the posterior tip. This morphology of posterior spermatozoon extremity has been described in *N. chabaudi* [14] and in most digenetic spermatozoa [10]. In the remaining Lepocreadioidea studied until now, the posterior spermatozoon extremity contains one axoneme (Table 1). Additionally to these morphologies, a posterior spermatozoon extremity ended by cortical microtubules has been reported in other digenetics, particularly those belonging to the family Opecoelidae [4,5,8,23,30]. Moreover, a posterior spermatozoon extremity containing a mitochondrion has been described recently in the lecithasterid *Aponurus laguncula* [38]. All these morphologies concerning the posterior spermatozoon extremity emphasise the usefulness of this criterion when establishing spermatozoon models within the Digenea.

The spermatozoon of *R. fractum* possesses a short axoneme that does not reach the nuclear region. Indeed, several cross-sections in the nuclear region show only an axoneme accompanied by the nucleus and cortical microtubules. This fact could distinguish the mature spermatozoon of *R. fractum* from those of the remaining lepocreadioids and in particular from the sperm cell of *Gyliauchen* sp., which belongs to the same family [27].

Comparing molecular and ultrastructural results, some congruencies could be supported. Indeed, the Gyliauchenidae are regarded to be close to the lepocreadiids and are nested in a clade named Lepocreadiata in a molecular study [39], as also adopted by Bray [40], who placed gyliauchenids in the Lepocreadioidea. The genus *Robphildolfusium* has been established as a gyliauchenid although its status is problematic [41]. These viewpoints could be supported by spermatological characters observed in some species belonging to the Lepocreadioidea. In fact, many

similarities are observed between the spermatological characters of the two gyliauchenids and those of other lepocreadioid species, especially the lepocreadiid *H. micracanthum* [26]. This fact would allow us to support the inclusion of the Gyliauchenidae in the superfamily Lepocreadioidea. Concerning the problematic genus *Robphildolfusium* [41], similarities between the mature spermatozoon of *R. fractum* and *Gyliauchen* sp. could be valuable arguments to consider *R. fractum* as a gyliauchenid. However, more ultrastructural studies are required in the remaining gyliauchenid species and also in the other unexplored lepocreadioid families considering that, out of the ten families that compose this superfamily [40], only four have been studied until now.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgements

Authors wish to thank Núria Cortadellas and Almudena García from the "Unitat de Microscòpia, Facultat de Medicina, Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB)" for their support in the preparation of samples. This study was partly supported by the PCI project (no A/030039/10) of the "Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID)". A.J.S. Bakhoum benefits from a MAEC-AECID doctoral grant (2010-11, no 0000538055).

References

- [1] J.-L. Justine, Spermatozoal ultrastructure and phylogeny of the parasitic Platyhelminthes, Mem. Mus. Natl. Hist. Nat. 166 (1995) 37–54.
- [2] J.-L. Justine, Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes, in: D.T.J. Littlewood, R.A. Bray (Eds.), Interrelationships of the Platyhelminthes, Taylor and Francis, London, 2001, pp. 231–238.
- [3] J.-L. Justine, Ultrastructure des spermatozoïdes et phylogénie des Neodermata, in: C. Combes, J. Jourdane (Eds.), Taxonomie, écologie et évolution des métazoaires parasites, PUP, Perpignan, 2003, pp. 359–380.

- [4] J. Miquel, C. Nourrisson, B. Marchand, Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Opecoeloides furcatus* (Trematoda, Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mullus barbatus* (Pisces, Teleostei), *Parasitol. Res.* 86 (2000) 301–310.
- [5] P.I. Ndiaye, J. Miquel, C. Feliu, B. Marchand, Ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa of *Notocotylus neyrai* González Castro, 1945 (Digenea, Notocotylidae), intestinal parasite of *Microtus agrestis* (Rodentia: Arvicolidae) in Spain, *Invert. Reprod. Dev.* 43 (2003) 105–115.
- [6] C. Levron, S. Ternengo, B. Marchand, Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Poracanthium furcatum* (Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mullus surmuletus* (Pisces, Teleostei), *Acta Parasitol.* 49 (2004) 190–200.
- [7] C. Levron, S. Ternengo, B. Marchand, Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Monorchis parvus* Looss, 1902 (Digenea, Monorchiidae), a parasite of *Diplodus annularis* (Pisces, Teleostei), *Parasitol. Res.* 93 (2004) 102–110.
- [8] Y. Quilichini, J. Foata, J.-L. Justine, R.A. Bray, B. Marchand, Ultrastructural study of the spermatozoon of *Heterolebes maculosus* (Digenea, Opistholebetidae), a parasite of the porcupinefish *Diodon hystrix* (Pisces, Teleostei), *Parasitol. Int.* 59 (2010) 427–434.
- [9] A.J.S. Bakhoum, C.T. Bâ, V.V. Shimalov, J. Torres, J. Miquel, Spermatozoal characters of the digenetic *Rubenstrema exasperatum* (Rudolphi, 1819) (Plagiorchioidea, Omphalometridae), *Parasitol. Res.* 108 (2011) 1283–1293.
- [10] A.J.S. Bakhoum, J. Torres, V.V. Shimalov, C.T. Bâ, J. Miquel, Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) (Paramphistomoidea, Diplodiscidae), an intestinal fluke of the pool frog *Rana lessonae* (Amphibia, Anura), *Parasitol. Int.* 60 (2011) 64–74.
- [11] A.J.S. Bakhoum, C. Feliu, C.T. Bâ, J. Miquel, Spermiogenesis and spermatozoon of the liver fluke *Mediogonimus jourdanei* (Microphalloidea: Prosthogonimidae), a parasite of *Myodes glareolus* (Rodentia: Cricetidae), *Folia Parasitol.* 59 (2012) 32–42.
- [12] E.S. Reynolds, The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, *J. Cell Biol.* 17 (1963) 208–212.
- [13] J.P. Thiéry, Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique, *J. Microsc.* 6 (1967) 987–1018.
- [14] H. Kacem, A.J.S. Bakhoum, L. Neifar, J. Miquel, Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the digenetic *Neoapocreadium chabaudi* (Apocreadiidae), a parasite of *Balistes capriscus* (Pisces, Teleostei), *Parasitol. Int.* 59 (2010) 358–366.
- [15] J. Foata, Y. Quilichini, B. Marchand, Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Deropristis inflata* Molin, 1859 (Digenea, Deropristidae), a parasite of *Anguilla anguilla*, *Parasitol. Res.* 101 (2007) 843–852.
- [16] P.I. Ndiaye, J. Miquel, C.T. Bâ, B. Marchand, Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of the liver fluke *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856 (Digenea, Fasciolidae), a parasite of cattle in Senegal, *J. Parasitol.* 90 (2004) 30–40.
- [17] J. Miquel, C. Fournier-Chambrillon, P. Fournier, J. Torres, Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the cranial digenetic *Troglotrema acutum* (Leuckart, 1842), *J. Parasitol.* 92 (2006) 441–453.
- [18] M.T. Seck, B. Marchand, C.T. Bâ, Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Paramphistomum microboithrium* (Fischöeder 1901; Digenea, Paramphistomidae), a parasite of *Bos taurus* in Senegal, *Parasitol. Res.* 101 (2007) 259–268.
- [19] M.T. Seck, B. Marchand, C.T. Bâ, Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Cotylophoron cotylophorum* (Trematoda, Digenea, Paramphistomidae), a parasite of *Bos taurus* in Senegal, *Parasitol. Res.* 103 (2008) 157–166.
- [20] P.I. Ndiaye, J. Miquel, R. Fons, B. Marchand, Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the liver fluke *Fasciola hepatica* L., 1758 (Digenea, Fasciolidae): scanning and transmission electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry, *Acta Parasitol.* 48 (2003) 182–194.
- [21] C. Levron, S. Ternengo, B. Marchand, Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Helicometra fasciata* (Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Labrus merula* (Pisces, Teleostei), *Acta Parasitol.* 48 (2003) 255–264.
- [22] Y. Quilichini, J. Foata, A. Orsini, B. Marchand, Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon of *Crepidostomum metoecus* (Digenea: Allocreadiidae), a parasite of *Salmo trutta* (Pisces: Teleostei), *J. Parasitol.* 93 (2007) 458–468.
- [23] Y. Quilichini, J. Foata, A. Orsini, B. Marchand, Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Nicolla wisniewskii* (Digenea: Opecoelidae), an intestinal parasite of brown trout *Salmo trutta* (Pisces: Teleostei), *J. Parasitol.* 93 (2007) 469–478.
- [24] S. Agostini, J. Miquel, P.I. Ndiaye, B. Marchand, *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 (Digenea, Dicrocoeliidae): spermiogenesis, mature spermatozoon and ultrastructural comparative study, *Parasitol. Res.* 96 (2005) 38–48.
- [25] U. Ehlers, Phylogenetisches System der Plathelminthes, *Verh. naturwiss Ver. Hamburg (NF)* 27 (1984) 291–294.
- [26] C.T. Bâ, P.I. Ndiaye, A. Dione, Y. Quilichini, B. Marchand, Ultrastructure of the spermatozoon of *Holorchis micracanthum* (Digenea: Lepocreadiidae), an intestinal parasite of *Plectorchinhus mediterraneus* (Pisces, Teleostei) in Senegal, *Parasitol. Res.* 109 (2011) 1099–1106.
- [27] Y. Quilichini, J. Foata, J.-L. Justine, R.A. Bray, B. Marchand, Spermatozoon ultrastructure of *Gyliauchen* sp. (Digenea: Gyliauchenidae), an intestinal parasite of *Siganus fuscescens* (Pisces: Teleostei), *Biol. Bull.* 221 (2011) 197–205.
- [28] C. Iomini, J.-L. Justine, Spermiogenesis and spermatozoon of *Echinostoma caproni* (Platyhelminthes, Digenea): transmission and scanning electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry, *Tissue Cell* 29 (1997) 107–118.
- [29] A.J.S. Bakhoum, A. Ribas, C. Eira, C.T. Bâ, J. Miquel, *Brachycoelium salamandrae* (Frölich, 1789) (Digenea: Brachycoeliidae): ultrastructural study of spermiogenesis and the mature spermatozoon, *Zool. Anz.* (2012) (in press) <http://www.sciencedirect.com/science/journal/aip/00445231>.
- [30] Y. Quilichini, J. Foata, B. Marchand, Ultrastructural study of the spermatozoon of *Nicolla testibliquum* (Digenea, Opecoelidae) parasite of brown trout *Salmo trutta* (Pisces, Teleostei), *Parasitol. Res.* 101 (2007) 1295–1301.
- [31] P.I. Ndiaye, Y. Quilichini, A. Sène, C.T. Bâ, B. Marchand, Ultrastructure of the spermatozoon of the digenetic *Cricocephalus albus* (Kuhl & van Hasselt, 1822) Looss, 1899 (Platyhelminthes, Pseudocephaloidea, Pseudocephalidae), parasite of “the hawksbill sea turtle” *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) in Senegal, *Zool. Anz.* 250 (2011) 215–222.
- [32] Y. Quilichini, J. Foata, B. Marchand, Ultrastructural study of the spermatozoon of *Pronoprymna ventricosa* (Digenea, Baccigerinae), parasite of the twaite shad *Alosa fallax* Lacepede (Pisces, Teleostei), *Parasitol. Res.* 101 (2007) 1125–1130.
- [33] M. Gracenea, J.R. Ferrer, O. González-Moreno, M. Trullols, Ultrastructural study of spermatogenesis and spermatozoon in *Postorchigenes gymnuscis* (Trematoda, Lecithodendriidae), *J. Morphol.* 234 (1997) 223–232.
- [34] C. Levron, S. Ternengo, B. Marchand, Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Diphterostomum brusinae* (Digenea, Zoogonidae), a parasite of *Diplodus annularis* (Pisces, Teleostei), *Parasitol. Res.* 94 (2004) 147–154.
- [35] J.-L. Justine, X. Mattei, Réinvestigation de l'ultrastructure du spermatozoïde d'*Haematoloechus* (Trematoda: Haematoloechidae), *J. Ultrastruct. Res.* 81 (1982) 322–332.
- [36] Y. Oriolo, Ultrastructure of spermatozoa of the lung fluke, *Paragonimus ohirai* (Trematoda: Tropothrematidae), in the seminal receptacle, *J. Morphol.* 196 (1988) 333–343.
- [37] P.R. Burton, Fine structure of the reproductive system of a frog lung fluke. III. The spermatozoon and its differentiation, *J. Parasitol.* 58 (1972) 68–83.
- [38] Y. Quilichini, J. Foata, J.-L. Justine, R.A. Bray, B. Marchand, Spermatozoon ultrastructure of *Aponurus laguncula* (Digenea: Lecithasteridae), a parasite of *Aluterus monoceros* (Pisces, Teleostei), *Parasitol. Int.* 59 (2010) 22–28.
- [39] P.D. Olson, T.H. Cribb, V.V. Tkach, R.A. Bray, D.T.J. Littlewood, Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda), *Int. J. Parasitol.* 33 (2003) 733–755.
- [40] R.A. Bray, Superfamily Lepocreadioidea Odhner, 1905, in: A. Jones, R.A. Bray, D.I. Gibson (Eds.), Keys to the Trematoda, vol. 2, CAB International and Natural History Museum, London, 2005, pp. 541–543.
- [41] K.A. Hall, T.H. Cribb, Family Gyliauchenidae Fukui, 1929, in: A. Jones, R.A. Bray, D.I. Gibson (Eds.), Keys to the Trematoda, vol. 2, CAB International and Natural History Museum, London, 2005, pp. 665–678.

III-7 Caractères spermatologiques du digène *Rubenstrema exasperatum* (Rudolphi, 1819) (Plagiorchioidea : Omphalometridae)

Résumé

Nous présentons dans cette étude la première description de l'ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde de *Rubentrema exasperatum* (Omphalometridae), parasite intestinal de *Sorex araneus* (Soricidae).

La spermiogenèse commence par la formation d'une zone de différentiation, délimitée à sa base par l'anneau de membranes arquées et bordée de microtubules corticaux. Cette zone contient deux centrioles associés à des racines striées et un corps intercentriolaire. Elle contient également le noyau et de nombreuses mitochondries. Le corps intercentriolaire est constitué de sept bandes opaques aux électrons. Les deux centrioles donnent naissance à deux flagelles libres qui croissent orthogonalement à l'expansion cytoplasmique médiane. De plus, la rotation flagellaire est suivie de la fusion proximo-distale des flagelles avec l'expansion médiane, où le noyau et les mitochondries effectuent leurs migrations. Finalement, la constriction de l'anneau de membranes arquées donne naissance au jeune spermatozoïde.

Le spermatozoïde de *R. exasperatum* exhibe plusieurs des caractères ultrastructuraux décrits dans le spermatozoïde des Digènes tels que, deux axonèmes de type 9+‘1’, mitochondries, deux rangées de microtubules corticaux parallèles, noyau et granules de glycogène. En plus, des ornementations externes de la membrane plasmique et des corps épineux sont également observés sur le spermatozoïde.

Dans cette étude, nous apportons des données spermatologiques d'une famille jusqu'ici inexplorée et comparons nos données avec celles existantes chez les Digènes, dans le but d'évaluer l'utilisation de plusieurs de ces caractères proposés comme outils phylogénétiques.

Mots clés :

Rubenstrema exasperatum, Omphalometridae, Plagiorchioidea, Digenea, Spermiogenèse, Spermatozoïde, Ultrastructure

Spermatological characters of the digenean *Rubenstrema exasperatum* (Rudolphi, 1819) (Plagiorchioidea, Omphalometridae)

Abdoulaye J. S. Bakhoum · Cheikh Tidiane Bâ ·
Vladimir V. Shimalov · Jordi Torres · Jordi Miquel

Received: 21 October 2010 / Accepted: 17 November 2010 / Published online: 3 December 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract We present the first ultrastructural description of spermiogenesis and of the spermatozoon of *Rubenstrema exasperatum* (Omphalometridae), an intestinal parasite of *Sorex araneus* (Soricidae). Spermiogenesis begins with the formation of the differentiation zone delimited at the base by the ring of the arched membranes and bordered by cortical microtubules. This area contains two centrioles associated with striated rootlets and with an intercentriolar body. It also contains the nucleus and numerous mitochondria. The intercentriolar body is made up of seven electron-dense layers. The two centrioles give rise to two free flagella that grow orthogonally to the median cytoplasmic process. Additionally, flagellar rotation is followed by the proximodistal fusion of the flagella with the median

cytoplasmic process, while the nucleus and mitochondria migrate along the spermatid. The constriction of the ring of arched membranes gives rise to the young spermatozoon. The mature spermatozoon of *R. exasperatum* shows several ultrastructural characters found in digenean spermatozoa such as two axonemes, mitochondrion, two bundles of parallel cortical microtubules, nucleus, and granules of glycogen. External ornamentation of the plasma membrane and spinelike bodies are also present in the spermatozoon of this species. In the present study, we produced additional spermatological data concerning a previously unexplored family, and we also compare our data to the existent ultrastructural descriptions within the Digenea in order to assess the use of several characters proposed as phylogenetic tools.

A. J. S. Bakhoum · J. Torres · J. Miquel
Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia
i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia,
Universitat de Barcelona,
Av. Joan XXIII, sn,
08028, Barcelona, Spain

A. J. S. Bakhoum · J. Torres · J. Miquel (✉)
Institut de Recerca de la Biodiversitat, Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona,
Av. Diagonal, 645,
08028, Barcelona, Spain
e-mail: jordimiquel@ub.edu

C. T. Bâ
Laboratoire de Parasitologie-Helminthologie,
Département de Biologie Animale,
Faculté des Sciences et Techniques,
Université Cheikh Anta Diop de Dakar,
Dakar, Senegal

V. V. Shimalov
Brest State University,
224665, Brest, Belarus

Introduction

The phylogenetic relationships and systematic position of the digeneans belonging to the family Omphalometridae have always been controversial. Several authors have different opinions concerning the phylogenetic affinities within this group, mostly due to their complex taxonomic history. To date, the systematic situation of this group has not been substantially clarified (Tkach 2008). Nonetheless, the erection of this group to the family level is widely accepted (see Odening 1959; Skrjabin 1966; Tkach et al. 2001). According to the most recent study, the Omphalometridae are a small group of plagiorchioid digenleans that includes several genera found in insectivores, being morphologically characterized by the uterus that never extends into the post-testicular region of the body and generally not beyond the anterior testis (Tkach 2008).

The ultrastructural characters of spermatogenesis and spermatozoa have been shown to be useful criteria for

understanding the phylogenetic relationships within the Platyhelminthes (Ehlers 1984; Bâ and Marchand 1995; Justine 1998, 2001, 2003; Levron et al. 2010) at several taxonomic levels. The Omphalometridae belong to the Trematoda, which is considered a monophyletic group, with the Aspidogastrea as a sister group of the Digenea. However, the relationships within this class at superfamily and at family level, in particular, are not well resolved. The great diversity of the Digenea combined with the lack of information concerning several families emphasize the need for more descriptions in order to corroborate the homogeneity or heterogeneity of their ultrastructural characters.

In the present work, we describe the spermiogenesis and the main ultrastructural characters and organization of the mature spermatozoon of *R. exasperatum*, which represents the first data set concerning the family Omphalometridae. We also compare our results with the available spermatozoal data obtained for other Digenea species.

Materials and methods

Live specimens of *R. exasperatum* (Rudolphi 1819) were collected on August 2008 from the stomach of a naturally infected female common shrew, *Sorex araneus*, captured in the region of Brest (southwest Belarus). The living specimens were placed in a 0.9% NaCl solution. After dissection, specimens were routinely processed for TEM examination. They were fixed in cold (4°C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2 for a minimum of 2 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, postfixed in cold (4°C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, dehydrated in an ethanol series and propylene oxide, and finally embedded in Spurr resin. After locating the level of section in semi-thin sections, ultrathin sections were made using a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome placed on copper grids and double-stained with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds (1963). Gold grids were also made for the Thiéry (1967) test to reveal granules of glycogen. All ultrathin sections were examined using a JEOL 1010 transmission electron microscope operating at 75 kv at the “Serveis Científics i Tècnics” of the University of de Barcelona (Spain).

Results

Spermiogenesis

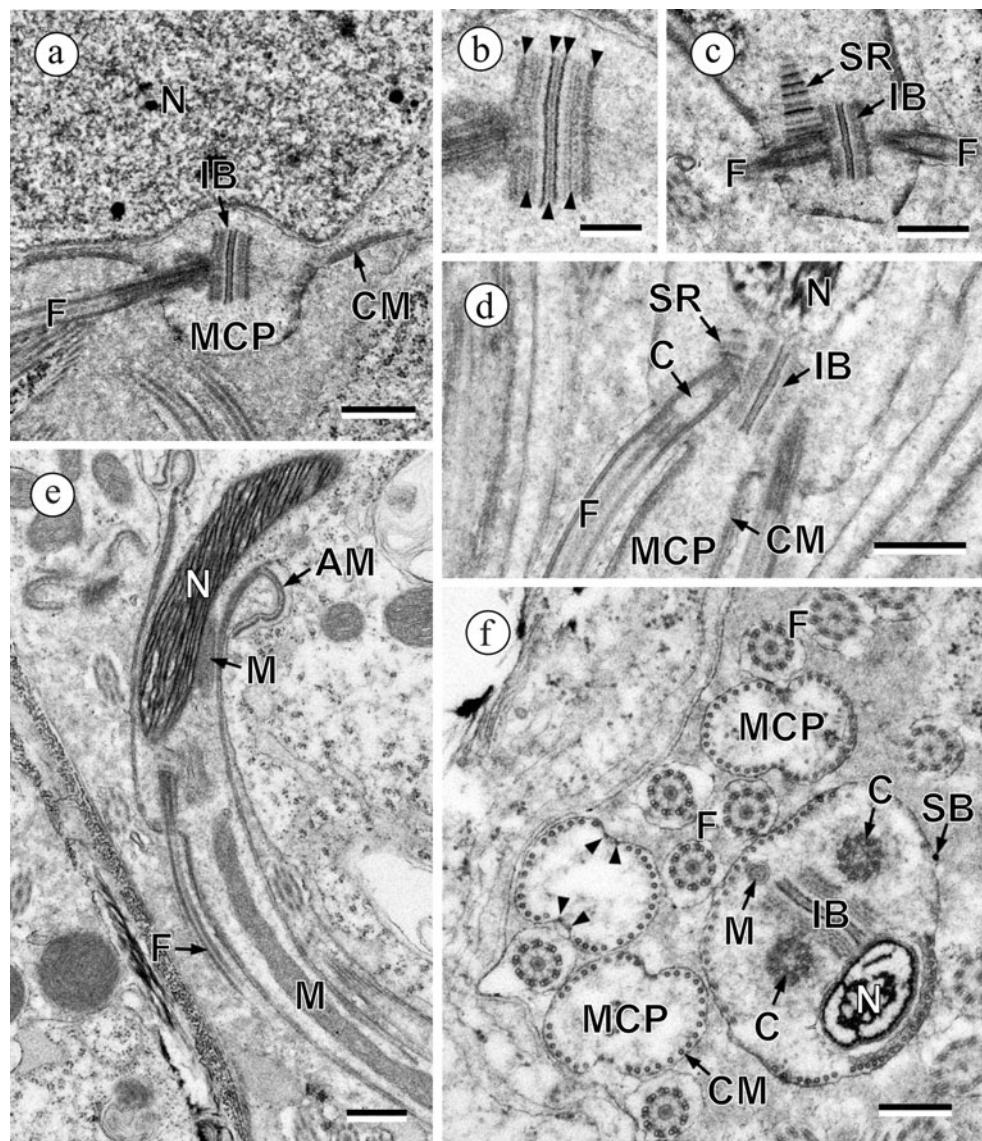
The observation of numerous ultrathin sections from portions containing testis allowed us to describe the spermiogenesis process in *R. exasperatum* (Figs. 1, 2, and

3). It begins with the formation of a differentiation zone, delimited by a ring of arched membranes, and bordered by cortical microtubules. This area is also characterized by the presence of a nucleus, several mitochondria, two centrioles of the 9+“1” trepaxonematan pattern associated with a striated rootlet and an intercentriolar body (Figs. 1a–c and 3a). The intercentriolar body exhibits seven electron-dense layers with a fine central band and three external electron-dense layers on both sides (Fig. 1b). In addition, the differentiation zone is bordered by cortical microtubules (Figs. 1a, c and 3a). During the spermiogenesis, each centriole gives rise to a free flagellum that undergoes a rotation of 90° to become parallel to the median cytoplasmic process (Figs. 1a, c, d, and 3a, b). This area shows two flagella, a cytoplasm bordered by cortical microtubules, and attachment zones (i.e., points that indicate the area where the fusion will occur; Fig. 1f). However, before the fusion of the flagella, the nucleus migrates into the median cytoplasmic process accompanied by mitochondria (Figs. 1e and 3b). In the proximal area of the spermatid, when the nucleus and mitochondria initiate their elongation toward the median cytoplasmic process, cortical microtubules are already distributed into two bundles, a dorsal one (near the nucleus) and a ventral one (near the mitochondrion; Fig. 1f). Additionally, it is interesting to note that several cross- and longitudinal sections along the differentiation zone of different cells reveal that the mitochondrial migration occurs before the nuclear migration (Figs. 1e, 2a, and 3b, c). In the differentiation zone, spinelike bodies are observed in the proximal areas of spermatid (Figs. 1f and 3b), more distally before the fusion of the flagella with the median cytoplasmic process (Figs. 2a and 3b) and also when both flagella have already fused (Figs. 2c and 3d). After the proximodistal fusion of the flagella with the median cytoplasmic process and in the mitochondrial area of the spermatid, it is possible to observe the external ornamentation of the plasma membrane (Fig. 2c). The end of spermiogenesis is marked by a constriction of the arched membranes until the old spermatid detaches itself from the residual cytoplasm. In the initial stage of this constriction, striated rootlets are still present, and it is possible to observe the migrating nucleus (Fig. 2d). Finally, both longitudinal and cross-sections of old spermatids show the presence of two axonemes and the disappearance of the striated rootlets in the future anterior extremity of the spermatozoon (Fig. 2e, f).

Spermatozoon

Several ultrathin sections from the seminal vesicle allow us to distinguish three different ultrastructural regions from the anterior to the posterior spermatozoon extremity of *R. exasperatum* (Figs. 4, 5, and 6).

Fig. 1 TEM micrographs of spermiogenesis of *R. exasperatum*. **a** Differentiation zone showing one of the flagella (*F*) at the beginning of its rotation. *CM* cortical microtubules, *IB* intercentriolar body, *MCP* median cytoplasmic process, *N* nucleus. Bar 0.5 μm. **b** Detail of the intercentriolar body. Arrowheads indicate the electron-dense layers. Bar 0.2 μm. **c** Differentiation zone showing the two flagella (*F*). Bar 0.5 μm. **d** Longitudinal section of a differentiation zone with two flagella (*F*) after flagellar rotation showing their parallel disposition to the median cytoplasmic process (*MCP*). *C* centriole, *CM* cortical microtubules, *IB* intercentriolar body, *N* nucleus, *SR* striated rootlets. Bar 0.5 μm. **e** Longitudinal section of a differentiation zone showing the nuclear and mitochondrial migrations. *AM* arched membrane, *F* flagellum, *M* mitochondrion, *N* nucleus. Bar 0.5 μm. **f** Several cross-sections of differentiation zones at different levels. Arrowheads show the attachment zones. *C* centriole, *CM* cortical microtubules, *F* flagellum, *IB* intercentriolar body, *M* mitochondrion, *MCP* median cytoplasmic process, *N* nucleus, *SB* spinelike bodies. Bar 0.3 μm



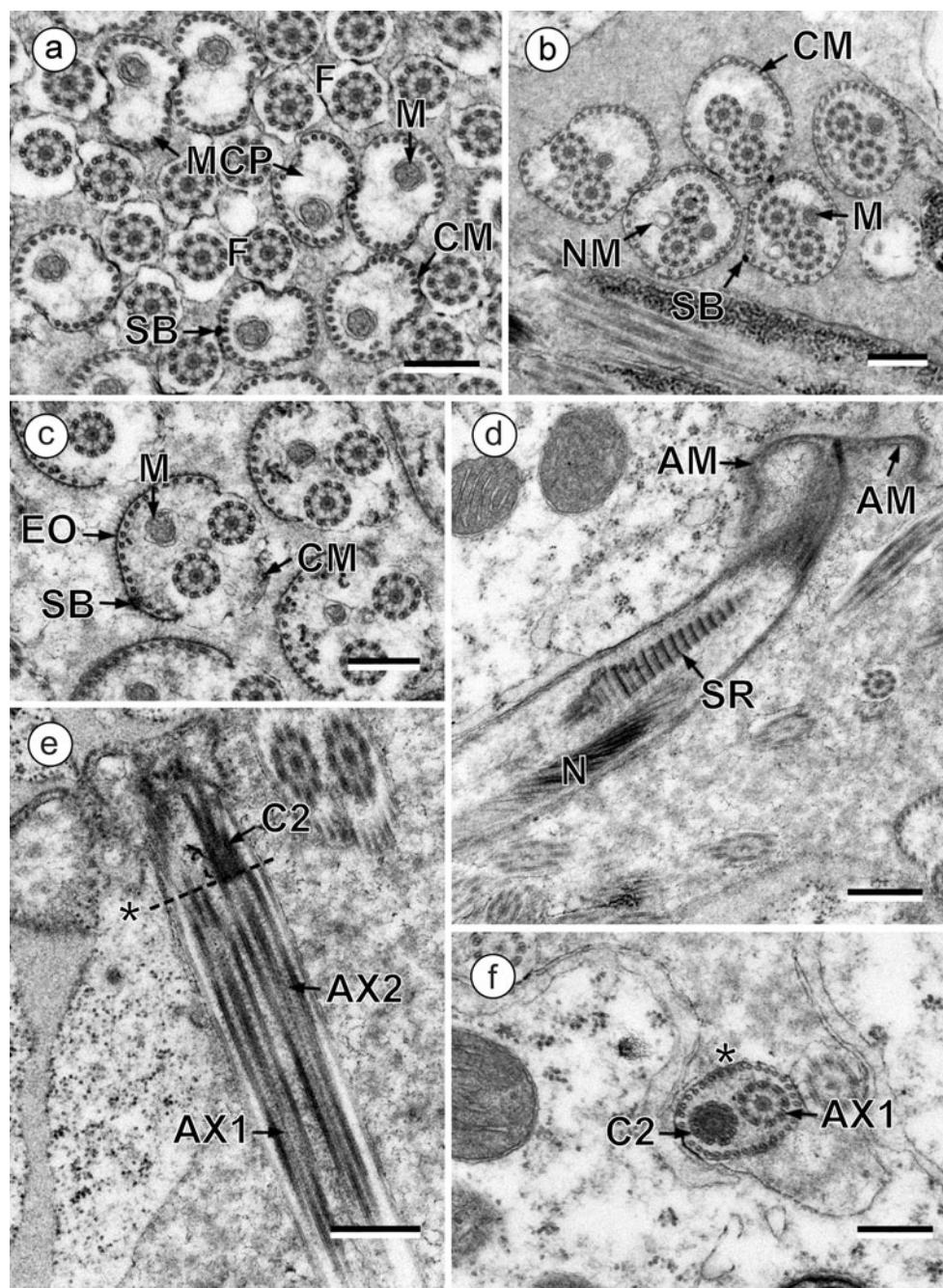
Region I (Figs. 4a–i and 6I) corresponds to the anterior extremity of the spermatozoon exhibiting a electron lucent anterior tip (Fig. 4b) and two centrioles, which are slightly displaced longitudinally one in relation to the other. The centrioles are partially surrounded by a discontinuous layer of submembranous cortical microtubules (about 34; Figs. 4c and 6I), which then describe a continuous layer surrounding the two axonemes of the 9+“1” trepaxonematan pattern (Figs. 4d and 6I). In posterior sections, the number of cortical microtubules decreases becoming separated into two fields between the axonemes. These two bundles, a dorsal one with around eight cortical microtubules and a ventral one with about 14 cortical microtubules, are delimited by the attachment zones as a result of proximodistal fusion during spermiogenesis (Fig. 4e, f). Additionally, within several cross-sections, we observed some intracytoplasmic cortical

microtubules (about four; Fig. 4e). The distal part of region I is characterized by the appearance of granules of glycogen, the first mitochondrion, the external ornamentation of the plasma membrane, and spinelike bodies (Figs. 4f–i and 6I).

Region II (Figs. 4j and 6II) corresponds to the transitional region between the anterior and nuclear regions. It is characterized by the presence of two axonemes, a reduced number of cortical microtubules (about two or three) and granules of glycogen (Figs. 4j and 6II). Considering the numerous identical cross-sections showing only these characters, this region appears to represent a large portion of the spermatozoon.

Region III (Figs. 4k, 5a–g, and 6III) corresponds to the nuclear and posterior region of the spermatozoon. Initially, the nucleus appears between the two axonemes (Fig. 4k and 6III) and later, the first axoneme progressively disorganizes

Fig. 2 TEM micrographs of spermiogenesis of *R. exasperatum*. **a** Cross-sections of free flagella (*F*) and median cytoplasmic processes (*MCP*) containing the mitochondrion (*M*). Note that the migration of mitochondria occurs before the nuclear migration and also before the fusion of flagella with the median cytoplasmic process. *CM* cortical microtubules, *SB* spinelike body. Bar 0.3 μm. **b** Cross-sections of spermatids after the proximodistal fusion. *CM* cortical microtubules, *M* mitochondrion, *NM* nuclear membrane, *SB* spinelike body. Bar 0.5 μm. **c** Cross-section of a spermatid exhibiting the external ornamentation of the plasma membrane (*EO*) and both axonemes. *CM* cortical microtubules, *M* mitochondrion, *SB* spinelike body. Bar 0.3 μm. **d** Longitudinal section showing the presence of striated rootlet (*SR*) at the beginning of the constriction of the ring of arched membranes (*AM*). Note the migration of the nucleus (*N*) at this advanced stage of spermiogenesis. Bar 0.5 μm. **e** Longitudinal section of an old spermatid exhibiting two axonemes (*Ax1* and *Ax2*) in the future anterior spermatozoon extremity. *C2* centriole of the second axoneme. Bar 0.5 μm. **f** Cross-section of an old spermatid at the level marked with an asterisk in (e). *Ax1* first axoneme, *C2* centriole of the second axoneme. Bar 0.3 μm



and disappears (Figs. 5a, b and 6III), the second mitochondrion appears (Figs. 5c and 6III) and then disappears (Figs. 5d and 6III), the cortical microtubules stop (Figs. 5d, e and 6III), and finally the disorganization and disappearance of the second axoneme occurs (Figs. 5f, g and 6III). Thus, the posterior spermatozoon tip contains only the nucleus and a few granules of glycogen surrounded by the plasma membrane (Figs. 5g and 6III).

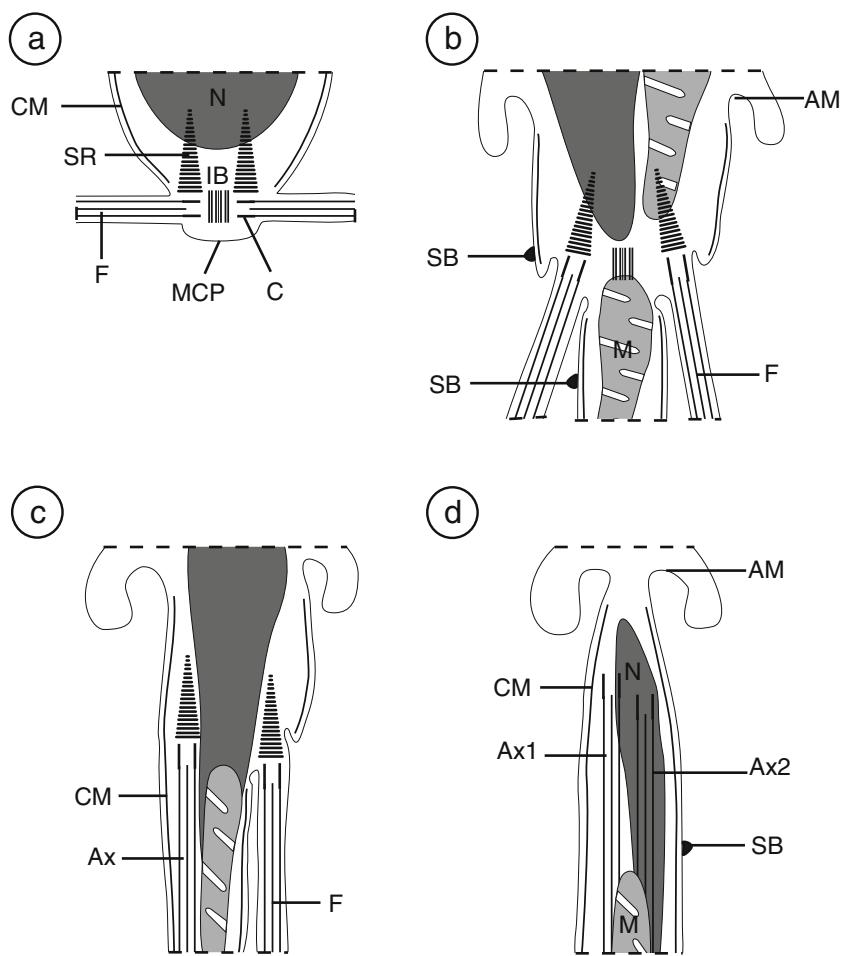
The granular material observed in all regions of the mature spermatozoon is evidenced as glycogen using the test of Thiéry (Fig. 5h).

Discussion

Spermiogenesis

The spermiogenesis process of *R. exasperatum* is similar to those of the other digenous studied until now. As described in the present study, most digenous and also certain cestodes present a spermiogenesis process characterized by the formation of a differentiation zone containing two centrioles that give rise to two free flagella growing orthogonally to the median cytoplasmic process, becoming

Fig. 3 Attempted reconstruction of the main stages of spermiogenesis of *R. exasperatum*. *AM* arched membranes, *Ax* axoneme, *Ax1* first axoneme, *Ax2* second axoneme, *C* centriole, *CM* cortical microtubules, *F* flagellum, *IB* intercentriolar body, *M* mitochondrion, *MCP* median cytoplasmic process, *N* nucleus, *SB* spinelike body, *SR* striated rootlets

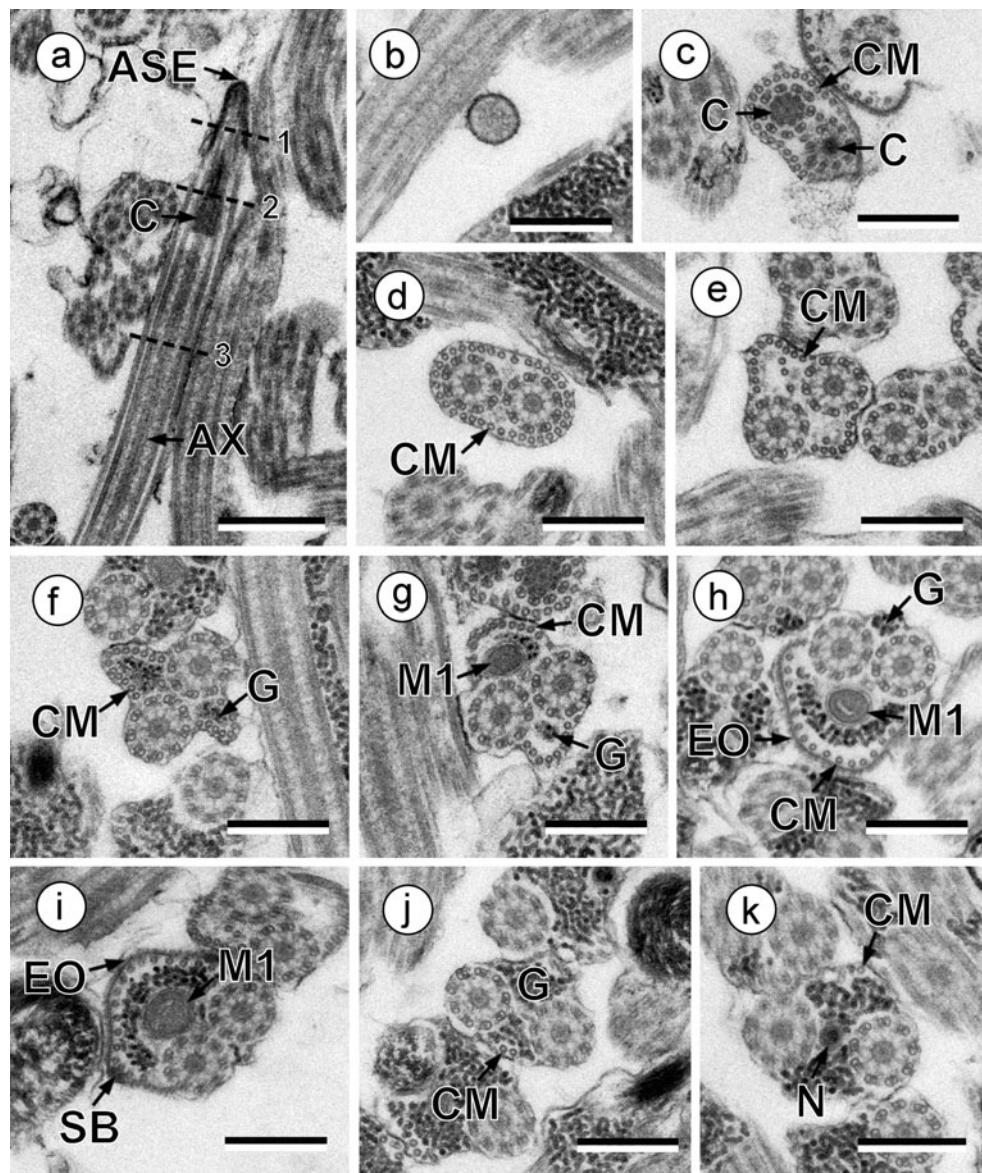


parallel by flagellar rotation and fusing with the median cytoplasmic process by proximodistal fusion. The flagellar rotation of 90° described in *R. exasperatum* is reported in most digenleans as observed for example in *Fasciola gigantica*, *Notocotylus neyrai*, or *Haematoloechus medioplexus* (Justine and Mattei 1982; Ndiaye et al. 2003a, 2004). However, recent studies have described flagellar rotations greater than 90°. This is the case, for example, of *Nicolla wisniewskii*, *Crepidostomum metoecus*, *Fasciola hepatica*, *Helicometra fasciata*, *Monorchis parvus*, or *Dicrocoelium hospes* (Levron et al. 2003, 2004a; Ndiaye et al. 2003b; Agostini et al. 2005; Quilichini et al. 2007a, 2007b). It is also interesting to notice that the flagella that present over 90° rotations undergo asynchronous fusion with the median cytoplasmic process. The proximodistal fusion is generally present during spermiogenesis of all digenleans except for the schistosomatids (Justine 1991). In fact, this is a particular group presenting many other differences when comparing to the digenleans. For example, concerning the spermatozoon, the central core of the trepanematan axoneme is absent, exhibiting a characteristic 9+“0” pattern, unique to schistosomatid spermatozoa (Justine 1991, 1995; Justine et al. 1993).

In *R. exasperatum*, spinelike bodies are present in the early stage of spermiogenesis. They are associated with the plasma membrane of the median cytoplasmic process both before and after the fusion of the flagella with the median cytoplasmic process. Such description and location of the spinelike bodies have been reported recently in the spermiogenesis of the digenlean *Diplodiscus subclavatus* (see Bakhoun et al. 2011). These structures are also observed in the old spermatid or young spermatozoon associated with the external ornamentation of the plasma membrane. Overall, the most relevant aspect concerning spinelike bodies is the presence of this structure in the proximal area of the spermatid at the centriolar level after flagellar rotation. This is therefore the first description of spinelike bodies in early stages of spermiogenesis at the base of spermatids.

Additionally, several mitochondria and the nucleus migrated into the median cytoplasmic process before the proximodistal fusion of the flagella. Despite having been subject of controversy in the past, it is now widely accepted that the mitochondria migrate after the nucleus in most digenleans, as postulated by Burton (1972). Nevertheless, in *R. exasperatum*, the migration of the mitochondria is

Fig. 4 Mature spermatozoon of *R. exasperatum*. **a** Longitudinal section of region I showing the anterior spermatozoon extremity (ASE). Ax axoneme, C centriole. Bar 0.5 μm. **b–d** Consecutive cross-sections of region I at the level 1, 2, and 3, respectively, marked in (a). C centriole, CM cortical microtubules. Bars 0.3 μm. **e** Cross-section of region I showing the cortical microtubules (CM) forming two fields. Note the presence of some free intracytoplasmic microtubules. Bar 0.3 μm. **f** Cross-section of region I showing the appearance of glycogen granules (G). CM cortical microtubules. Bar 0.3 μm. **g** Cross-section of region I showing the first mitochondrion (M1) in the ventral side. CM cortical microtubules, G granules of glycogen. Bar 0.3 μm. **h** Cross-section of region I showing external ornamentation (EO) associated with cortical microtubules (CM). G granules of glycogen, M1 first mitochondrion. Bar 0.3 μm. **i** Cross-section of region I showing external ornamentation (OE) associated with cortical microtubules and spinelike bodies (SB). M1 first mitochondrion. Bar 0.3 μm. **j** Cross-section of region II. Note the reduction in the number of cortical microtubules (CM). G granules of glycogen. Bar 0.3 μm. **k** Cross-section of the anterior area of region III showing the nucleus (N) between the axonemes. CM cortical microtubules. Bar 0.3 μm



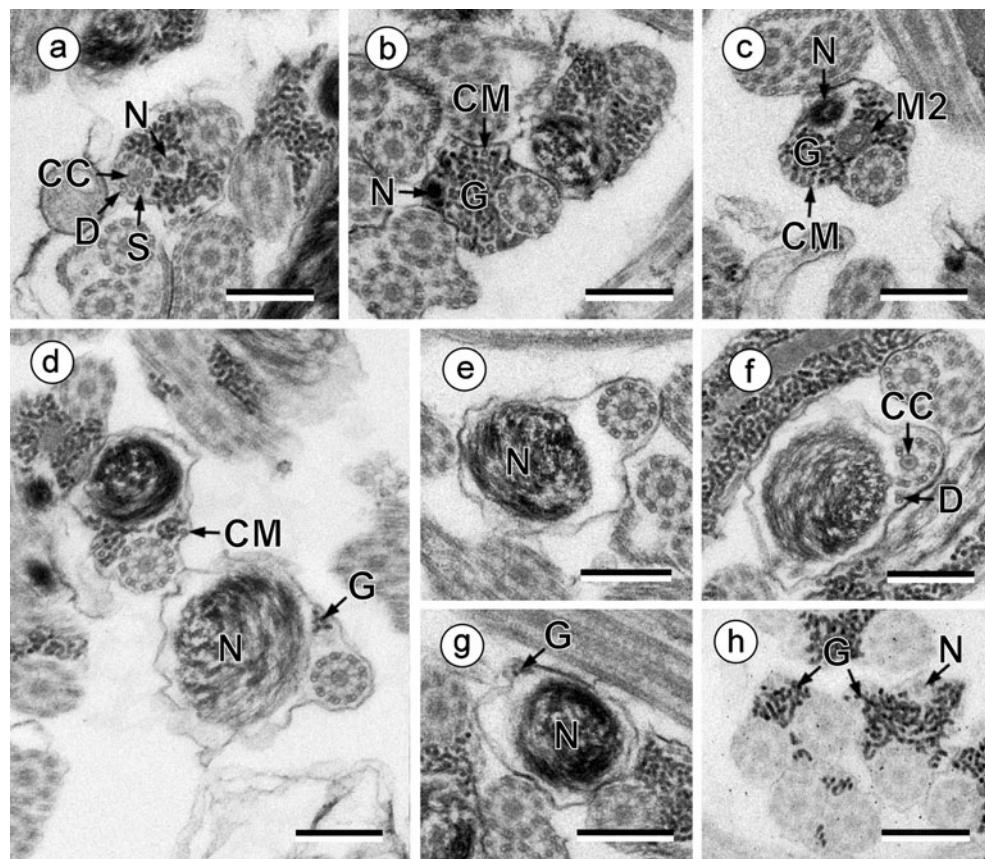
observed before the nuclear migration as reported also in the spermiogenesis of *Dicrocoelium dendriticum* (Cifrián et al. 1993) and *Postorchigenes gymnesicus* (Gracenea et al. 1997). At the beginning of spermiogenesis, a mitochondrial migration is observed before the flagellar fusion. Moreover, in several cross-sections at this stage, only the mitochondrion is present.

With respect to the intercentriolar body, in most digenleans described to date, this structure is composed by seven electron-dense layers morphologically formed by a fine central plate and three external plates on each side as described in *R. exasperatum*. Seck et al. (2007, 2008a, b) described an intercentriolar body also made up by seven electron-dense layers. Other intercentriolar body morphologies were described in the case of *Deropristis inflata* (Foata et al. 2007) which presented six electron-dense

layers, and of *Cryptocotyle lingua* (Rees 1979) and *M. parvus* (Levron et al. 2004a), which presented nine electron-dense layers. Although the role of the intercentriolar body is unknown, certain authors suggested that this structure serves as a reserve of material for microtubule polymerization and participates in the elongation of the flagella (see Burton 1972; Levron et al. 2004a).

This structure is considered a plesiomorphic character present in the Digenea and also in most of the Cestoda, except Tetrabothriidea and some cyclophyllideans (Justine 1998, 2001). However, reduced intercentriolar bodies are described in the more evolved taxa within the Cestoda (see Miquel et al. 1999; Bruňanská et al. 2003, 2004, 2005). In the future, further considerations on the intercentriolar body may be useful to the phylogenetic analysis of Digenea, in particular, as currently used in the analysis of interrelation-

Fig. 5 Mature spermatozoon of *R. exasperatum*. **a–g** Consecutive cross-sections of region III between the disorganization of the first axoneme and the posterior tip containing only the nucleus (*N*). *CC* central core of axoneme, *CM* cortical microtubules, *D* doublets, *G* granules of glycogen, *M2* second mitochondrion, *N* nucleus; *S* singlets. Bars 0.3 μm. **h** Revelation of the glycogen granules (*G*) by the Thiéry's test. *N* nucleus. Bar 0.3 μm



ships of the Cestoda (Hoberg et al. 1997, 2001; Justine 1998, 2001; Levron et al. 2010).

Spermatozoon

The ultrastructural characters described in digenetic spermatozoa appeared to be homogeneous. However, variation of many characters has recently been described, particularly in spinelike bodies, number of mitochondria, lateral expansions, external ornamentations, distribution of cortical microtubules, and morphology of the posterior extremity. Considering the different conditions of some characters, combined with the fact that digenetics represent one of the most diverse group of Platyhelminthes, the previously accepted “homogeneity” in the ultrastructural organization of digenetic sperm must be reconsidered in the future, with particular relevance to the possible role of ultrastructural data in assessing the phylogenetic relationships within this subclass.

The anterior spermatozoon extremity of *R. exasperatum* is characterized by the presence of two slightly longitudinally displaced axonemes of the 9+“1” trepanemata pattern. Such description has been reported for example in *Metorchis orientalis* (Liu and Pan 1990), *Echinostoma caproni* (Iomini and Justine 1997) or *Nicolla testiobliquum* (Quilichini et al. 2007c). In fact, the lack of sections

showing only one axoneme and the observation of several cross-sections showing two centrioles justify our interpretation. In a reinvestigation of the ultrastructure of the spermatozoon of *H. medioplexus*, Justine and Mattei (1982) also described two axonemes slightly separated longitudinally in the anterior extremity of the spermatozoon. Thus, the omphalometrid *R. exasperatum* and the haematoloechid *H. medioplexus*, both belonging to the superfamily Plagiorchioidae, present a similar anterior extremity. An anterior extremity exhibiting both axonemes is rare in spermatozoa of digenetics. In fact, most species described to date present only one axoneme in their anterior tip as reported for example in *Anisocoelium capitellatum* or *P. gymnesicus* (Gracenea et al. 1997; Ternengo et al. 2009). It is also interesting to notice that, in numerous studies, cross-sections with a single axoneme are always interpreted as a posterior tip of sperm (Castilho and Barandela 1990). Thus, the determination of the morphology of the anterior extremity of the spermatozoon could be confusing in some species. However, the observation of sections showing centrioles or the presence/absence of cortical microtubules and granules of glycogen would give real evidence of the morphology of the anterior spermatozoon extremity. Concerning the granules of glycogen, despite that their distribution along the spermatozoon is not documented in digenetic species, we observed that they are absent in the

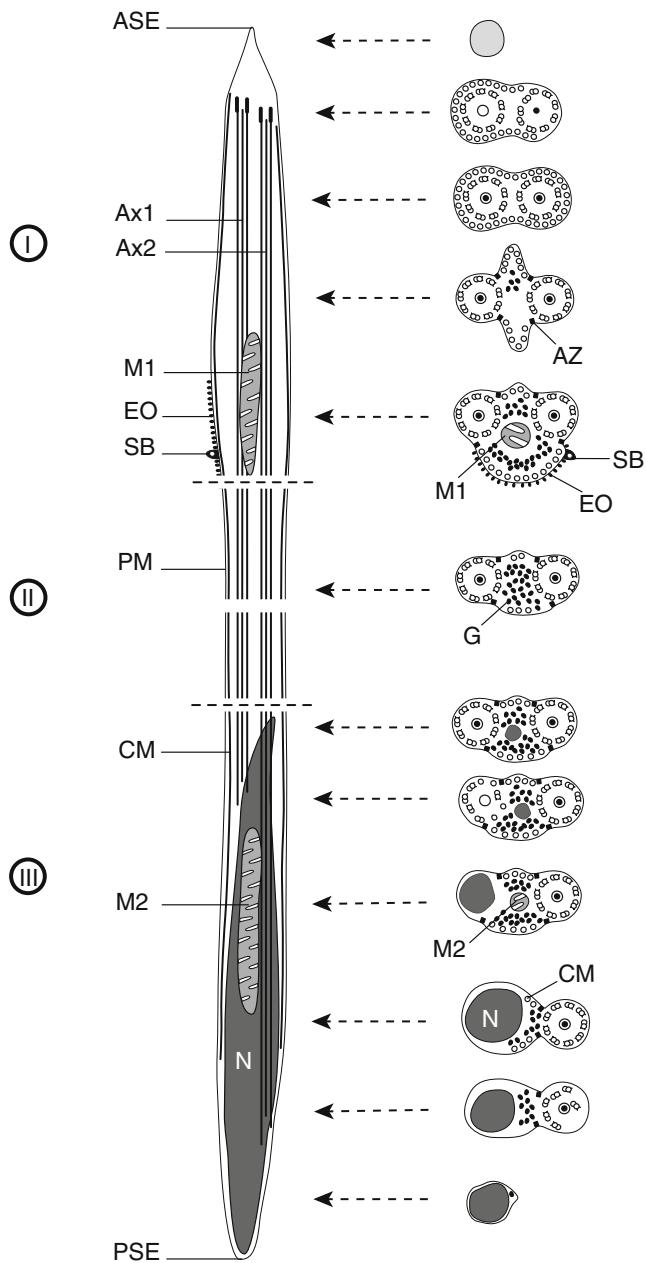


Fig. 6 Attempted reconstruction of the spermatozoon of *R. exasperatum*. ASE anterior spermatozoon extremity; *Ax1* first axoneme; *Ax2* second axoneme; *AZ* attachment zones; *CM* cortical microtubules; *EO* external ornamentation of plasma membrane; *G* granules of glycogen; *M1* first mitochondrion; *M2* second mitochondrion; *N* nucleus; *PM* plasma membrane; *PSE* posterior spermatozoon extremity; *SB* spinelike bodies

anterior tip of the spermatozoon of *R. exasperatum* and such absence may identify which cross-sections belong to the anterior extremity of the sperm.

The number of mitochondria in the mature spermatozoon varies according to digenous species. Taking into account that it is very difficult to observe and determine the number of mitochondria using longitudinal sections, several authors have determined different number of mitochondria by a

logical interpretation of numerous cross-sections. In the digenous, most species present a spermatozoon with one mitochondrion as described in *Brachylaima aequans*, *Opecoeloides furcatus*, *F. gigantica*, or *D. subclavatus* (ŽDárska et al. 1991; Miquel et al. 2000; Ndiaye et al. 2004; Bakhoum et al. 2011). However, other digenous present two mitochondria, one being located at the level of the external ornamentation of the plasma membrane and the other in the area containing the nucleus as presently observed in *R. exasperatum*. This is the case of the opecoelids *Poracanthium furcatum*, *N. testobliquum*, and *N. wisniewskii* (Levron et al. 2004b; Quilichini et al. 2007a, 2007c), the dicrocoeliid *D. hospes* (Agostini et al. 2005), the troglotrematid *Troglotrema acutum* (Miquel et al. 2006), and the allocreadiid *C. metoecus* (Quilichini et al. 2007b). Additionally, a spermatozoon presenting three mitochondria was recently described in *A. capitellatum*, *Euryhelmis squamula*, *Basidioculus ectorchus*, and *Sandonia sudanensis* (Ashour et al. 2007; Bakhoum et al. 2009; Ternengo et al. 2009). The application of some techniques such as the labeling of the mitochondria would be useful to elucidate the real number of mitochondria. It must be emphasized that the absence of mitochondria is considered a synapomorphy in some cestodes (Eucestodes) (Justine 1995); thus, its presence in basal cestodes (Gyrocotylidea and Amphelinidea) and in trematodes would be considered an ancestral character.

The external ornamentation of the plasma membrane associated with cortical microtubules and with spinelike bodies, in some cases, represents another character of great phylogenetic importance in the spermatozoon of digenous. These external ornamentations are located in the anterior area of the spermatozoon and, generally, they appear in the mitochondrial side (ventral side) of the sperm cell. However, certain authors have described an external ornamentation associated with one of the two axonemes in the anterior extremity of the spermatozoon. This is the case of *H. medioplexus*, *M. parvus*, *Pronoprymna ventricosa*, and *Neoapocreadium chabaudi* (Justine and Mattei 1982; Levron et al. 2004a; Quilichini et al. 2007d; Kacem et al. 2010). In *R. exasperatum*, the external ornamentation appears during the final stage of spermiogenesis and, in the mature spermatozoon, it is observed only in the mitochondrial region.

Generally, digenous presenting external ornamentation also present spinelike bodies, as observed in *R. exasperatum*. However, some species exhibit external ornamentation without spinelike bodies, as reported in *M. parvus*, *P. ventricosa*, or *E. squamula* (Levron et al. 2004a; Quilichini et al. 2007d; Bakhoum et al. 2009). With respect to spinelike bodies, it is interesting to notice its formation during spermiogenesis. In *R. exasperatum*, spinelike bodies appear before the fusion of the flagella with the median

cytoplasmic process. In the first report of spinelike bodies during spermiogenesis (Miquel et al. 2000), the presence of spinelike bodies was only observed in old spermatids when both flagella were already fused. Concerning the distribution of spinelike bodies along the spermatozoon, *O. furcatus* and *F. gigantica* presented a periodicity of 1 μm (Miquel et al. 2000; Ndiaye et al. 2004), *P. furcatum* presented a periodicity of 0.7 μm (Levron et al. 2004b), and *N. wisniewskii* presented a periodicity of 0.6 μm (Quilichini et al. 2007a). However, there is no periodicity in *R. exasperatum* because spinelike bodies are irregularly distributed. This character will probably be a good tool in elucidating the relationships between digenleans at the family or superfamily levels.

The morphology of the posterior extremity of the spermatozoon is not homogeneous among digenleans. Indeed, Quilichini et al. (2010a) analyzed all the available data on the ultrastructural organization of spermatozoon of some digenleans and postulated three principal types of posterior extremities for the digenlean spermatozoa considering the succession of characters. The opecoelidean type (or type 1) is characterized by a posterior extremity containing cortical microtubules; the fasciolidean type (or type 2) exhibits only the nucleus and the cryptogonimidean type (or type 3) presents a posterior tip containing the second axoneme (see Quilichini et al. 2010a). The posterior spermatozoon extremity of *R. exasperatum* corresponds to the type 2. However, several species present posterior extremities that do not concur with any of the postulated types. This is the case of the spermatozoon of *D. subclavatus* that seems to present a type 2 posterior extremity, although cortical microtubules are still present after the disorganization and disruption of the second axoneme (Bakhoum et al. 2011). A similar situation is observed in the paramphistomids that present the nucleus and some cortical microtubules in the posterior tip (see Seck et al. 2007, 2008a). Due to the scarce number of cortical microtubules in comparison with the nuclear section, these posterior extremities probably correspond to type 2. Moreover, in the case of *Scaphiostomum palaeoarcticum*, the posterior spermatozoon extremity exhibits a progressive disappearance of the nucleus, followed by the first axoneme, cortical microtubules, and finally the second axoneme (Ndiaye et al. 2002). A unique morphological pattern has recently been observed in the spermatozoon of *Aponurus lagungula*, which presents a mitochondrion that reaches the posterior spermatozoon extremity along with both axonemes (see Quilichini et al. 2010b). Therefore, the postulated posterior spermatozoon types will need to be re-evaluated in the future because of the posterior extremity discrepancies described in some species. Moreover, in order to overcome the minimal variations described in the posterior spermatozoon extremities of some species, it

would be more interesting to consider the terminal character only rather than the succession of characters observed in the posterior spermatozoon tip.

Acknowledgments This study was partially supported by a DURSI grant (No. 2009SGR-403). We are grateful to Núria Cortadellas and Almudena García (“Serveis Científics i Tècnics” of the University of Barcelona) for their assistance in the preparation of samples. AJS Bakhoum benefits from MAEC-AECID doctoral grants (No. 2009-10 0000448019 and No. 2010-11 0000538055).

References

- Agostini S, Miquel J, Ndiaye PI, Marchand B (2005) *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 (Digenaea, Dicrocoeliidae): spermiogenesis, mature spermatozoon and ultrastructural comparative study. Parasitol Res 96:38–48. doi:[10.1007/s00436-005-1318-6](https://doi.org/10.1007/s00436-005-1318-6)
- Ashour AA, Garo K, Gamil IS (2007) Spermiogenesis in two paramphistomes from Nile fish in Egypt: an ultrastructural study. J Helminthol 81:219–226. doi:[10.1017/S0022149X07409816](https://doi.org/10.1017/S0022149X07409816)
- Bâ CT, Marchand B (1995) Spermiogenesis, spermatozoa and phyletic affinities in the Cestoda. Mém Mus Natl Hist Nat Paris 166:87–95
- Bakhoum AJS, Bâ CT, Fournier-Chambrillon C, Torres J, Fournier P, Miquel J (2009) Spermatozoon ultrastructure of *Euryhelmis squamula* (Rudolphi, 1819) (Digenaea, Opisthorchioidea, Heterophyidae), an intestinal parasite of *Mustela vison* (Carnivora, Mustelidae). Rev Ibero Latinoam Parasitol 1:32–45
- Bakhoum AJS, Torres J, Shimalov VV, Bâ CT, Miquel J (2011) Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) (Paramphistomoidea, Diplodiscidae), an intestinal fluke of the pool frog *Rana lessonae* (Amphibia, Anura). Parasitol Int. doi: [10.1016/j.parint.2010.10.006](https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.10.006)
- Bruňanská M, Nebesářová J, Scholz T (2003) Spermiogenesis in the proteocephalidean cestode *Proteocephalus torulosus* (Batsch, 1786). Parasitol Res 90:318–324. doi:[10.1007/s00436-003-0858-x](https://doi.org/10.1007/s00436-003-0858-x)
- Bruňanská M, Scholz T, Nebesářová J (2004) Reinvestigation of spermiogenesis in the proteocephalidean cestode *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800). J Parasitol 90:23–29
- Bruňanská M, Scholz T, Ibraheem MH (2005) Spermiogenesis in the cestode *Corallobothrium solidum* Fritsch, 1886 (Proteocephalidae: Corallobothriinae). Acta Zool Stockh 86:55–61. doi:[10.1111/j.0001-7272.2005.00186.x](https://doi.org/10.1111/j.0001-7272.2005.00186.x)
- Burton PR (1972) Fine structure of the reproductive system of a frog lung-fluke. III. The 376 spermatozoon and its differentiation. J Parasitol 58:68–83
- Castilho F, Barandela T (1990) Ultrastructural study on the spermiogenesis and spermatozoon of the metacercariae of *Microphallus primus* (Digenaea), a parasite of *Carcinus maenas*. Mol Reprod Dev 25:140–146
- Cifrián B, García-Corrales P, Martínez-Alos S (1993) Ultrastructural study of the spermatogenesis and mature spermatozoa of *Dicrocoelium dendriticum* (Plathelminthes, Digenaea). Parasitol Res 79:204–212. doi:[10.1007/BF00931894](https://doi.org/10.1007/BF00931894)
- Ehlers U (1984) Phylogenetisches System der Plathelminthes. Verh Natwiss Ver Hambg NF 27:291–294
- Foata J, Quilichini Y, Marchand B (2007) Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Deropristis inflata* Molin, 1859 (Digenaea, Deropristidae), a parasite of *Anguilla anguilla*. Parasitol Res 101:843–852. doi:[10.1007/s00436-007-0550-7](https://doi.org/10.1007/s00436-007-0550-7)
- Gracenea M, Ferrer JR, González-Moreno O, Trullols M (1997) Ultrastructural study of spermatogenesis and spermatozoon in

- Postorchigenes gymnesicus* (Trematoda, Lecithodendriidae). J Morphol 234:223–232. doi:10.1002/(SICI)1097-4687(199712)234:
- Hoberg EP, Mariaux J, Justine J-L, Brooks DR, Weekes PJ (1997) Phylogeny of the orders of the Eucestoda (Cercoconcomorphae) based on comparative morphology: historical perspectives and a new working hypothesis. J Parasitol 83:1128–1147
- Hoberg EP, Mariaux J, Brooks DR (2001) Phylogeny among orders of the Eucestoda (Cercoconcomorphae): integrating morphology, molecules and total evidence. In: Littlewood DTJ, Bray RA (eds) Interrelationships of the Platyhelminthes. Taylor and Francis, London, pp 112–126
- Iomini C, Justine J-L (1997) Spermiogenesis and spermatozoon of *Echinostoma caproni* (Platyhelminthes, Digenea): transmission and scanning electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. Tissue Cell 29:107–118. doi:10.1016/S0040-8166(97)80077-8
- Justine J-L (1991) The spermatozoa of the schistosomes and the concept of progenetic spermiogenesis. In: Baccetti B (ed) Comparative spermatology 20 years after. Raven, New York, pp 977–979
- Justine J-L (1995) Spermatozoal ultrastructure and phylogeny of the parasitic Platyhelminthes. Mém Mus Natl Hist Nat 166:55–86
- Justine J-L (1998) Spermatozoa as phylogenetic characters for the Eucestoda. J Parasitol 84:385–408
- Justine J-L (2001) Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes. In: Littlewood DTJ, Bray RA (eds) Interrelationships of the Platyhelminthes. Taylor and Francis, London, pp 231–238
- Justine J-L (2003) Ultrastructure des spermatozoïdes et phylogénie des Neodermata. In: Combes C, Jourdane J (eds) Taxonomie, écologie et évolution des métazoaires parasites. PUP, Perpignan, pp 359–380
- Justine J-L, Mattei X (1982) Réinvestigation de l'ultrastructure du spermatozoïde d'*Haematoloechus* (Trematoda: Haematoloechidae). J Ultrastruct Res 81:322–332
- Justine J-L, Jamieson BGM, Southgate VR (1993) Homogeneity of sperm structure in six species of Schistosomes (Digenea, Platyhelminthes). Ann Parasitol Hum Comp 68:185–187
- Kacem H, Bakhoum AJS, Neifar L, Miquel J (2010) Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the digenean *Neopapocreadium chabaudi* (Apocreadiidae), a parasite of *Ballistes capriscus* (Pisces, Teleostei). Parasitol Int 59:358–366. doi:10.1016/j.parint.2010.04.008
- Levron C, Ternengo S, Marchand B (2003) Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Helicometra fasciata* (Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Labrus merula* (Pisces, Teleostei). Acta Parasitol 48:255–264
- Levron C, Ternengo S, Marchand B (2004a) Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Monorchis parvus* Looss, 1902 (Digenea, Monorchidae), a parasite of *Diplodus annularis* (Pisces, Teleostei). Parasitol Res 93:102–110. doi:10.1007/s00436-004-1115-7
- Levron C, Ternengo S, Marchand B (2004b) Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Poracanthium furcatum* (Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mullus surmuletus* (Pisces, Teleostei). Acta Parasitol 49:190–200
- Levron C, Miquel J, Oros M, Scholz T (2010) Spermatozoa of tapeworms (Platyhelminthes, Eucestoda): advances in ultrastructural and phylogenetic studies. Biol Rev 85:523–543. doi:10.1111/j.1469-185X.2009.00114.x
- Liu Y, Pan Y (1990) Electron microscope studies of *Metorchis* (sic) *orientalis*. III. The spermatozoa and spermatogenesis. J Shanghai Agricult College 8:57–62
- Miquel J, Feliu C, Marchand B (1999) Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Mesocestoides litteratus* (Cestoda, Mesocestoididae). Int J Parasitol 29:499–510. doi:10.1016/S0020-7519(98)00202-1
- Miquel J, Nourrisson C, Marchand B (2000) Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Opecoeloides furcatus* (Trematoda, Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mullus barbatus* (Pisces, Teleostei). Parasitol Res 86:301–310. doi:10.1007/s004360050047
- Miquel J, Fournier-Chambrillon C, Fournier P, Torres J (2006) Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the cranial digenean *Troglocrema acutum* (Leuckart, 1842). J Parasitol 92:441–453
- Ndiaye PI, Miquel J, Bâ CT, Feliu C, Marchand B (2002) Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Scaphiostomum palaearticum* Mas-Coma, Esteban et Valero, 1986 (Trematoda, Digenea, Brachylaimidae). Acta Parasitol 47:259–271
- Ndiaye PI, Miquel J, Feliu C, Marchand B (2003a) Ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa of *Notocotylus neyrai* González Castro, 1945 (Digenea, Notocotylidae), intestinal parasite of *Micromys agrestis* (Rodentia: Arvicolidae) in Spain. Invertebr Reprod Dev 43:105–115
- Ndiaye PI, Miquel J, Fons R, Marchand B (2003b) Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the liver fluke *Fasciola hepatica* L., 1758 (Digenea, Fasciolidae): scanning and transmission electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. Acta Parasitol 48:182–194
- Ndiaye PI, Miquel J, Bâ CT, Marchand B (2004) Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of the liver fluke *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856 (Digenea, Fasciolidae), a parasite of cattle in Senegal. J Parasitol 90:30–40
- Odening K (1959) Das exkretionssystem von *Omphalometra* und *Brachycoelium* (Trematoda, Digenea) und die taxonomie der unterordnung Plagiorchiata. Z Parasitenkd 19:442–457. doi:10.1007/BF00259735
- Quilichini Y, Foata J, Marchand B (2007a) Ultrastructural study of the spermatozoon of *Nicolla testiobliquum* (Digenea, Opecoelidae) parasite of brown trout *Salmo trutta* (Pisces, Teleostei). Parasitol Res 101:1295–1301. doi:10.1007/s00436-007-0636-2
- Quilichini Y, Foata J, Marchand B (2007b) Ultrastructural study of the spermatozoon of *Pronoprymania ventricosa* (Digenea, Baccigerinae), parasite of the twaite shad *Alosa fallax* Lacepede (Pisces, Teleostei). Parasitol Res 101:1125–1130. doi:10.1007/s00436-007-0599-3
- Quilichini Y, Foata J, Orsini A, Marchand B (2007c) Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Nicolla wisniewskii* (Digenea: Opecoelidae), an intestinal parasite of brown trout *Salmo trutta* (Pisces: Teleostei). J Parasitol 93:469–478
- Quilichini Y, Foata J, Orsini A, Marchand B (2007d) Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon of *Crepidostomum metoecus* (Digenea: Allocreadiidae), a parasite of *Salmo trutta* (Pisces: Teleostei). J Parasitol 93:458–468
- Quilichini Y, Foata J, Justine J-L, Bray RA, Marchand B (2010a) Ultrastructural study of the spermatozoon of *Heterolebias maculosus* (Digenea, Opistholebetidae), a parasite of the porcupinefish *Dionodon hystriculus* (Pisces, Teleostei). Parasitol Int 59:427–434. doi:10.1016/j.parint.2010.06.002
- Quilichini Y, Foata J, Justine J-L, Bray RA, Marchand B (2010b) Spermatozoon ultrastructure of *Aponurus laguncula* (Digenea: Lecithasteridae), a parasite of *Aluterus monoceros* (Pisces, Teleostei). Parasitol Int 59:22–28. doi:10.1016/j.parint.2009.06.007
- Rees FG (1979) The ultrastructure of the spermatozoon and spermiogenesis in *Cryptocotyle lingua* (Digenea: Heterophyidae). Int J Parasitol 9:405–419. doi:10.1016/0020-7519(79)90044-4
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 17:208–212
- Seck MT, Marchand B, Bâ CT (2007) Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Paramphistomum microboethrium* (Fischeder 1901; Digenea, Paramphistomidae), a parasite of *Bos*

- taurus* in Senegal. Parasitol Res 101:259–268. doi:[10.1007/s00436-007-0503-1](https://doi.org/10.1007/s00436-007-0503-1)
- Seck MT, Marchand B, Bâ CT (2008a) Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Cotylophoron cotylophorum* (Trematoda, Digenea, Paramphistomidae), a parasite of *Bos taurus* in Senegal. Parasitol Res 103:157–166. doi:[10.1007/s00436-008-0944-1](https://doi.org/10.1007/s00436-008-0944-1)
- Seck MT, Marchand B, Bâ CT (2008b) Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Carmyerius endopapillatus* (Digenea, Gastrothylacidae), a parasite of *Bos taurus* in Senegal. Acta Parasitol 53:9–18. doi:[10.2478/s11686-008-0006-y](https://doi.org/10.2478/s11686-008-0006-y)
- Skrjabin KT (1966) Family omphalometridae odening. Osnovy trematologii. V. XXII. Nauka, Moskva, pp 89–130
- Ternengo S, Quilichini Y, Katharios P, Marchand B (2009) Sperm ultrastructure of the gall bladder fluke *Anisocoelium capitellatum* (Digenea: Cryptogenimidae), a parasite of *Uranoscopus scaber* (Pisces: Uranoscopidae). Parasitol Res 104:801–807. doi:[10.1007/s00436-008-1259-y](https://doi.org/10.1007/s00436-008-1259-y)
- Thiéry JP (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J Microsc 6:987–1018
- Tkach VV (2008) Family Omphalometridae Looss, 1899. In: Bray RA, Gibson DI, Jones A (eds) Keys to the Trematoda. CABI, Wallingford, pp 391–399
- Tkach V, Grabda-Kazubska B, Swiderski Z (2001) Systematic position and phylogenetic relationships of the family Omphalometridae (Digenea, Plagiorchiida) inferred from partial 1srDNA sequences. Int J Parasitol 31:81–85. doi:[10.1016/S0020-7519\(00\)00154-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00154-5)
- Žďárská Z, Soboleva TN, Štěrba J, Valkounová J (1991) Ultrastructure of the male reproductive system of the trematode *Brachylaimus aequans*. Folia Parasitol Praha 38:33–37

III-8 Ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde de *Wardula capitellata* (Digenea : Mesometridae), parasite intestinal du sparidé *Sarpa salpa* au Sénégal

Résumé

La spermiogenèse chez *Wardula capitellata* débute par la formation de la zone de différentiation contenant deux centrioles associés chacun à une racine striée et séparés par un corps intercentriolaire. De chaque centriole se forme un flagelle libre qui croît orthogonalement à l'expansion cytoplasmique médiane. Ensuite, ces flagelles effectuent une rotation pour devenir parallèles à l'expansion cytoplasmique médiane qui, avant la fusion proximo-distale des flagelles, exhibe quatre zones opaques aux électrons et des corps épineux dans sa partie distale. Le stade final de la spermiogenèse est caractérisé par l'étranglement de l'anneau de membranes arquées, donnant naissance au jeune spermatozoïde qui se détache du cytoplasme résiduel.

Le spermatozoïde mûr de *W. capitellata* présente la plupart des caractères ultrastructuraux classiques reportés chez les Digènes tels que, les deux axonèmes de longueur distincte et de type 9+‘1’ des Trepaxonemata, un noyau, une mitochondrie, les deux champs de microtubules corticaux parallèles, et les granules de glycogène. Cependant, le spermatozoïde est aussi caractérisé par certaines particularités comme, les deux expansions latérales accompagnées d'ornementations externes de la membrane plasmique et des corps épineux. De plus, un nouveau caractère spermatologique appelé « *boutons cytoplasmiques ornementés* » est décrit pour la première fois dans cette étude.

Mots clés :

Wardula capitellata, Mesometridae, Microscaphidioidea, Digenea, Boutons cytoplasmiques ornementés, Spermiogenèse, Spermatozoïde, Ultrastructure

Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of *Wardula capitellata* (Digenea, Mesometridae), an intestinal parasite of the sparid teleost *Sarpa salpa* in Senegal

Abdoulaye J.S. Bakhoum^{1,2}, Papa Ibnou Ndiaye³, Aminata Sène³, Cheikh Tidiane Bâ³ and Jordi Miquel^{1,2*}

¹Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, sn, 08028 Barcelona, Spain; ²Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBIO), Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona, Spain; ³Laboratoire de Parasitologie-Helminthologie, Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal

Abstract

The spermiogenesis process in *Wardula capitellata* begins with the formation of a differentiation zone containing two centrioles associated with striated rootlets and an intercentriolar body. Each centriole develops into a free flagellum orthogonal to a median cytoplasmic process. Later these flagella rotate and become parallel to the median cytoplasmic process, which already exhibits two electron-dense areas and spinelike bodies before its proximodistal fusion with the flagella. The final stage of the spermiogenesis is characterized by the constriction of the ring of arched membranes, giving rise to the young spermatozoon, which detaches from the residual cytoplasm. The mature spermatozoon of *W. capitellata* presents most of the classical characters reported in digenetic spermatozoa such as two axonemes of different lengths of the 9 + “1” trepanematan pattern, nucleus, mitochondrion, two bundles of parallel cortical microtubules and granules of glycogen. However, some peculiarities such as two lateral expansions accompanied by external ornamentation of the plasma membrane and spinelike bodies characterize the mature sperm. Moreover, a new spermatological character is described for the first time, the so-called cytoplasmic ornamented buttons.

Keywords

Wardula capitellata, Mesometridae, Digenea, spermiogenesis, spermatozoon, ultrastructure

Introduction

Over the years, the historical systematic position and relationships of the family Mesometridae have been controversial. Several studies have related this family with the superfamily Paramphistomoidea (La Rue 1957, Holliman 1961). Jousson and Bartoli (1999) supported the inclusion of Mesometridae in Paramphistomiformes, as proposed by Brooks *et al.* (1985), and its close relationship to the Microscaphidiidae. Moreover, in their molecular study, Cribb *et al.* (2001) include the Mesometridae in the Paramphistomoidea, as also supported later by Olson *et al.* (2003) in their classification of the Digenea based on complete ssrDNA and

partial (D1-D3) lsrDNA sequences. However, Jones and Blair (2005) treated the Mesometridae as a family in the superfamily Microscaphidoidea together with the type family Microscaphidiidae. Such controversial classifications are recurrent in the Platyhelminthes in general and within the trematodes in particular.

In order to clarify the phylogenetic relationships of Platyhelminthes, several workers have resorted to the ultrastructural characters of reproduction in the Platyhelminthes (see Justine 2001, 2003; Levron *et al.* 2010; Bakhoum *et al.* 2011a, b).

With respect to the Trematoda several characters seem to be interesting tools for phylogenetic purposes. However, the

*Corresponding author: jordimiquel@ub.edu

insufficient database on trematodes (about 62 descriptions, corresponding to 35 families) emphasise the need for more studies within this class. This is the case of the family Me-

sotriidae, which was unexplored until now. Thus, the present work presents for the first time ultrastructural data concerning spermatogenesis and the mature spermatozoon of

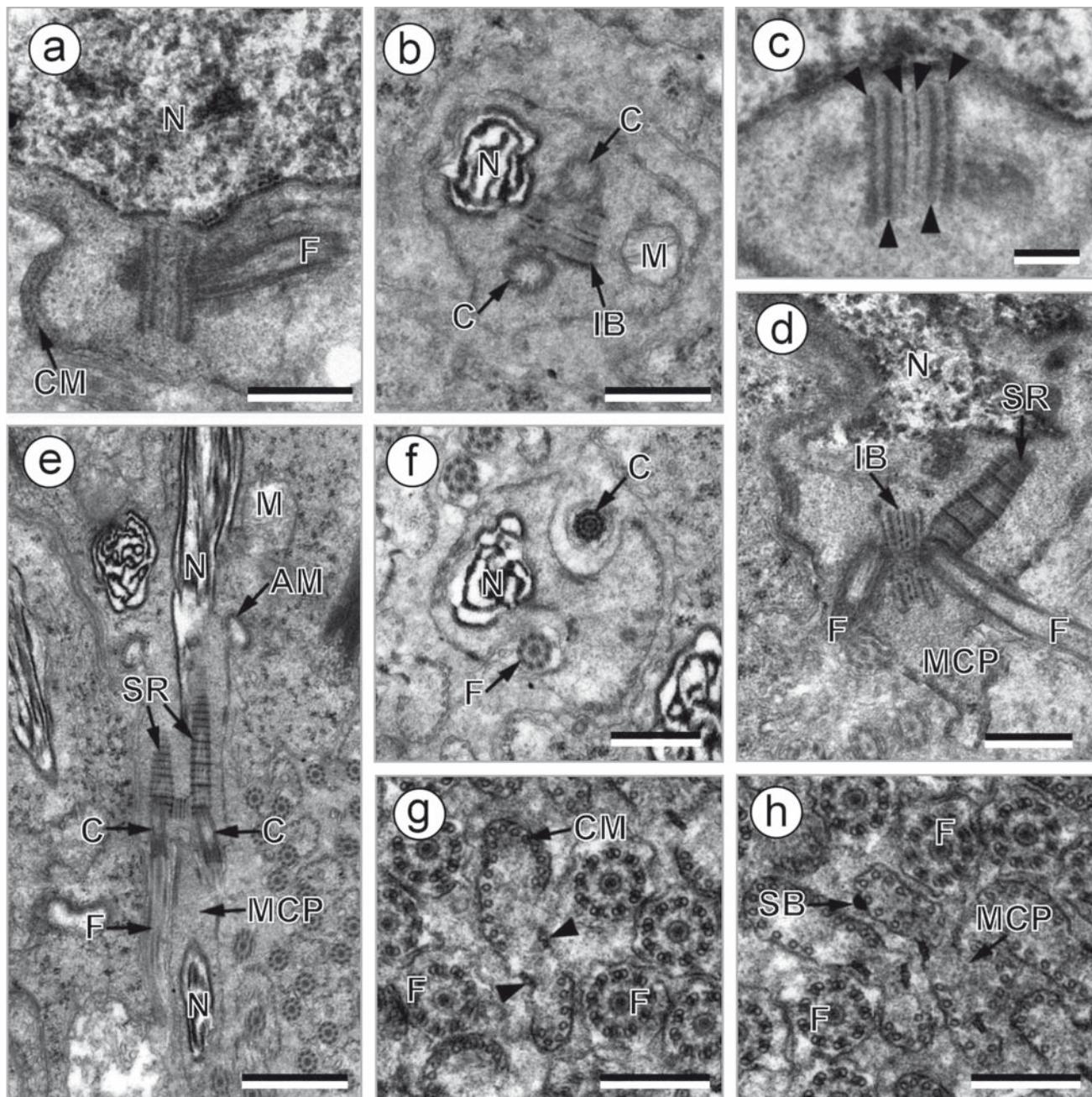


Fig. 1. Spermatogenesis of *Wardula capitellata*. **a.** Differentiation zone showing one of the flagella growing orthogonally and an intercentriolar body. **b.** Differentiation zone exhibiting two centrioles, nucleus, mitochondrion and intercentriolar body. **c.** Detail of the intercentriolar body. **d.** Differentiation zone with two flagella nearly parallel to the median cytoplasmic process. **e.** Longitudinal section showing the nucleus in migration and mitochondria staying in the differentiation zone. **f.** Section with the nucleus before proximodistal fusion. **g, h.** Several cross-sections before the fusion showing the electron-dense area (arrowheads) and spinelike body. Scale bars = 0.5 µm (a, b, d, f), 0.3 µm (e, g, h), 0.2 µm (c). **Abbreviations to all figures:** AM – arched membranes, ASE – anterior spermatozoon extremity, Ax – axoneme, AZ – attachment zones, C – centriole, CE – cytoplasmic expansion, CM – cortical microtubules, COB – cytoplasmic ornamented button, EO – external ornamentation, F – flagellum, G – granules of glycogen, IB – intercentriolar body, LE – lateral expansion, M – mitochondrion, MCP – median cytoplasmic process, N – nucleus, NM – nuclear membrane, PM – plasma membrane, PSE – posterior spermatozoon extremity, SB – spinelike body, SR – striated rootlets

Wardula capitellata, one of the seven species that compose the family Mesometridae.

Materials and methods

Adult specimens of *Wardula capitellata* (Rudolphi, 1819) were collected from the digestive tract of a naturally infected *Sarpa salpa* (Teleostei, Sparidae) captured off coast of Dakar (Senegal). Living digeneans were placed in a 0.9% NaCl solution. After dissection, specimens were routinely processed for TEM examination. They were fixed in cold (4°C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4 for a minimum of 2 hr, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4, postfixed in cold (4°C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 hr, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4, dehydrated in an ethanol series and propylene oxide, and finally embedded in Spurr resin. After the testes and seminal vesicle were located in semithin sections, ultrathin sections were made using a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome, placed on copper grids and double-stained with uranyl acetate and lead citrate according

to Reynolds (1963). To locate glycogen, gold grids were also prepared according to the Thiéry (1967) test. Ultrathin sections were examined using a JEOL 1010 transmission electron microscope operating at 80 kV.

Results

Spermiogenesis

Spermiogenesis process in *W. capitellata* is described in Figures 1–3. The differentiation zone marks the beginning of spermiogenesis. Both longitudinal and cross-sections show the elongation of a cytoplasmic projection bordered by sub-membranous cortical microtubules and containing a nucleus, two centrioles, an intercentriolar body, and mitochondria (Fig. 1a, b). The intercentriolar body is made up by six electron-dense layers alternating with electron lucent ones (Fig. 1c). In an early stage of the spermiogenesis process, both centrioles originate free flagella that grow orthogonally to a median cytoplasmic process (Fig. 1a). Posteriorly, the two flagella rotate and become parallel to the median cyto-

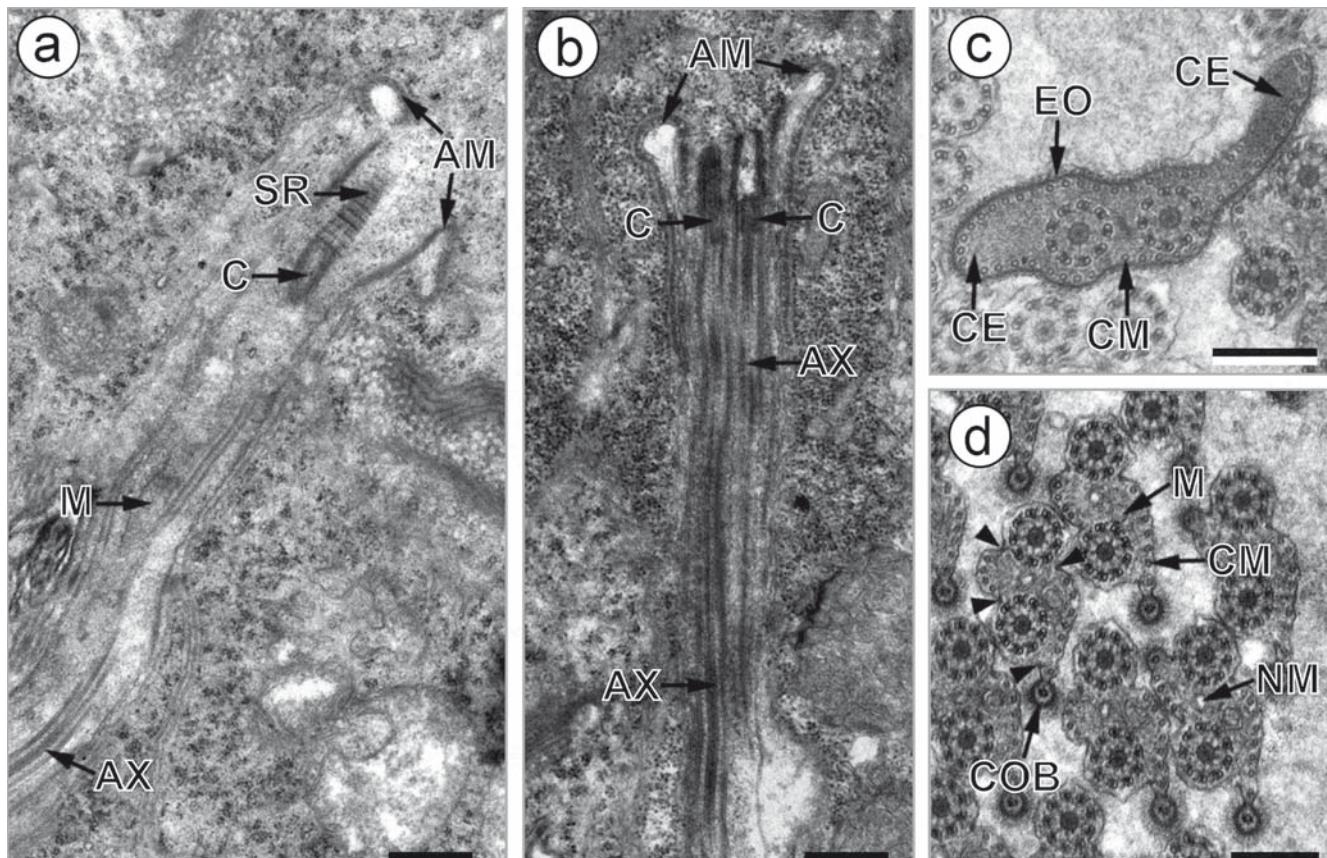


Fig. 2. Spermiogenesis of *Wardula capitellata*. **a.** Early stage of the constriction of the ring of arched membranes in which mitochondrion is observed in migration. **b.** Advanced stage of the arched membranes constriction characterized by absence of striated rootlets. **c.** Anterior region of the old spermatid showing cytoplasmic expansions and external ornamentation. **d.** Old spermatid with cytoplasmic ornamented buttons. Scale bars = 0.5 µm (a, b), 0.3 µm (c, d)

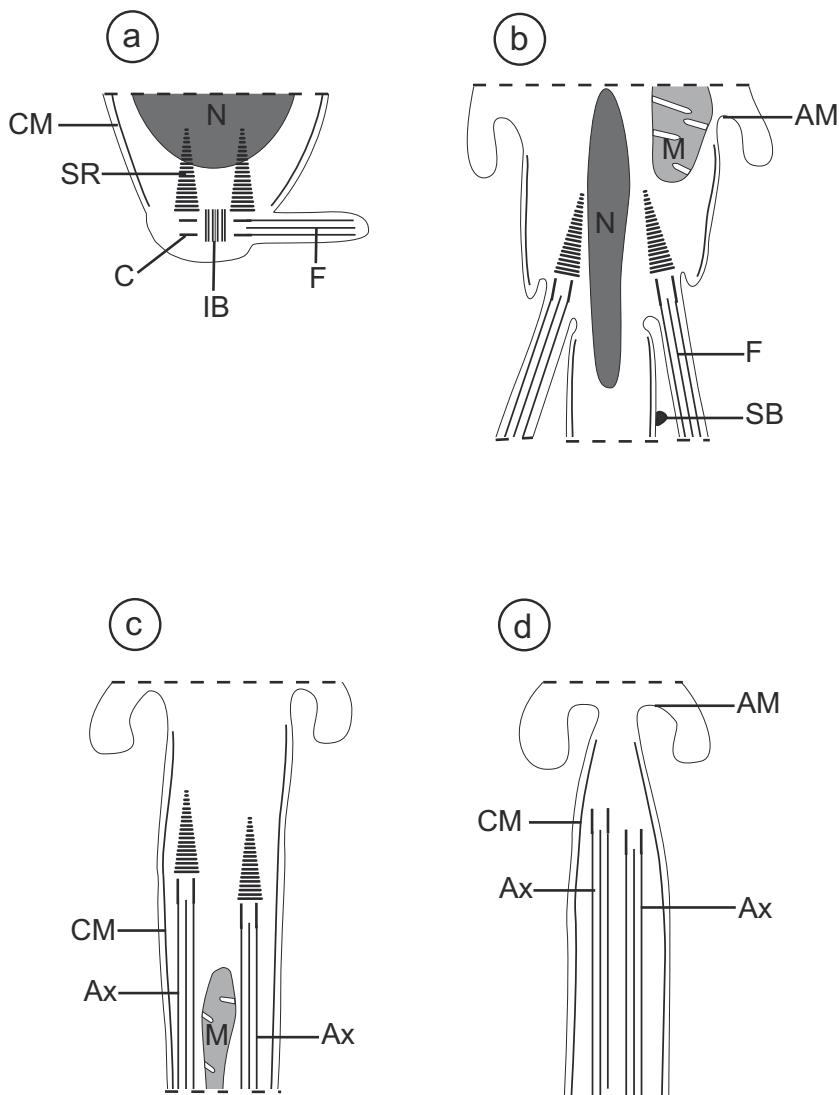


Fig. 3. Schematic reconstruction of the main stages of spermiogenesis in *Wardula capitellata*

plasmic process (Fig. 1c, d). Additionally, in this stage the nucleus is observed in migration toward the median cytoplasmic process while the mitochondria are still in the differentiation zone (Figs 1d, e; 3b). Before the fusion of flagella, the median cytoplasmic process exhibits electron-dense areas separating two parallel bundles of cortical microtubules (Fig. 1f, g). At this stage, it is also possible to observe a spinelike body in the median cytoplasmic process (Fig. 1g, h). Several observations of cross and longitudinal sections show that the nuclear migration occurs before the mitochondrial migration (Figs 1d, e; 2a and 3a, b). The final stage of spermiogenesis in *W. capitellata* is characterized by the constriction of the ring of arched membranes (Figs 2a, b; 3d). During the final stages of spermiogenesis, the mitochondrion is observed in migration and the striated rootlets disappear (Fig. 2a, b). Cross-sections of the young spermatozoon in the testicular tissue exhibit the presence of two cytoplasmic expansions

(Fig. 2c) and two cytoplasmic buttons (Fig. 2d). The latter structure, described for the first time, contains an internal element and exhibits external ornamentation. We propose the term cytoplasmic ornamented button (COB) for this newly described structure (Fig. 2d).

Spermatozoon

The observation of numerous ultrathin sections of the spermatozoon of *W. capitellata* allows us to distinguish three regions from the anterior to the posterior spermatozoon extremity (Figs 4–7).

Region I (Figs 4a-j, 6, 7I) corresponds to the anterior spermatozoon extremity and is characterized by the presence of external ornamentation of the plasma membrane, two lateral expansions and spinelike bodies. Moreover, two axonemes of the 9 + 1' pattern of trepaxonematan Platyhelminthes and par-

allel cortical microtubules are also present. Between the anterior tip of the spermatozoon and region II it is possible to distinguish several areas:

(a) area containing two lateral expansions, a continuous layer of parallel cortical microtubules, external ornamentation and spinelike bodies (Figs 4a-c, i, 7I). It is interesting to remark the absence of attachment zones in this area.

(b) area containing one or two cytoplasmic ornamented buttons (Figs 4d-f, 7I). The four attachment zones are visible in this area (Fig. 4d) and the cortical microtubules are clearly arranged into two fields (Fig. 4d, e). The cytoplasmic ornamented buttons contain an electron-dense element centrally located. They present an electron-dense material in the internal surface of plasma membrane and also exhibit an external ornamentation (Fig. 4d-f).

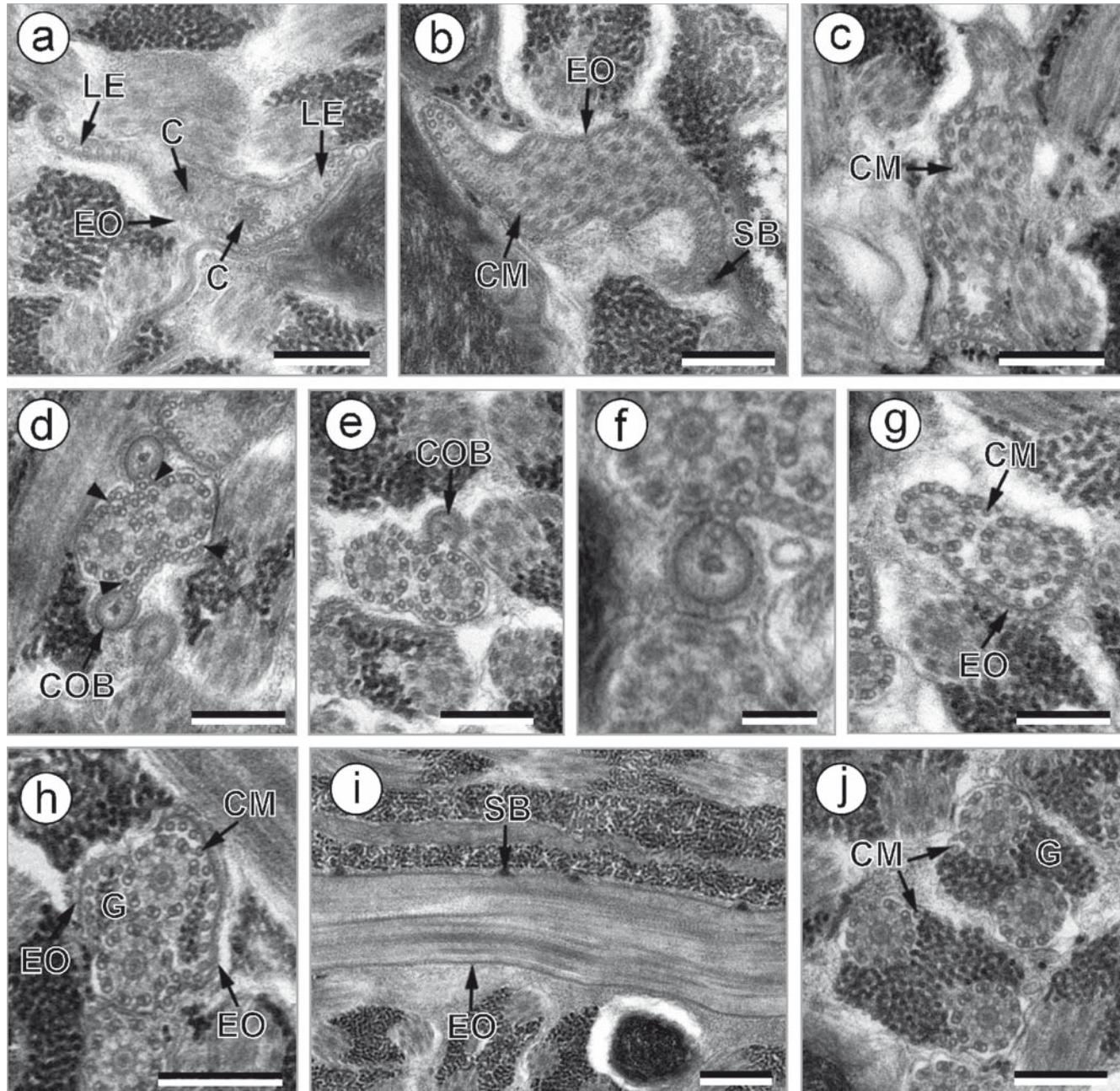


Fig. 4. Spermatozoon of *Wardula capitellata*. **a, b.** Anterior spermatozoon extremity with the two centrioles of the axonemes, external ornamentation, lateral expansions and spinelike body in a more posterior area when both axonemes are already formed. **c.** Cross-section showing reduced lateral expansions. **d, e.** Sections with two and one cytoplasmic ornamented buttons showing also attachment zones (arrowheads). **f.** Detail of a cytoplasmic ornamented button. **g, h.** Sections exhibiting external ornamentation of the plasma membrane associated with axonemes and cortical microtubules. **i.** Ornamented area showing several spinelike bodies. **j.** Cross-section with only two axonemes, cortical microtubules and granules of glycogen. Scale bars = 0.1 µm (f), 0.3 µm (a-e, g, h, j), 0.5 µm (i)

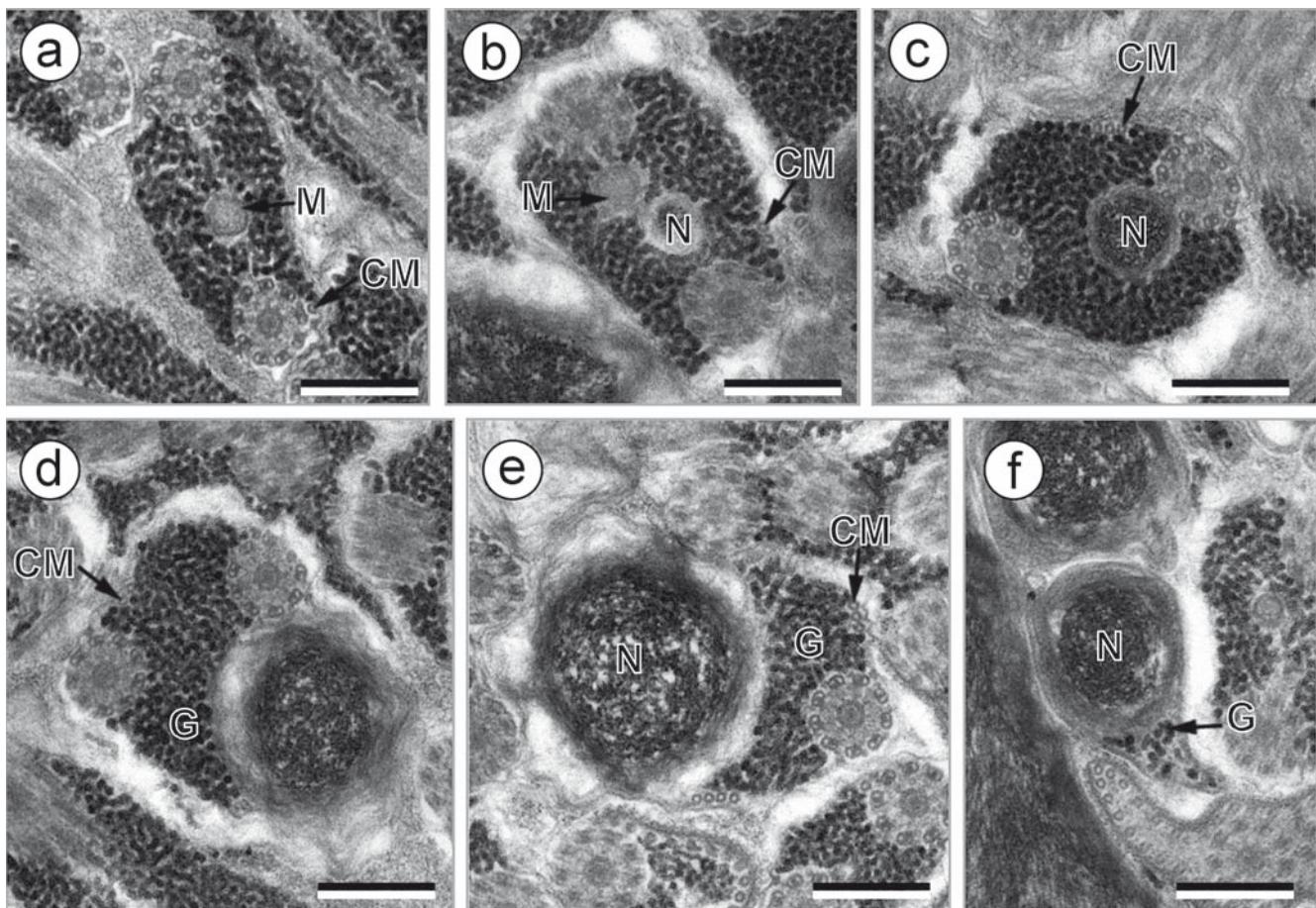


Fig. 5. Spermatozoon of *Wardula capitellata*. **a.** Mitochondrial region. **b.** Cross-section at the mitochondrial level characterized by the appearance of the nucleus. **c, d.** Consecutive cross-sections in region III showing the central and eccentric position of the nucleus. **e.** Section exhibiting one axoneme, nucleus, few cortical microtubules and granules of glycogen. **f.** Posterior spermatozoon tip containing only the nucleus and granules of glycogen. Scale bars = 0.3 µm (a-f)

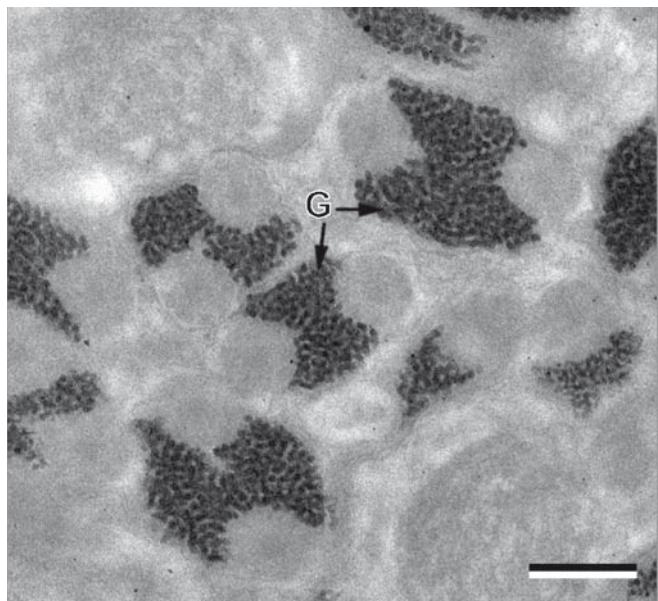
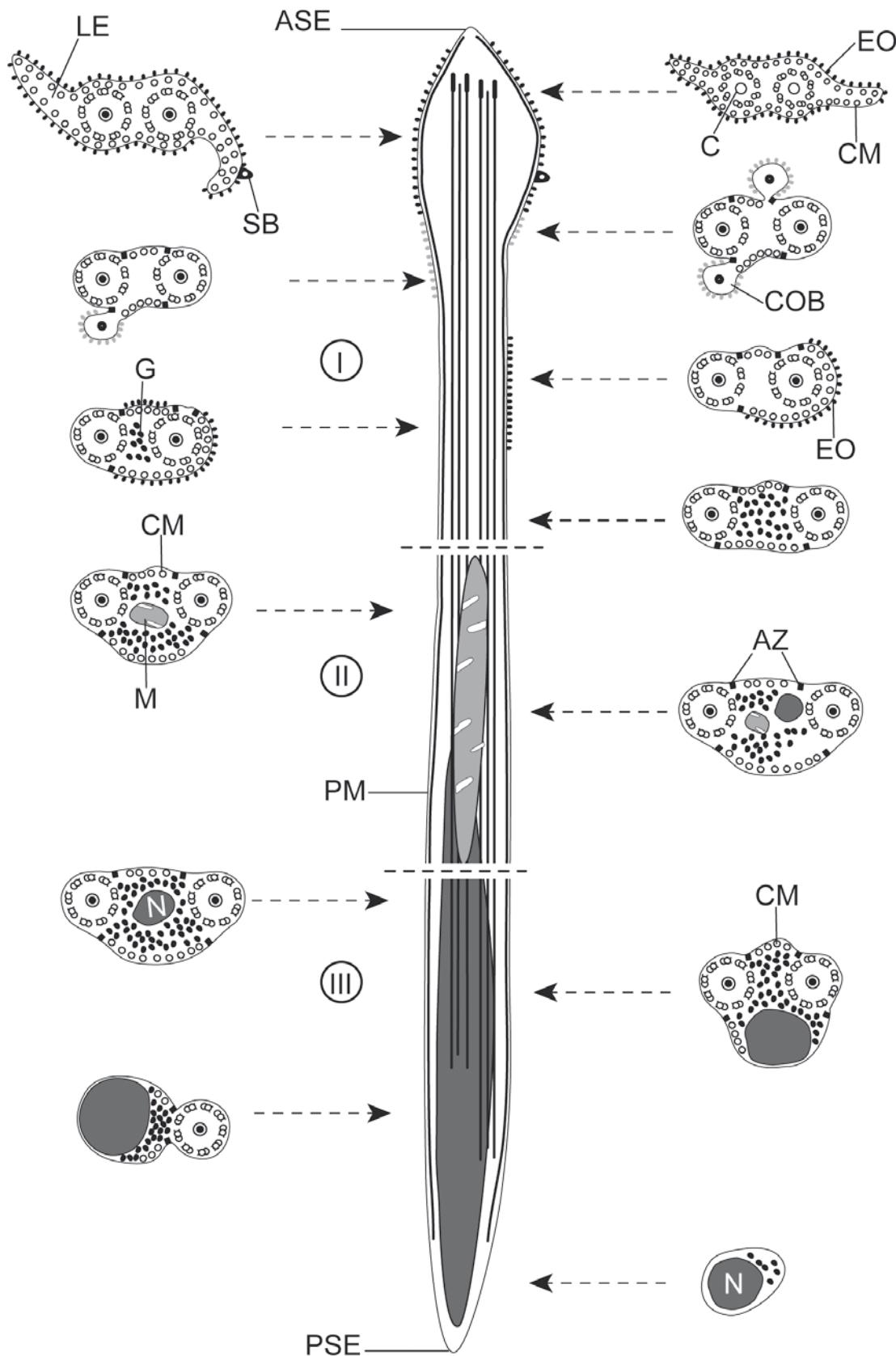


Fig. 6. Visualization of the granules of glycogen by the Thiéry methodology (1967)

(c) posterior area presenting external ornamentation associated to the cortical microtubules, with the progressive presence of granules of glycogen and disappearance of the external ornamentation (Figs 4g, h, j, 6).

Region II (Figs 5a, b, 7II) is the mitochondrial region. It begins with the appearance of the mitochondrion, while exhibiting both axonemes, cortical microtubules and granules of glycogen (Figs 5a, 7II). In posterior areas of region II the nucleus appears and thus, the spermatozoon exhibits both nucleus and mitochondrion (Figs 5b, 7II). The transition from region II towards region III is marked by the disappearance of the mitochondrion.

Region III (Figs 5c-f, 7III) corresponds to the posterior spermatozoon extremity, characterized in its proximal area by the presence of nucleus, two axonemes, cortical microtubules and granules of glycogen (Figs 5c and 7III). In the anterior part of this region the nucleus is located between the axonemes (Fig. 5c) and later, it becomes eccentric (Fig. 5d). Towards the posterior tip of the sperm cell the first axoneme (Fig. 5e), then the second axoneme and the cortical microtubules disappear (Fig. 5f). Areas near the posterior tip ex-

**Fig. 7.** Attempted reconstruction of the spermatozoon of *Wardula capitellata*

hibit a reduced section of nucleus and some granules of glycogen (Fig. 5f).

Discussion

Spermiogenesis

The spermiogenesis process of *Wardula capitellata* does not differ significantly from those of other digenean species described until now, even though some peculiarities were detected. As described in the present study, most digeneans present a spermiogenesis process characterized by the formation of a differentiation zone containing two centrioles that give rise to two free flagella growing orthogonally to the median cytoplasmic process, becoming parallel after rotation and fusing proximodistally with the median cytoplasmic process. The flagellar rotation of 90° described in *W. capitellata*, has been reported in most digeneans: e.g. *Haematoloechus medioplexus*, *Fasciola gigantica*, *Neoapocreadium chabaudi* or *Diplodiscus subclavatus* (Justine and Mattei 1982, Ndiaye et al. 2004, Kacem et al. 2010, Bakhoum et al. 2011a). However, some recent studies have described flagellar rotations greater than 90°. It is the case of *Helicometra fasciata*, *Monorchis parvus*, *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium hospes*, *Nicolla wisniewskii* or *Crepidostomum metoecus* (Ndiaye et al. 2003; Levron et al. 2003, 2004a; Agostini et al. 2005; Quilichini et al. 2007a, b).

In *W. capitellata*, spinelike bodies were observed in an early stage of spermiogenesis before the proximodistal fusion. In fact, spinelike bodies are observed associated with the plasma membrane of the median cytoplasmic process before the fusion of the flagella and also after the fusion of both flagella with this median cytoplasmic process. Such description and location of spinelike bodies have been reported recently in the spermiogenesis of *D. subclavatus* and *Rubenstremma exasperatum* (see Bakhoum et al. 2011a, b). Thus, in these species the formation of spinelike bodies occurs in an early phase of spermiogenesis.

During spermiogenesis and before proximodistal fusion, several mitochondria and the nucleus migrate toward the median cytoplasmic process. In most digeneans mitochondria migrate after the nucleus as postulated by Burton (1972). Such a migration is observed in *W. capitellata*. In fact, when the nucleus migrates toward the median cytoplasmic process, the mitochondria are still in the differentiation zone. Moreover, in several sections during the final stages of spermiogenesis, the mitochondrion is observed in migration. Contrarily, a mitochondrial migration before nuclear migration has been reported in the spermiogenesis of *Dicrocoelium dendriticum* (Cifrian et al. 1993), *Postorchigenes gymnesicus* (Gracenea et al. 1997) and *R. exasperatum* (Bakhoum et al. 2011b).

The intercentriolar body is another structure of great phylogenetic interest present in the differentiation zone. In general the intercentriolar body in digeneans presents seven electron-

dense layers morphologically formed by a fine central one and three external layers on each side. For example, seven electron-dense layers were described in the paramphistomoids *Paramphistomum microbothrium*, *Cotylophoron cotylophorum*, *Carmyerius endopapillatus*, *Basidiodiscus ectorchus*, *Sandonia sudanensis* and *D. subclavatus* (Ashour et al. 2007; Seck et al. 2007, 2008a, b; Bakhoum et al. 2011a), the al-locreadiid *C. metoecus* (Quilichini et al. 2007b), or the opecoelids *Opecoeloides furcatus* (Miquel et al. 2000), and *Poracanthium furcatum* (Levron et al. 2004b). Intercentriolar bodies composed of nine electron-dense layers are described in *Cryptocotyle lingua* (Rees 1979) and *M. parvus* (Levron et al. 2004a) and others composed of six layers in *Deropristis inflata* by Foata et al. (2007). In *W. capitellata* the intercentriolar body is composed of six electron-dense layers. However, the intercentriolar body may contain a seventh very thin central band, which is not clearly visible due to the orientation and level of sections.

According to Burton (1972) the intercentriolar body and also the striated rootlets participate in the stabilization of the differentiation zone, where the intercentriolar body serves as a reserve of material for microtubule polymerization. Phylogenetically, this structure is considered a plesiomorphic character present in Digenea and also in most Cestoda, except for some Tetrabothriidea and some Cyclophyllidea (Justine 1998, 2001). Moreover, there is a progressive reduction of this character in more evolved taxa of the Cestoda (see Miquel et al. 1999, Bruňanská et al. 2005). Variations in intercentriolar bodies should be further assessed considering its potential importance to the phylogenetic analysis of Digenea.

Spermatozoon

Presently, the ultrastructural organization of digenean spermatozoa cannot be described as homogeneous. In fact, recent descriptions emphasise the variability of many characters such as spinelike bodies, number of mitochondria, lateral expansions, distribution of cortical microtubules or morphology of both spermatozoon extremities.

The anterior spermatozoon extremity of *W. capitellata* is characterized by the presence of two axonemes (slightly longitudinally shifted) of the 9 + '1' trepanematan pattern. In this anterior extremity there are two lateral expansions with external ornamentation and the centrioles are surrounded by a continuous layer of cortical microtubules. Two slightly longitudinally shifted axonemes have been reported for example, in *H. medioplexus* (Justine and Mattei 1982), *Metorchis orientalis* (Liu and Pan 1990), *Echinostoma caproni* (Iomini and Justine 1997), *Nicolla testibliquum* (Quilichini et al. 2007c) or *R. exasperatum* (Bakhoum et al. 2011b). However, the particularity of *W. capitellata* sperm is the presence of two lateral expansions at centriolar level. Such an anterior tip exhibiting both axonemes is rare in digenean spermatozoa. In fact, most species described until now present only one axoneme as in *P. gymnesicus*, *Anisocoelium capitellatum* or

D. subclavatus (Gracenea et al. 1997, Ternengo et al. 2009, Bakhoun et al. 2011a).

Considering the presently available data, there are several ultrastructural characters which are typical of anterior areas of the male gamete of digeneans, such as centrioles, the external ornamentation of the plasma membrane, lateral expansions, spinelike bodies, mitochondrion (in the case of species with more than one mitochondrion) as well as the lack of glycogen granules. In the present study, we describe a new character in this region of sperm cells, the so-called cytoplasmic ornamented buttons.

The centrioles mark the beginning of the axonemes and their observation in cross-section gives real evidence for the localization of electron micrographs. Thus, they would be good and unequivocal elements for determining the anterior spermatozoon tip. Moreover, in the case of species showing one axoneme in both spermatozoon extremities, such as *Troglotrema acutum* (Miquel et al. 2006), the observation of the centriole is useful when differentiating anterior and posterior spermatozoon extremities.

Another structure observed in the anterior region of the sperm cell is the external ornamentation of the plasma membrane. It is associated with cortical microtubules and also with spinelike bodies in some cases. It represents a character of great phylogenetic importance in the spermatozoon of digeneans. The external ornamentation is located in the anterior area of the spermatozoon, generally in the mitochondrial side (ventral side) of the sperm cell. However, certain authors have described an external ornamentation associated with one of the axonemes in the anterior extremity of the spermatozoon. This is the case of *H. medioplexus*, *M. parvus*, *Pronoprymna ventricosa* and *N. chabaudi* (Justine and Mattei 1982, Levron et al. 2004a, Quilichini et al. 2007d, Kacem et al. 2010).

In some digeneans with several mitochondria, the external ornamentation is observed in the area containing the first mitochondrion (see Agostini et al. 2005, Miquel et al. 2006 or Bakhoun et al. 2011b).

In *W. capitellata*, the external ornamentation appears in two distinct areas: (a) in the region of the lateral expansions and (b) in another area containing only the axonemes and granules of glycogen. The external ornamentation associated with lateral expansions was also observed in final stages of spermiogenesis. According to Justine and Mattei (1982), it corresponds to external ornamentation belonging to the differentiation zone and, thus it is accompanied by a continuous layer of cortical microtubules and by the lack of attachment zones. The other type of external ornamentation, although morphologically similar to the first type, is probably formed in more advanced stages of spermiogenesis at more distal areas, where the proximodistal fusion has occurred. Consequently, this second type of ornamentation is associated with other structures such as attachment zones.

Concerning the lateral expansions, in *W. capitellata* these are observed in the anterior spermatozoon extremity associated with other characters such as cortical microtubules, ex-

ternal ornamentation and spinelike bodies. Lateral expansions are described in numerous digeneans. Between these species it is remarkable its description in all the paramphistomoid species studied until now including *C. corylophorum*, *P. microbothrium*, *C. endopapillatus*, *B. ectorchus*, *S. sudanensis* and *D. subclavatus* (Ashour et al. 2007; Seck et al. 2007, 2008a, b; Bakhoun et al. 2011a). It is interesting to notice that several authors (see Cribb et al. 2001, Olson et al. 2003) have nested the Mesometridae (which includes *W. capitellata*) within the Paramphistomoidea. Thus, these lateral expansions would be a good character for justifying the proximity of these taxa. However, there are different morphologies of lateral expansions in the digeneans such as in *H. fasciata*, *Scaphiostomum palaearcticum* or *T. acutum* (Ndiaye et al. 2002, Levron et al. 2003, Miquel et al. 2006). The presence and variability of lateral expansions in mature spermatozoa of digeneans should be analysed carefully due to their potential phylogenetic interest.

In the present study we describe cytoplasmic ornamented buttons for the first time. Their appearance seems to be related with the reduction and disappearance of the lateral expansions. The cytoplasmic ornamented buttons appear to be formed by an internal electron-dense element surrounded by ornamented cytoplasmic membrane. However, these ornateations seem to be different from those observed on lateral expansions. Considering that this is the first report of this structure, more studies are needed to verify its importance to phylogenetic studies.

Generally, digeneans present external ornamentation also present spinelike bodies, as observed in *W. capitellata*. However, some species exhibit external ornamentation without spinelike bodies, e.g. *M. parvus* (Levron et al. 2004a), *P. ventricosa* (Quilichini et al. 2007d), or *Euryhelmis squamula* (Bakhoun et al. 2009). With respect to spinelike bodies, it is interesting to notice their formation during spermiogenesis. In *W. capitellata*, spinelike bodies appear before the fusion of the flagella with the median cytoplasmic process as observed in *D. subclavatus* and *R. exasperatum* (Bakhoun et al. 2011a, b). In the first report of spinelike bodies during spermiogenesis (Miquel et al. 2000), these structures were observed only in old spermatids when both flagella were already fused with the median cytoplasmic process.

With respect to the distribution of spinelike bodies along the spermatozoon, *O. furcatus* (Miquel et al. 2000) and *F. gigantica* (Ndiaye et al. 2004) show a periodicity of spinelike bodies of 1 µm, *P. furcatum* (Levron et al. 2004b) a periodicity of 0.7 µm, and *N. wisniewskii* (Quilichini et al. 2007a) a periodicity of 0.6 µm. However, due to their irregular distribution no periodicity is observed in *W. capitellata* as in many other digeneans (see Bakhoun et al. 2011a). This character will probably be a good tool in elucidating the relationships between digeneans at the family, superfamily or order level.

One mitochondrion is observed in the spermatozoon of most digeneans as occurs in *W. capitellata*. This is the case of *Brachylaima aequans*, *O. furcatus*, *F. gigantica* or *D. sub-*

clavatus (Ždárská *et al.* 1991; Miquel *et al.* 2000; Ndiaye *et al.* 2004; Bakhoum *et al.* 2011a). Other digeneans exhibit two mitochondria, one being located at the level of the ornamented region and the other in the area containing the nucleus. This is the case of the opecoelids *P. furcatum*, *N. wisniewskii*, *N. testiobliquum* (Levron *et al.* 2004b; Quilichini *et al.* 2007a, c), the dicrocoeliid *D. hospes* (Agostini *et al.* 2005), the troglotrematid *T. acutum* (Miquel *et al.* 2006), the apocreadiid *N. chabaudi* (Kacem *et al.* 2010) or the omphalometrid *R. exasperatum* (Bakhoum *et al.* 2011b). Additionally, a spermatozoon with three mitochondria has recently been described in *B. ectorchus*, *S. sudanensis*, *A. capitellatum* and *E. squamula* (Ashour *et al.* 2007, Bakhoum *et al.* 2009, Ternengo *et al.* 2009). Thus, the variation in the number of mitochondria in the mature spermatozoon could contribute to the interpretation of relationships at family level. It must be emphasized that the absence of mitochondria is considered a synapomorphy in some cestodes (Eucestodes) (Justine 1995) and its presence in basal cestodes (Gyrocytidae and Amphelinidea) and in other neodermatans (monogeneans, digeneans) is considered an ancestral or plesiomorphic character.

The distribution of glycogen granules along the spermatozoon of digenean species is not well documented. Nonetheless, in most digeneans studied until now glycogen granules are absent from the anterior tip of the spermatozoon. Also, in *W. capitellata* no glycogen granules were observed in the anterior extremity of the mature spermatozoon. The presence/absence of this character allows identifying those cross-sections which belong to the anterior extremity of the mature spermatozoon.

The morphology of the posterior extremity of the spermatozoon is variable. According to Quilichini *et al.* (2010a) three principal types of posterior spermatozoon extremities could be observed in digenean spermatozoa considering the succession of several characters. Those are (a) the type 1 (or opecoelidean type), characterized by a posterior extremity containing cortical microtubules, (b) the type 2 (or fasciolidean type), exhibiting only the nucleus and (c) the type 3 (or cryptogonimidean type) presenting a posterior tip containing the second axoneme. In *W. capitellata* the posterior spermatozoon extremity corresponds to the type 2, containing only nucleus and granules of glycogen. However, several species present posterior extremities that do not concur with any of the postulated types. This is the case of the spermatozoon of *D. subclavatus* (Bakhoum *et al.* 2011a) and other paramphistomoids that present the nucleus and some cortical microtubules in the posterior tip (see Seck *et al.* 2007, 2008a).

Another unique morphological pattern has recently been observed in the spermatozoon of *Aponurus laguncula* (Quilichini *et al.* 2010b), which presents a mitochondrion that reaches the posterior spermatozoon extremity along with both axonemes. Subsequently, it would be more interesting to consider the terminal character only rather than the succession of characters observed in the posterior spermatozoon tip in order to overcome the minimal variations described in the posterior

spermatozoon extremities of some species. Finally, the variability of the posterior spermatozoon extremity would be very useful to separate digeneans at family level.

Acknowledgements. Authors wish to thank Núria Cortadellas and Almudena García from the “Unitat de Microscòpia, Facultat de Medicina, Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB)” for their support in the preparation of samples. This study was partially supported by the PCI project (no. A/030039/10) of the “Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID)”. A.J.S. Bakhoum benefits from a MAEC-AECID doctoral grant (2010-11, no. 0000538055).

References

- Agostini S., Miquel J., Ndiaye P.I., Marchand B. 2005. *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 (Digenea, Dicrocoeliidae): spermiogenesis, mature spermatozoon and ultrastructural comparative study. *Parasitology Research*, 96, 38–48. DOI: 10.1007/s00436-005-1318-6.
- Ashour A.A., Garo K., Gamil I.S. 2007. Spermiogenesis in two paramphistomes from Nile fish in Egypt: an ultrastructural study. *Journal of Helminthology*, 81, 219–226. DOI: 10.1017/S0022149X07409816.
- Bakhoum A.J.S., Bâ C.T., Fournier-Chambrillon C., Torres J., Fournier P., Miquel J. 2009. Spermatozoon ultrastructure of *Euryhelmis squamula* (Rudolphi, 1819) (Digenea, Opisthorchiidae, Heterophyidae), an intestinal parasite of *Mustela vison* (Carnivora, Mustelidae). *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, 1, 32–45.
- Bakhoum A.J.S., Torres J., Shimalov V.V., Bâ C.T., Miquel J. 2011a. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) (Paramphistomoidea, Diplodiscidae), an intestinal fluke of the pool frog *Rana lessonae*. *Parasitology International*, 60, 64–74. DOI: 10.1016/j.parint.2010.10.006.
- Bakhoum A.J.S., Bâ C.T., Shimalov V.V., Torres J., Miquel J. 2011b. Spermatological characters of the digenean *Rubenstrema exasperatum* (Rudolphi, 1819) (Plagiorchioidea, Omphalometridae). *Parasitology Research*, 108, 1283–1293. DOI: 10.1007/s00436-010-2178-2.
- Brooks D.R., O’Grady R.T., Glen D.R. 1985. Phylogenetic analysis of the Digenea (Platyhelminthes, Cercomeria) with comments on their adaptive radiation. *Canadian Journal of Zoology*, 63, 411–443.
- Bruňanská M., Scholz T., Ibraheem M.H. 2005. Spermiogenesis in the cestode *Corallobothrium solidum* Fritsch, 1886 (Proteocephalidea: Corallobothriinae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, 86, 55–61. DOI: 10.1111/j.0001-7272.2005.00186.x.
- Burton P.R. 1972. Fine structure of the reproductive system of a frog lung-fluke. III. The 376 spermatozoon and its differentiation. *Journal of Parasitology*, 58, 68–83.
- Cifrián B., García-Corrales P., Martínez-Alos S. 1993. Ultrastructural study of the spermatogenesis and mature spermatozoa of *Dicrocoelium dendriticum* (Plathelminthes, Digenea). *Parasitology Research*, 79, 204–212. DOI: 10.1007/BF00931894.
- Cribb T.H., Bray R.A., Littlewood D.T.J., Pichelin S., Herniou E.A. 2001. The Digenea. In: (Eds. D.J.T. Littlewood and R.A. Bray) *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, 168–185.
- Foata J., Quilichini Y., Marchand B. 2007. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Deropristis inflata* Molin, 1859 (Digenea, Deropristidae), a parasite of *Anguilla anguilla*. *Par-*

- asitology Research*, 101, 843–852. DOI: 10.1007/s00436-007-0550-7.
- Gracenea M., Ferrer J.R., González-Moreno O., Trullols M. 1997. Ultrastructural study of spermatogenesis and spermatozoon in *Postorchigenes gymnesicus* (Trematoda, Lecithodendriidae). *Journal of Morphology*, 234, 223–232. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4687(199712)234:3<223::AID-JMOR2>3.0.CO;2-A.
- Holliman R.B. 1961. Larval trematodes from the Apalachee Bay area, Florida, with checklist of known marine cercariae arranged in a key to their superfamilies. *Tulane Studies in Zoology*, 9, 2–72.
- Iomini C., Justine J.-L. 1997. Spermiogenesis and spermatozoon of *Echinostoma caproni* (Platyhelminthes, Digenea): transmission and scanning electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. *Tissue & Cell*, 29, 107–118. DOI: 10.1016/S0040-8166(97)80077-8.
- Jones A., Blair D. 2005. Superfamily Microscaphidioidea Looss, 1900. In: (Eds. A. Jones, R.A. Bray and D.I. Gibson) *Keys to the Trematoda*. CABI Publishing and The Natural History Museum, Wallingford, 189–219.
- Jousson O., Bartoli P. 1999. The life-cycle of three species of the Mesometridae (Digenea) with comments on the taxonomic status of this family. *Systematic Parasitology*, 44, 217–228. DOI: 10.1023/A:1006203806109.
- Justine J.-L. 1995. Spermatozoal ultrastructure and phylogeny of the parasitic Platyhelminthes. In: (Eds. B.G.M. Jamieson, J. Ausio and J.-L. Justine) *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 166, 55–86.
- Justine J.-L. 1998. Spermatozoa as phylogenetic characters for the Eucestoda. *Journal of Parasitology*, 84, 385–408. DOI: 10.2307/3284502.
- Justine J.-L. 2001. Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes. In: (Eds. D.T.J. Littlewood and R.A. Bray) *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, 231–238.
- Justine J.-L. 2003. Ultrastructure des spermatozoïdes et phylogénie des Neodermata. In: (Eds. C. Combes and J. Jourdan) *Classification, écologie et évolution des métazoaires parasites*. PUP, Perpignan, 359–380.
- Justine J.-L., Mattei X. 1982. Réinvestigation de l'ultrastructure du spermatozoïde d'*Haematoloechus* (Trematoda: Haematolöechidae). *Journal of Ultrastructure Research*, 81, 322–332.
- Kacem H., Bakhoun A.J.S., Neifar L., Miquel J. 2010. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the digenetic *Neoapocreadium chabaudi* (Apocreadiidae), a parasite of *Balistes capriscus* (Pisces, Teleostei). *Parasitology International*, 59, 358–366. DOI: 10.1016/j.parint.2010.04.008.
- La Rue G. 1957. The classification of digenetic Trematoda: a review and new system. *Experimental Parasitology*, 6, 306–349. DOI: 10.1016/0014-4894(57)90025-5.
- Levron C., Miquel J., Oros M., Scholz T. 2010. Spermatozoa of tape-worms (Platyhelminthes, Eucestoda): advances in ultrastructural and phylogenetic studies. *Biological Reviews*, 85, 523–543. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2009.00114.x.
- Levron C., Ternengo S., Marchand B. 2003. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Helicometra fasciata* (Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Labrus merula* (Pisces, Teleostei). *Acta Parasitologica*, 48, 255–264.
- Levron C., Ternengo S., Marchand B. 2004a. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Monorchis parvus* Looss, 1902 (Digenea, Monorchiidae), a parasite of *Diplodus annularis* (Pisces, Teleostei). *Parasitology Research*, 93, 102–110. DOI: 10.1007/s00436-004-1115-7.
- Levron C., Ternengo S., Marchand B. 2004b. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Poracanthium furcatum* (Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mullus surmuletus* (Pisces, Teleostei). *Acta Parasitologica*, 49, 190–200.
- Liu Y., Pan Y. 1990. Electron microscope studies of *Metorchis* (sic) *orientalis*. III. The spermatozoa and spermatogenesis. *Journal of Shanghai Agriculture College*, 8, 57–62.
- Miquel J., Feliu C., Marchand B. 1999. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Mesocestoides litteratus* (Cestoda, Mesocestoididae). *International Journal for Parasitology*, 29, 499–510. DOI: 10.1016/S0020-7519(98)00202-1.
- Miquel J., Fournier-Chambrillon C., Fournier P., Torres J. 2006. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the cranial digenetic *Troglotrema acutum* (Leuckart, 1842). *Journal of Parasitology*, 92, 441–453. DOI: 10.1645/GE-743R.1.
- Miquel J., Nourrisson C., Marchand B. 2000. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Opecoeloides furcatus* (Trematoda, Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mulhus barbatus* (Pisces, Teleostei). *Parasitology Research*, 86, 301–310. DOI: 10.1007/s004360050047.
- Ndiaye P.I., Miquel J., Bâ C.T., Feliu C., Marchand B. 2002. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Scaphiostomum palaearcticum* Mas-Coma, Esteban et Valero, 1986 (Trematoda, Digenea, Brachylaimidae). *Acta Parasitologica*, 47, 259–271.
- Ndiaye P.I., Miquel J., Bâ C.T., Marchand B. 2004. Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of the liver fluke *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856 (Digenea, Fasciolidae), a parasite of cattle in Senegal. *Journal of Parasitology*, 90, 30–40. DOI: 10.1645/GE-3171.
- Ndiaye P.I., Miquel J., Fons R., Marchand B. 2003. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the liver fluke *Fasciola hepatica* L., 1758 (Digenea, Fasciolidae): scanning and transmission electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. *Acta Parasitologica*, 48, 182–194.
- Olson P.D., Cribb T.H., Tkach V.V., Bray R.A., Littlewood D.T.J. 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology*, 33, 733–755. DOI: 10.1016/S0020-7519(03)00049-3.
- Quilichini Y., Foata J., Justine J.-L., Bray R.A., Marchand B. 2010a. Ultrastructural study of the spermatozoon of *Heterolebes maculosus* (Digenea, Opistholebetidae), a parasite of the porcupinefish *Diodon hystrix* (Pisces, Teleostei). *Parasitology International*, 59, 427–434. DOI: 10.1016/j.parint.2010.06.002.
- Quilichini Y., Foata J., Justine J.-L., Bray R.A., Marchand B. 2010b. Spermatozoon ultrastructure of *Aponurus laguncula* (Digenea: Lecithasteridae), a parasite of *Aluterus monoceros* (Pisces, Teleostei). *Parasitology International*, 59, 22–28. DOI: 10.1016/j.parint.2009.06.007.
- Quilichini Y., Foata J., Marchand B. 2007c. Ultrastructural study of the spermatozoon of *Nicolla testiobliquum* (Digenea, Opecoelidae) parasite of brown trout *Salmo trutta* (Pisces, Teleostei). *Parasitology Research*, 101, 1295–1301. DOI: 10.1007/s00436-007-0636-2.
- Quilichini Y., Foata J., Marchand B. 2007d. Ultrastructural study of the spermatozoon of *Pronoprymna ventricosa* (Digenea, Baccigerinae), parasite of the twaite shad *Alosa fallax* Lacepede (Pisces, Teleostei). *Parasitology Research*, 101, 1125–1130. DOI: 10.1007/s00436-007-0599-3.
- Quilichini Y., Foata J., Orsini A., Marchand B. 2007a. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Nicolla wisniewskii* (Digenea: Opecoelidae), an intestinal parasite of brown trout *Salmo trutta* (Pisces: Teleostei). *Journal of Parasitology*, 93, 469–478. DOI: 10.1645/GE-1085R.1.
- Quilichini Y., Foata J., Orsini A., Marchand B. 2007b. Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon of *Crepidostomum metoecus* (Digenea: Allocreadiidae), a parasite of

- Salmo trutta* (Pisces: Teleostei). *Journal of Parasitology*, 93, 458–468. DOI: 10.1645/GE-1045R.1.
- Rees F.G. 1979. The ultrastructure of the spermatozoon and spermogenesis in *Cryptocotyle lingua* (Digenea: Heterophyidae). *International Journal for Parasitology*, 9, 405–419. DOI: 10.1016/0020-7519(79)90044-4.
- Reynolds E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17, 208–212.
- Seck M.T., Marchand B., Bâ C.T. 2007. Ultrastructure of spermogenesis and the spermatozoon of *Paramphistomum microbohrium* (Fischøeder 1901; Digenea, Paramphistomidae), a parasite of *Bos taurus* in Senegal. *Parasitology Research*, 101, 259–268. DOI: 10.1007/s00436-007-0503-1.
- Seck M.T., Marchand B., Bâ C.T. 2008a. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Cotylophoron cotylophorum* (Trematoda, Digenea, Paramphistomidae), a parasite of *Bos taurus* in Senegal. *Parasitology Research*, 103, 157–166. DOI: 10.1007/s00436-008-0944-1.
- Seck M.T., Marchand B., Bâ C.T. 2008b. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Carmyerius endopapillatus* (Digenea, Gasstrothylacidae), a parasite of *Bos taurus* in Senegal. *Acta Parasitologica*, 53, 9–18. DOI: 10.2478/s11686-008-0006-y.
- Ternengo S., Quilichini Y., Katharios P., Marchand B. 2009. Sperm ultrastructure of the gall bladder fluke *Anisocoelium capitatum* (Digenea: Cryptogonimidae), a parasite of *Uranoscopus scaber* (Pisces: Uranoscopidae). *Parasitology Research*, 104, 801–807. DOI: 10.1007/s00436-008-1259-y.
- Thiéry J.P. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *Journal of Microscopy*, 6, 987–1018.
- Ždářská Z., Soboleva T.N., Štěrba J., Valkounová J. 1991. Ultrastructure of the male reproductive system of the trematode *Brachylaimus aequans*. *Folia Parasitologica*, 38, 33–37.

(Accepted January 05, 2012)

QUATRIÈME CHAPITRE :

DISCUSSION

IV-Discussion

IV-1 Analyse globale des données ultrastructurales de la spermiogenèse et du spermatozoïde des Digènes

Une actualisation de la base de données ultrastructurales chez les Digènes, nous a permis d'établir un tableau général comparatif de l'ensemble des espèces étudiées à notre connaissance (Tableau 2).

Tableau 2 : Principaux caractères d'intérêt phylogénétique analysés chez les Digènes. Ax : axonème de type 9+1' des Trepaxonemata, BCO : boutons cytoplasmiques ornements, CE : corps épineux, CI : nombre de bandes du corps intercentriolaire, EAS : extrémité antérieure du spermatozoïde, EL : expansion latérale, EPS : extrémité postérieure du spermatozoïde, M : nombre de mitochondries, MC : microtubules corticaux, MO : matériel opaque aux électrons, N : noyau, RF : angle de la rotation flagellaire, ZA : zones d'attachement, ? : donnée non disponible, +/- : présence/absence du caractère considéré

| | CI | ZA | RF | OE | EL | BCO | CE | M | EAS | EPS | Références |
|-------------------------------------|-----|----|------|----|------------------|-----|----|---|--------------------|-------|---------------------------------------|
| ECHINOSTOMATOIDEA | | | | | | | | | | | |
| Echinostomatidae | + | 4 | + | + | - | - | - | 1 | 2Ax ⁽¹⁾ | 1Ax+N | Iomini & Justine (1997) |
| <i>Echinostoma caproni</i> | | | | | | | | | | | |
| Fasciolidae | 7 | 4 | 90° | + | + | - | + | 1 | 1Ax | N | Ndiaye <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Fasciola gigantica</i> | | | | | | | | | | | Ndiaye <i>et al.</i> (2003a) |
| <i>Fasciola hepatica</i> | 7 | 4 | 120° | + | + | - | + | 2 | 1Ax | N | |
| HAPLOPOROIDEA | | | | | | | | | | | |
| Haploporidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Saccoceloides godoyi</i> | + | 4 | 90° | + | + | - | - | 1 | ? | ? | Baptista-Farias <i>et al.</i> (2001) |
| MICROSCAPHIDIOIDEA | | | | | | | | | | | |
| Mesometridae | | | | | | | | | | | |
| <i>Elstia stossichianum</i> | 7 | 4 | 90° | + | + ⁽²⁾ | + | + | 1 | 2Ax | N | Bakhoum <i>et al.</i> (sous presse a) |
| <i>Wardula capitellata</i> | 6-7 | 4 | 90° | + | + | + | + | 1 | 2Ax | N | Bakhoum <i>et al.</i> (2012a) |
| PARAMPHISTOMOIDEA | | | | | | | | | | | |
| Cladorchidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Basidiodes ectorchis</i> | 7 | 4 | 90° | + | + | - | - | 3 | 1Ax | N | Ashour <i>et al.</i> (2007) |
| <i>Sandonia sudanensis</i> | 7 | 4 | 90° | + | + | - | - | 3 | 1Ax | N | Ashour <i>et al.</i> (2007) |
| Diplodiscidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Diplodiscus subclavatus</i> | 7 | 4 | 90° | + | + | - | + | 1 | 1Ax | N | Bakhoum <i>et al.</i> (2011b) |
| Gastrothylacidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Carmyrius endopapillatus</i> | 7 | 4 | 90° | + | + | - | + | 1 | 1Ax | N | Seck <i>et al.</i> (2008a) |
| Paramphistomidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Cotylophoron corylophorum</i> | 7 | 4 | 90° | + | + | - | + | 1 | 1Ax | N | Seck <i>et al.</i> (2008b) |
| <i>Orthocelium scoliocoelium</i> | ? | ? | ? | + | + | - | - | 1 | 1Ax | N | Li & Wang (1997), Swarnakar (2010) |
| <i>Paramphistomum microbothrium</i> | 7 | 4 | 90° | + | + | - | + | 1 | 1Ax | N | Seck <i>et al.</i> (2007) |

Tableau 2 : suite

| | CI | ZA | RF | OE | EL | BCO | CE | M | EAS | EPS | Références |
|----------------------------------|-----|----|------|----|---------------------|-----|----|---|--------------------|-------|---------------------------------------|
| PRONOCEPHALOIDEA | | | | | | | | | | | |
| Notocotylidae | 7 | 4 | 90° | + | - | - | + | 2 | 1Ax | 1Ax | Ndiaye <i>et al.</i> (2003b) |
| <i>Notocotylus neyrai</i> | | | | | | | | | | | |
| Pronocephalidae | ? | ? | ? | + | + | - | + | 1 | 1Ax+MO MC+OE | N | Ndiaye <i>et al.</i> (2011) |
| <i>Cricocephalus albus</i> | | | | | | | | | | | |
| <i>Pleurogonius truncatus</i> | ? | ? | ? | + | + | - | + | | | | Ndiaye <i>et al.</i> (2012a) |
| ALLOCREADIOIDEA | | | | | | | | | | | |
| Allocreadiidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Crepidostomum metocensis</i> | 7 | 4 | >90° | + | - | - | + | 2 | 1Ax | 1Ax | Quilichini <i>et al.</i> (2007a) |
| Opcoeliidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Helicomeira epinepheli</i> | 5-7 | 4 | 120° | - | ⁽³⁾ - | - | + | 2 | 1Ax | MC | Quilichini <i>et al.</i> (2011b) |
| <i>Helicomeira fasciata</i> | ? | ? | ? | + | - | - | - | 1 | 1Ax | N+MC | Levron <i>et al.</i> (2003) |
| <i>Nicolla testobilium</i> | 7 | 4 | >90° | + | - | - | + | 2 | 2Ax ⁽¹⁾ | MC | Quilichini <i>et al.</i> (2007d) |
| <i>Nicolla wisniewskii</i> | 7 | 4 | 90° | + | - | - | + | 2 | 1Ax | MC | Quilichini <i>et al.</i> (2007b) |
| <i>Opcoeloides furcatus</i> | 7 | 4 | 90° | + | ⁽³⁾ - | - | + | 1 | 1Ax | MC | Miquel <i>et al.</i> (2000) |
| <i>Poracanthium furcatum</i> | 7 | 4 | 90° | + | - | - | + | 2 | 1Ax | MC | Levron <i>et al.</i> (2004a) |
| Opistholebetidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Heterolebes maculosus</i> | | | | | | | | | | | |
| <i>Crepidostomum metocensis</i> | | | | | | | | | | | Quilichini <i>et al.</i> (2010b) |
| GORGODEROIDEA | | | | | | | | | | | |
| Brachycoeliidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Brachycoelium salamandrae</i> | 7 | 4 | 90° | + | - | - | + | 2 | 1Ax | N | Bakhoum <i>et al.</i> (sous presse b) |
| Dicrocoeliidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Corrigia vitta</i> | + | 4 | 90° | - | - | - | - | 1 | 1Ax | 1Ax | Robinson & Halton (1982) |
| <i>Dicrocoelium dendriticum</i> | + | 4 | 90° | - | - | - | - | 1 | 1Ax | 1Ax | Cifrian <i>et al.</i> (1993) |
| <i>Dicrocoelium hospes</i> | + | 4 | 120° | + | + | - | + | 2 | 1Ax | N | Agostini <i>et al.</i> (2005) |
| Mesocoeliidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Mesocoelium monas</i> | ? | 4 | ? | - | - | - | - | + | 1Ax | 1Ax+N | Iomini <i>et al.</i> (1997) |

Tableau 2 : suite

| | CI | ZA | RF | OE | EL | BCO | CE | M | EAS | EPS | Références |
|----------------------------------|----|----|-----|------------------|----|-----|----|---|-----------|-----|----------------------------------|
| Paragonimidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Paragonimus miyazakii</i> | ? | ? | ? | - | - | - | - | 1 | ? | ? | Sato <i>et al.</i> (1967) |
| <i>Paragonimus ohirai</i> | ? | ? | ? | + | - | - | + | 2 | 1Ax | 1Ax | Orido (1988) |
| <i>Paragonimus pulmonalis</i> | ? | ? | ? | - | - | - | - | ? | ? | ? | Fujino & Ishii (1982) |
| <i>Paragonimus westermani</i> | ? | ? | ? | - | - | - | - | ? | ? | ? | Fujino & Ishii (1982) |
| Troglotrematidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Troglotrema acutum</i> | 7 | 4 | 90° | + | + | - | + | 2 | 1Ax | 1Ax | Miquel <i>et al.</i> (2006) |
| LEPOCREADIOIDEA | | | | | | | | | | | |
| Apocreadiidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Neoapocreadium chabaudi</i> | 7 | 4 | 90° | + | - | - | + | 2 | 1Ax+OE+MC | N | Kacem <i>et al.</i> (2010a) |
| Deroprtistidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Deroprtis inflata</i> | 6 | 4 | 90° | + | - | - | - | 2 | 1Ax | 1Ax | Foata <i>et al.</i> (2007) |
| Gyliauchenidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Gyliauchen</i> sp. | | | | | | | | | | | |
| <i>Rophildolfusium fractum</i> | 7 | 4 | 90° | + | - | - | + | 1 | 1Ax+MO | 1Ax | Quilichini <i>et al.</i> (2011a) |
| Lepocreadiidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Leporchis micracanthum</i> | ? | ? | ? | + ⁽³⁾ | - | - | - | 2 | 1Ax+MO | N | Bakhoun <i>et al.</i> (2012b) |
| <i>Holorchis capitulum</i> | ? | ? | ? | + ⁽³⁾ | - | - | - | 1 | 1Ax+MO | 1Ax | Bâ <i>et al.</i> (2011) |
| <i>Hypocreadium capitulum</i> | | | | | | | | 2 | 1Ax+MO | 1Ax | Kacem <i>et al.</i> (2012) |
| MICROPHALLOIDEA | | | | | | | | | | | |
| Faustulidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Pronoprymma ventricosa</i> | ? | ? | ? | + | - | - | - | 1 | 1Ax | 1Ax | Quilichini <i>et al.</i> (2007c) |
| Lecithodendriidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Ganeo tigrinum</i> | ? | ? | ? | - | - | - | - | 1 | ? | 1Ax | Sharma & Rai (1995) |
| Microphallidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Maritrema linguilla</i> | + | 4 | 90° | - | - | - | - | 2 | ? | 1Ax | Hendow & James (1988) |
| <i>Microphallus primas</i> | + | 4 | ? | + | - | - | - | 1 | 2Ax | 1Ax | Castilho & Barandela (1990) |
| Phaneropsidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Postorchigenes gymnesicus</i> | 7 | 4 | 90° | + | - | - | - | 2 | 1Ax | 1Ax | Gracenea <i>et al.</i> (1997) |
| Prosthogonimidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Mediogonimus jourdanei</i> | 7 | 4 | 90° | + | - | - | - | 1 | 2Ax | 1Ax | Bakhoun <i>et al.</i> (2012c) |
| Zoogonidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Diphierostomum brusinae</i> | 7 | 4 | 90° | + | - | - | - | 1 | 1Ax | N | Levron <i>et al.</i> (2004c) |

Tableau 2 : suite

| | CI | ZA | RF | OE | EL | BCO | CE | M | EAS | EPS | Références |
|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|----------|------------|------------|---|
| MONORCHIOIDEA | | | | | | | | | | | |
| Monorchidae | 9 | 4 | 120° | + | - | - | - | 2 | 2AX | 1AX+N | Levron <i>et al.</i> (2004b) |
| <i>Monorchis parvus</i> | | | | | | | | | | | |
| OPISTHORCHIOIDEA | | | | | | | | | | | |
| Cryptogonimidae | ? | ? | ? | + | - | - | + | 2 | 1AX | 1AX | Quilichini <i>et al.</i> (2009) |
| <i>Adlardia novaecaledoniae</i> | ? | ? | ? | + | - | - | + | 3 | 1AX | 1AX | Ternengo <i>et al.</i> (2009) |
| <i>Anisocoelium capitellatum</i> | ? | 4 | ? | + | ? | - | + | 1 | ? | ? | Justine (1995) |
| <i>Aphalloides coelomicola</i> | ? | ? | ? | + | - | - | + | 1 | 1AX | 1AX | Foata <i>et al.</i> (2012) |
| <i>Aphallus tubarium</i> | ? | ? | ? | + | - | - | - | 2 | 1AX | 1AX | Jamieson & Daddow (1982), Daddow & Jamieson (1983) |
| <i>Neochasmus</i> sp. | + | 4 | 90° | + | - | - | - | | | | |
| Heterophyidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Cryptocotyle lingua</i> | 9 | 4 | 90° | - | - | - | - | 1 | 1AX | 1AX | Rees (1979) |
| <i>Euryhelmis squamula</i> | ? | ? | ? | + | - | - | - | 3 | 1AX | 1AX | Bakhoun <i>et al.</i> (2009b) |
| Opisthorchidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Motorchis orientalis</i> | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | 2AX | 1AX+N | Liu & Pan (1990) |
| PLAGIORCHIOIDEA | | | | | | | | | | | |
| Haematozochidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Haematozochus medioplexus</i> | 7 | 4 | 90° | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | Burton (1972) |
| <i>Haematozochus</i> sp. | + | 4 | 90° | + | - | - | + | 1 | 2AX | ? | Justine & Mattei (1982b), Justine (1983, 1995), Iomini <i>et al.</i> (1995) |
| Omphalometridae | | | | | | | | | | | |
| <i>Rubensrema exasperatum</i> | 7 | 4 | 90° | + | - | - | + | 2 | 2AX | N | Bakhoun <i>et al.</i> (2011c) |
| Plagiornchiidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Enodiotrema reductum</i> | ? | ? | ? | + | - | - | + | 1 | 1AX | N | Ndiaye <i>et al.</i> (2012b) |
| BRACHYLAIMOIDEA | | | | | | | | | | | |
| Brachylaimidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Brachylaima mascomai</i> | 7 | 4 | 90° | ? | ? | ? | ? | + | ? | ? | González-Moreno (2002) |
| <i>Scaphiostomum palaearcticum</i> | 7 | 4 | 90° | + | + | - | - | 1 | 1AX | 1AX | Ndiaye <i>et al.</i> (2002) |

Tableau 2 : suite

| | CI | ZA | RF | OE | EL | BCO | CE | M | EAS | EPS | Références |
|--|----|----|-----|----|----|-----|----|-------------------|-------------------|-----|---------------------------------------|
| BUCEPHALOIDEA | | | | | | | | | | | |
| Bucephalidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Prosorhynchoides gracilescens</i> | + | 4 | 90° | + | + | - | 1 | 1Ax | 1Ax | | Erwin & Halton (1983) |
| <i>Pseudorhynchocotyle elopichthys</i> | + | 4 | ? | + | + | - | 1 | ? | ? | | Tang <i>et al.</i> (1998) |
| DIPLOSTOMOIDEA | | | | | | | | | | | |
| Diplostomidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Pharyngostomoides procyonis</i> | + | 4 | 90° | ? | ? | ? | ? | ? | ? | ? | Grant <i>et al.</i> (1976) |
| GYMNOPHALLOIDEA | | | | | | | | | | | |
| Felidistomidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Proctoeces maculatus</i> | ? | 4 | ? | + | ? | - | ? | + | ? | ? | Justine (1985, 1995) |
| HEMIUROIDEA | | | | | | | | | | | |
| Didymozoidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Didymocystis wedli</i> | - | - | - | - | - | - | 1 | ? | ? | | Pamplona-Basilio <i>et al.</i> (2001) |
| <i>Didymozoön</i> sp. | - | - | - | - | - | - | 1 | AX ⁽⁴⁾ | AX ⁽⁴⁾ | | Justine & Mattei (1983, 1984a) |
| <i>Gonapodasmius</i> sp. | - | - | - | + | - | - | 2 | 2Ax | 1Ax | | Justine & Mattei (1982a, 1984b) |
| Hemimuridae | | | | | | | | | | | |
| <i>Lecithocladium excisum</i> | ? | ? | ? | + | - | - | - | 1 | 1Ax+OE | 1Ax | Ndiaye <i>et al.</i> (sous presse) |
| Lecithasteridae | | | | | | | | | | | |
| <i>Aponurus laguncula</i> | ? | ? | ? | + | - | - | - | 1 | 1Ax+OE | 1Ax | Quilichini <i>et al.</i> (2010a) |

Tableau 2 : suite

| SCHISTOSOMATOIDEA | CI | ZA | RF | OE | EL | BCO | CE | M | EAS | EPS | Références |
|---------------------------------|----|----|----|----|----|-----|----|---|-----|-------------------|--|
| Schistosomatidae | | | | | | | | | | | |
| <i>Schistosoma bovis</i> | - | - | - | - | - | - | - | + | M | Ax ⁽⁵⁾ | Justine <i>et al.</i> (1993) |
| <i>Schistosoma curassoni</i> | - | - | - | - | - | - | - | + | M | Ax ⁽⁵⁾ | Justine <i>et al.</i> (1993) |
| <i>Schistosoma intercalatum</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | M | Ax ⁽⁵⁾ | Justine <i>et al.</i> (1993) |
| <i>Schistosoma japonicum</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | M | Ax ⁽⁵⁾ | Justine & Mattei (1981), Yang <i>et al.</i> (1998, 2003) |
| <i>Schistosoma mansoni</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | M | Ax ⁽⁵⁾ | Justine & Mattei (1981), Justine <i>et al.</i> (1993) |
| <i>Schistosoma rodhaini</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | M | Ax ⁽⁵⁾ | Justine <i>et al.</i> (1993) |
| <i>Schistosoma margebowiei</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | M | Ax ⁽⁵⁾ | Justine & Mattei (1981), Justine <i>et al.</i> (1993) |

⁽¹⁾ Les centrioles non observés compliquent l'évaluation de la morphologie de l'extrémité antérieure.

⁽²⁾ Présence de deux expansions latérales.

⁽³⁾ Nous considérons cette structure plutôt comme une « *dilatation cytoplasmique* » qu'une expansion latérale.

⁽⁴⁾ Présence des axonèmes de type 9+0.

⁽⁵⁾ Présence d'un seul axonème de type 9+1' spécial, différent du 9+1' des Trepaxonemata (Ehlers, 1984).

IV-2 Particularités dans la spermiogenèse des espèces étudiées

La spermiogenèse de l'ensemble des espèces décrites dans ce Mémoire suit le modèle général rapporté chez la grande majorité des Digènes étudiés jusqu'ici (Burton, 1972 ; Justine, 1995, 2003 ; Miquel *et al.*, 2000 ; Ndiaye, 2003 ; Levron, 2004 ; Quilichini, 2007), à l'exception des Didymozoidae et Schistosomatidae (Justine & Mattei, 1982a, 1983, 1984a, b ; Justine *et al.*, 1993 ; Pamplona-Basilio *et al.*, 2001).

Le processus général de la spermiogenèse débute par la formation d'une zone de différentiation à la base de chaque spermatide, bordée de microtubules corticaux et délimitée dans sa partie proximale par un anneau de membranes arquées. Cette zone de différentiation contient :

- deux centrioles, chacun associé à une racine striée qui présente une forme triangulaire allongée avec alternance de bandes opaques et transparentes aux électrons ;
- un corps intercentriolaire, situé entre les deux centrioles et constitué d'un certain nombre de bandes opaques alternant avec celles transparentes aux électrons ;
- un noyau et des mitochondries, entre autres structures cellulaires.

À un stade plus avancé de la spermiogenèse, trois expansions se forment au niveau de la partie distale de la zone de différentiation : une expansion cytoplasmique médiane qui, comme son nom l'indique, est située sur la partie médiane entre les deux autres expansions qui correspondent aux deux flagelles. Ces flagelles, qui émergent des deux centrioles en direction opposée, forment un angle égal ou supérieur à 90° avec l'expansion médiane.

Ensuite, ces flagelles effectuent une rotation pour devenir parallèles à l'expansion cytoplasmique médiane. Durant ce stade, s'opère également une migration du noyau, des mitochondries et des microtubules corticaux dans le corps de la spermatide au sein de l'expansion médiane. Par la suite, a lieu une fusion proximo-distale et asynchrone entre les flagelles et l'expansion cytoplasmique médiane au niveau des zones d'attachement ou lignes opaques aux électrons qui sont présentes presque sur tout le long de la spermatide. Ces zones d'attachement, observables avant la fusion proximo-distale, restent visibles dans le spermatozoïde mûr.

Après la fusion proximo-distale, intervient un étranglement de l'anneau de membranes arquées qui donne naissance au jeune spermatozoïde après détachement de ce dernier du cytoplasme résiduel (voir figure 53).

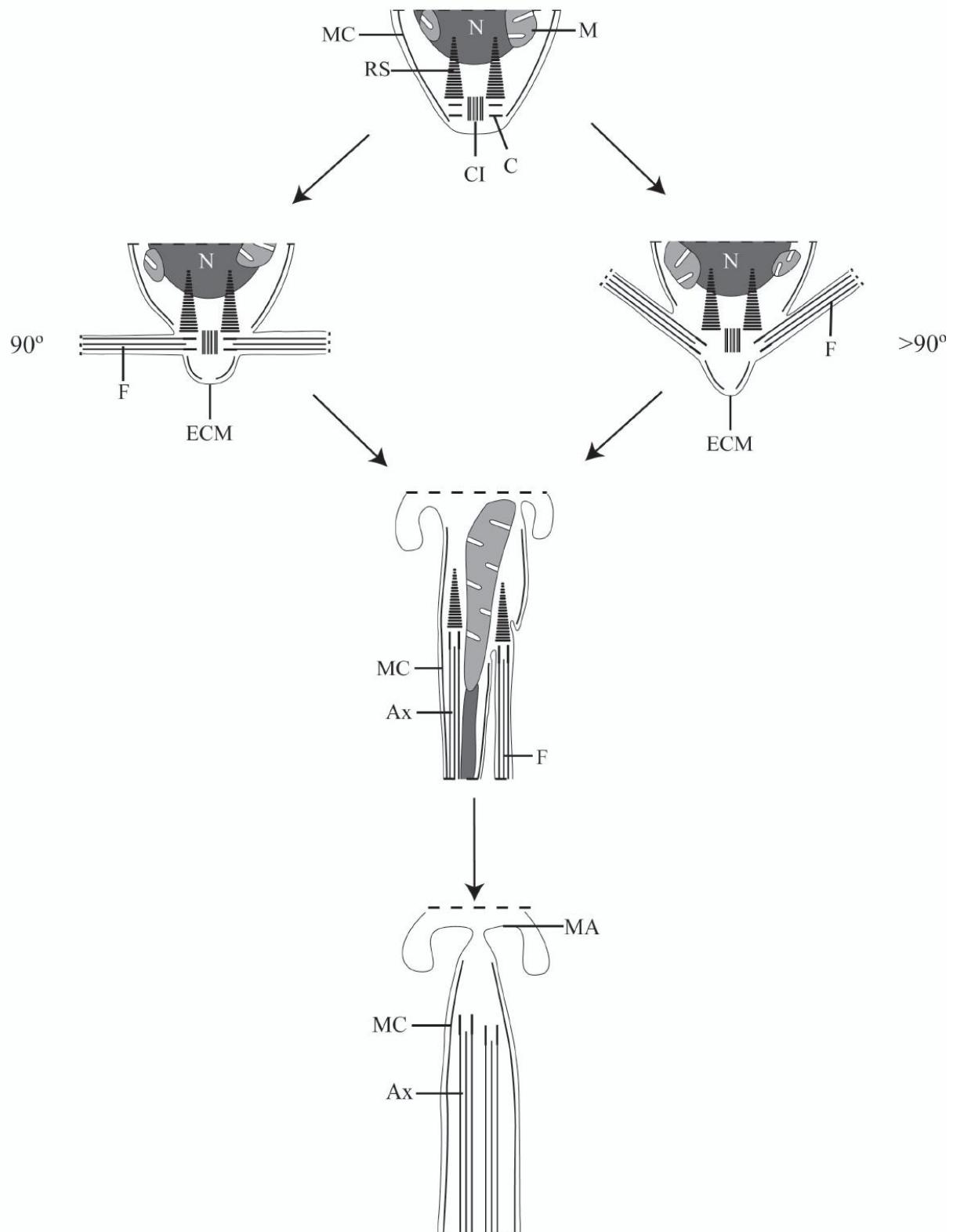


Figure 53. Diagramme récapitulatif du processus général de la spermiogenèse chez les Digènes.
 Ax : axonème, C : centriole, CI : corps intercentriolaire, ECM : expansion cytoplasmique médiane,
 F : flagelle, M : mitochondrie, MA : membranes arquées, MC : microtubules corticaux,
 N : noyau, RS : racine striée

La grande homogénéité pour le processus global de la spermiogenèse chez les Trématodes en général et les Digènes en particulier ne cache pas la variabilité d'un certain nombre de caractères ultrastructuraux observés durant ce processus et qui pourraient avoir un intérêt phylogénétique et/ou contribuer à la meilleure interprétation des structures présentes chez le spermatozoïde mûr. Ainsi, quatre de ces caractères ultrastructuraux observés durant la spermiogenèse des espèces étudiées dans ce Mémoire sont exposés ci-dessous.

La rotation flagellaire

En général, une rotation flagellaire égale à 90° a été rapportée chez la grande majorité des Digènes, sauf chez les Schistosomatidés et certains Didymozoidés (Justine, 2001, 2003). Durant la spermiogenèse de l'ensemble des espèces décrites dans ce Mémoire, nous avons également observé une rotation flagellaire de 90°. Par contre, un angle de rotation des flagelles estimé à environ 120° a été décrit chez *Fasciola hepatica* (Ndiaye *et al.*, 2003a), *Helicometra fasciata* (Levron *et al.*, 2003), *Monorchis parvus* (Levron *et al.*, 2004b) et *Dicrocoelium hospes* (Agostini *et al.*, 2005). Chez *Crepidostomum metoecus* et *Nicolla wisniewskii* (Quilichini *et al.*, 2007a, b) cette rotation flagellaire est supérieure à 90°.

L'implication phylogénétique de la rotation flagellaire viendrait de la variabilité de l'angle de rotation si nous comparons, par exemple, les Trématodes et les Cestodes. En fait, chez les Aspidogastres *Lobatostoma manteri*, *Multicotyle purvisi* ou *Aspidogaster limacoides* (Rohde *et al.*, 1991 ; Watson & Rohde, 1995 ; Levron *et al.*, 2009) et chez la majorité des Digènes (voir Tableau 2) cet angle est de 90°. Chez les Cestodes, Bâ & Marchand (1995) décrivirent quatre types de spermiogenèse en fonction de divers caractères, entre eux la rotation flagellaire de 90° ou de 0° chez les espèces appartenant au groupe le plus évolué, les Cycophyllidea. Cependant, la description de rotations flagellaires intermédiaires (entre 0° et 90°) dans plusieurs Cycophyllidés (Hidalgo *et al.*, 2000 ; Ndiaye *et al.*, 2003c ; Miquel *et al.*, 2009 ; Yoneva *et al.*, 2010) et des rotations supérieures à 90° chez certaines espèces appartenant à des ordres basaux des Eucestoda, comme *Wenyonia virilis* (Caryophyllidea) et *Cyathocephalus truncatus* (Spathebothriidea) (Bruňanská *et al.*, 2006 ; Miquel *et al.*, 2008), démontre l'existence d'une importante variabilité chez les Cestodes. Ce fait pourrait être interprété comme une réduction progressive de l'angle de rotation flagellaire des groupes les plus primitifs aux plus évolués. Cette rotation flagellaire pourrait être considérée comme un caractère plésiomorphique chez les Trématodes en général et les Digènes en particulier.

Le corps intercentriolaire

La morphologie du corps intercentriolaire montre qu'il est constitué d'une alternance de bandes plus ou moins opaques et transparentes aux électrons. Chez la majorité des Digènes, le corps intercentriolaire est constitué de 7 bandes opaques aux électrons (voir Tableau 2). C'est le cas chez six espèces étudiées dans ce Mémoire, à savoir : *Brachycoelium salamandrae*, *Diplodiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum*, *Mediogonimus jourdanei*, *Rophildollfusium fractum* et *Rubenstrema exasperatum*. Concernant *Wardula capitellata*, nous avons observé un corps intercentriolaire constitué de 6-7 bandes opaques aux électrons. La difficulté dans ce cas précis pour la détermination du nombre exact de bandes réside dans l'observation de la bande centrale très fine, qui semble être absente.

D'autres études révèlent la présence d'un corps intercentriolaire avec 9 bandes, comme observé chez *Cryptocotyle lingua* (Rees, 1979) ou *Monorchis parvus* (Levron *et al.*, 2004b), 6 bandes chez *Deropristis inflata* (Foata *et al.*, 2007), ou avec 5 bandes chez *Helicometra fasciata* (Levron *et al.*, 2003). De plus, il faut signaler que plusieurs auteurs ont remarqué la présence de ce corps intercentriolaire sans, malheureusement, détailler sa morphologie (Cifrian *et al.*, 1993 ; Iomini & Justine, 1997 ; Baptista-Farias *et al.*, 2001).

L'intérêt du corps intercentriolaire en phylogénie viendrait en faisant le parallélisme entre, par exemple, les Aspidogastres (groupe-frère des Digènes), les Digènes et les Cestodes (groupe plus évolué que les Digènes). En effet, un corps intercentriolaire constitué de 11 bandes a été décrit chez les Aspidogastres (voir Levron *et al.*, 2009), alors que chez Digènes ce nombre de bandes est assez variable (9, 7, 6 ou 5). Une réduction similaire a été aussi observée chez les Cestodes avec 5, 3 ou 1 bandes, ou même sans corps intercentriolaire, en particulier chez les groupes les plus évolués comme les Proteocephalidea, Mesocestoididae ou Cyclophyllidea (voir Levron *et al.*, 2010 ; Marigo, 2011). Ce caractère serait plésiomorphique pour les Digènes à l'image de la rotation flagellaire.

Quant à son rôle, selon plusieurs auteurs, il participerait avec les racines striées à l'élongation de la spermatide, à la rotation flagellaire, à la formation des microtubules corticaux, entre autres (Burton, 1972 ; Grant *et al.*, 1976 ; Ress, 1979 ; Sopott-Ehlers, 1990 ; Bruňanská *et al.*, 2001).

Les zones d'attachement

Les zones d'attachement ou points de fusion, au nombre de quatre, sont observés durant la spermiogenèse de la majorité des Digènes avant la fusion proximo-distale des flagelles avec l'expansion cytoplasmique médiane, mais également après cette fusion proximo-distale car ils persistent dans le spermatozoïde mûr (voir Tableau 2). Leur présence serait liée à l'existence de la fusion entre les flagelles et l'expansion cytoplasmique, puisque chez les Schistosomatidés (voir Justine, 1982), où une telle fusion est absente, ces zones d'attachement ne sont pas présentes.

Concernant les espèces que nous avons étudiées, ces quatre zones d'attachement apparaissent bien durant la spermiogenèse et persistent dans le spermatozoïde mûr. Nous pouvons aussi évoquer le nom de lignes opaques aux électrons pour nous référer à ces points d'attachement, car ces derniers apparaîtraient sous forme de lignes en coupes longitudinales. Ces zones d'attachement marqueraient la région où la fusion a eu lieu et sont d'une grande importance lors de l'interprétation de certaines coupes au niveau du spermatozoïde mûr.

C'est ainsi que lorsque nous sommes en présence de coupes où les microtubules corticaux décrivent un cercle ininterrompu par les zones d'attachement, celles-ci proviendraient d'une zone non concernée par la fusion des flagelles avec l'expansion cytoplasmique médiane, en l'occurrence la partie proximale ou basale de la spermatide âgée ou la partie antérieure du jeune spermatozoïde. Ceci a été observé, par exemple, chez *Troglotrema acutum* (Miquel *et al.*, 2006).

Dans certains cas, on peut observer des coupes contenant seulement deux zones d'attachement à l'image de celles observées, par exemple, au niveau la région antérieure du spermatozoïde chez *Mediogonimus jourdanei*, ainsi que chez d'autres espèces de Digènes comme *Holorchis micracanthum* (Bâ *et al.*, 2011) ou *Pleurogonius truncatus* (Ndiaye *et al.*, 2012a). L'explication serait que les deux flagelles fusionneraient avec l'expansion médiane dans des zones distinctes. En d'autres termes, les deux flagelles n'ont pas fusionné au même niveau avec l'expansion médiane, puisque sur des coupes plus postérieures aux coupes avec deux zones d'attachement, nous y avons observé les quatre zones d'attachement. Une autre explication de la présence de deux zones d'attachement sur les coupes serait que celles-ci proviennent de la partie postérieure du spermatozoïde où le noyau est généralement présent. En effet, lorsqu'un des axonèmes se désorganise, l'autre apparaît sur des coupes contenant seulement deux zones d'attachement.

Les boutons cytoplasmiques ornementés

La présence des boutons cytoplasmiques ornementés a été décrite pour la première fois dans cette étude au niveau de la spermiogenèse des Digènes. En effet, ces boutons sont apparus durant la spermiogenèse de *Elstia stossichianum* et de *Wardula capitellata*. Leur formation serait postérieure à la fusion proximo-distale entre les flagelles et l'expansion cytoplasmique médiane, puisqu'ils ont été observés que sur des coupes contenant les deux axonèmes déjà fusionnés. En plus, durant la spermiogenèse de *E. stossichianum*, la formation de ces boutons a pu être observée. Ils débutent sous forme d'une protubérance sous la membrane plasmique qui augmente en taille au fur et à mesure que le contenu cytoplasmique se réduit avant d'apparaître sous leur forme définitive au niveau du spermatozoïde mûr (figure 54). La description de ce processus de formation relève d'une importance considérable lors de l'interprétation de la relation, ou non, entre ces boutons et les expansions latérales. Cet aspect sera plus amplement abordé dans la discussion de ces caractères au niveau du spermatozoïde.

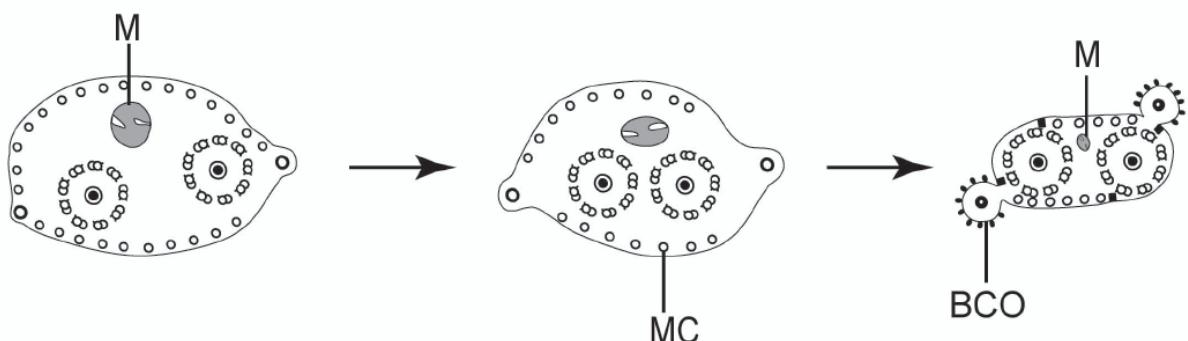


Figure 54. Schématisation de la formation des boutons cytoplasmiques ornementés. BCO : bouton cytoplasmique ornementé, M : mitochondrie, MC : microtubules corticaux

IV-3 Particularités dans l'organisation ultrastructurale du spermatozoïde des espèces étudiées

La morphologie du spermatozoïde chez *Brachycoelium salamandrae*, *Diplodiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum*, *Euryhelmis squamula*, *Mediogonimus jourdanei*, *Robphildolfusium fractum*, *Rubenstrema exasperatum* et *Wardula capitellata* est en accord avec celle des spermatozoïdes décrits chez la plupart des Digènes (sauf chez les Schistosomatidae et certains Didymozoidae) avec la présence d'un certain nombre de caractères classiques et constants, à savoir : (i) les deux axonèmes de type 9+‘1’ typiques des

Trepaxonemata (Ehlers, 1984), (ii) un noyau, (iii) une ou plusieurs mitochondries, (iv) des microtubules corticaux parallèles, et (v) des granules de glycogène.

Par contre, la présence ou absence d'autres caractères ultrastructuraux additionnels, selon les espèces étudiées, est décrite au niveau du spermatozoïde des Digènes. La variabilité de ces caractères, en particulier chez les espèces que nous avons présentées dans ce Mémoire, combinée avec les différentes morphologies des extrémités antérieures et postérieures, sont discutées ci-dessous.

Les microtubules corticaux

La présence des microtubules corticaux parallèles a été signalée au niveau du spermatozoïde de l'ensemble des espèces de Digènes étudiées jusqu'ici sauf chez *Didymozoon* sp. (Justine & Mattei, 1983, 1984a). Chez cette dernière, des microtubules corticaux ont été observés durant la spermiogenèse, bien que le spermatozoïde mûr en soit dépourvu (voir Justine & Mattei, 1984a).

Concernant les spermatozoïdes des espèces étudiées dans ce Mémoire, ils présentent, tous, deux champs (dorsal et ventral) de microtubules corticaux parallèles à l'axe du spermatozoïde. Cette disposition est la plus fréquente chez les Digènes (voir Miquel *et al.*, 2000, 2006 ; Ndiaye, 2003 ; Levron, 2004 ; Quilichini, 2007 ; etc.). Nonobstant, certaines espèces de Digènes exhibent un seul champ de microtubules corticaux au sein de leurs spermatozoïdes. C'est le cas du Faustulidae *Pronoprymna ventricosa* (Quilichini *et al.*, 2007c) et des Hemiuroidea *Gonapodasmius* sp. (Justine & Mattei, 1982a), *Aponurus laguncula* (Quilichini *et al.*, 2010a), *Lecithocladium excisum* (Ndiaye *et al.*, sous presse) et *Parahemiurus merus* (observations personnelles non publiées). De plus, lors de la spermiogenèse d'une autre Hemiuroidea, en l'occurrence *Prosorchis ghanensis* (Justine, 1995), un seul microtubule cortical est observé sur la face dorsale, et plusieurs sur la ventrale, avant la fusion des flagelles avec l'expansion médiane. Toujours, chez cette espèce, des coupes après la fusion exhibent seulement les microtubules corticaux de la face ventrale. Par conséquent, malgré le nombre réduit de micrographies, un seul champ de microtubules corticaux serait présent sur la spermatide âgée et, probablement, ce serait le cas sur le spermatozoïde. Ces remarques méritent une attention particulière.

Quant à la variation du nombre de microtubules corticaux, tout au long du spermatozoïde mûr, elle serait importante pour la phylogénie chez les Digènes. Le nombre maximum de microtubules corticaux et leur localisation dans le spermatozoïde varient selon les espèces.

Certaines présentent un maximum de microtubules corticaux au niveau des coupes contenant l'expansion latérale, comme c'est le cas chez *Diplodiscus subclavatus* (environ 73 microtubules), *Elstia stossichianum* (environ 44) et *Wardula capitellata* (environ 53), mais aussi chez, par exemple, *Echinostoma caproni* (environ 45) (Iomini & Justine, 1997) ou *Fasciola gigantica* (environ 44) (Ndiaye *et al.*, 2004). D'autres spermatozoïdes, en revanche, ont un maximum de microtubules corticaux au niveau des coupes contenant les deux axonèmes entourés de microtubules corticaux ininterrompus. C'est le cas chez *Brachycoelium salamandrae* (environ 37 microtubules), *Euryhelmis squamula* (environ 28), *Mediogonimus jourdanei* (environ 40), *Rubenstrema exasperatum* (environ 34) et d'autres Digènes, tels que *Postorchigenes gymnesicus* (environ 36) (Gracenea *et al.*, 1997) ou *Diphtherostomum brusinae* (environ 39) (Levron *et al.*, 2004c). Il en est des spermatozoïdes où le maximum de microtubules corticaux se situe au niveau de la zone mitochondriale (sur la face ventrale), comme c'est le cas chez *Opecoeloides furcatus* (environ 12 microtubules) (Miquel *et al.*, 2000), *Nicolla testiobliquum* (environ 15) (Quilichini *et al.*, 2007d) ou *Aphallus tubarium* (environ 8) (Foata *et al.*, 2012). Considérant tous ces aspects, une évaluation de la variabilité du nombre de microtubules, tout au long du spermatozoïde, serait complexe.

L'extrémité antérieure du spermatozoïde

La grande variété de structures qui caractérisent la région antérieure du spermatozoïde lui confère une particularité intéressante pour les études phylogénétiques (Justine, 1999 ; Levron, 2004).

La morphologie externe de l'extrémité antérieure de la majorité des espèces étudiées dans ce Mémoire fait état d'une extrémité effilée ou légèrement pointue à l'instar de celle rapportée chez la plupart des Digènes (Ndiaye *et al.*, 2003a, b ; Miquel *et al.*, 2006 ; Quilichini *et al.*, 2007b, 2010b). Cependant, chez *Elstia stossichianum* cette extrémité antérieure apparaît bifurquée et chez *Wardula capitellata* elle serait plus ou moins aplatie avec la présence des deux expansions latérales. En plus de la forme externe de l'extrémité antérieure, récemment, des spermatozoïdes exhibant des ornementations externes s'étendant vers la pointe antérieure du spermatozoïde (avant l'apparition des centrioles correspondants aux axonèmes) ont été décrits chez *Neoapocreadium chabaudi*, *Cricocephalus albus* et *Pleurogonius truncatus* (Kacem *et al.*, 2010a ; Ndiaye *et al.*, 2011, 2012a).

En ce qui concerne la morphologie interne de l'extrémité antérieure du spermatozoïde, deux types sont généralement observés chez les Digènes et en particulier chez les espèces que nous avons abordées :

- une extrémité antérieure contenant un seul axonème, comme celle observée chez *Brachycoelium salamandrae*, *Diplodiscus subclavatus*, *Euryhelmis squamula* et *Robphildolfusium fractum*, mais également chez plusieurs autres espèces de Digènes appartenant à d'autres familles différentes de celles que nous avons étudiées, comme les Fasciolidae *Fasciola hepatica* et *F. gigantica* (Ndiaye *et al.*, 2003a, 2004), les Dicrocoeliidae *Dicrocoelium dendriticum* et *D. hospes* (Cifrian *et al.*, 1993 ; Agostini *et al.*, 2005), ou le Zoogonidae *Diphterostomum brusinae* (Levron *et al.*, 2004c) (voir Tableau 2).
- une extrémité antérieure contenant deux axonèmes, comme cela a été observée chez *Elstia stossichianum*, *Mediogonimus jourdanei*, *Rubenstrema exasperatum* et *Wardula capitellata*, mais également chez d'autres espèces de Digènes, en l'occurrence *Haematoloechus* sp. (Justine & Mattei, 1982b), *Microphallus primas* (Castilho & Barandela, 1990), *Pleurogonius truncatus* (Ndiaye *et al.*, 2012a), etc. (voir Tableau 2). Il est important de mentionner dans ce cas de figure, la présence de microtubules corticaux sous-membranaires dans la partie proximale de l'extrémité antérieure ou « *microtubules corticaux apicaux* » qui décrivent un cercle/demi-cercle plus ou moins continu.

En plus de ces deux morphologies, tenant en compte les caractères internes, certains spermatozoïdes de Digènes exhibent un matériel opaque aux électrons, qui apparaît à l'endroit où se forme le second axonème. Ce matériel opaque aux électrons est observé chez *Robphildolfusium fractum*, ainsi que chez d'autres espèces, telles que *Holorchis micracanthum* (Bâ *et al.*, 2011), *Gyliauchen* sp. (Quilichini *et al.*, 2011a), *Cricocephalus albus* (Ndiaye *et al.*, 2011) et *Hypocreadium caputvadum* (Kacem *et al.*, 2012).

Les ornementations externes de la membrane plasmique

La présence d'ornementations externes de la membrane plasmique a été signalée chez le spermatozoïde de la grande majorité des espèces de Digènes étudiées jusqu'ici sauf chez les Schistosomatidae et certains Didymozoidae, qui exhibent un spermatozoïde particulier (voir Tableau 2). Ces ornementations ne semblent pas être exclusives aux Digènes puisque des structures similaires sont présentes chez l'Aspidogastre *Multicotyle purvisi* (Watson & Rohde, 1995), mais également sur le spermatozoïde, par exemple, du Monogène *Polyopisthocotylea*

Pseudomazocraes cf. *monsivaisae* (Justine & Mattei, 1985). Cependant, à notre connaissance, les ornementations externes n'ont pas été répertoriées chez les Cestodes.

Concernant les espèces que nous avons étudiées dans ce Mémoire, les ornementations externes ont été observées chez toutes les espèces.

Selon certains auteurs, la formation des ornementations externes prend place tardivement durant la spermiogenèse, après la fusion des flagelles avec l'expansion cytoplasmique médiane, puisqu'elles n'ont pas été observées au niveau de la base de la zone de différenciation des jeunes spermatides (Justine & Mattei, 1982b ; Miquel *et al.*, 2000, 2006). De plus, ces ornementations seraient localisées uniquement au niveau de la région antérieure du spermatozoïde, car leur présence n'a pas été répertoriée au niveau des régions contenant le noyau.

Quant à l'importance phylogénétique des ornementations externes chez les Digènes, plusieurs hypothèses ont été évoquées. Quilichini *et al.* (2007c) ont proposé une classification des Digènes sur la base de la localisation des ornementations externes. Ils ont proposé deux groupes de Digènes, avant que Quilichini *et al.* (2011a) y ajoutent, postérieurement, un troisième groupe :

- le premier groupe (groupe 1) est constitué par les Digènes présentant des ornementations externes dans la partie proximale de l'extrémité antérieure.
- le deuxième groupe (groupe 2) héberge les espèces où ces ornementations externes sont situées dans la partie distale de l'extrémité antérieure, qui est caractérisée en général par la présence d'une mitochondrie.
- et le troisième groupe (groupe 3) concerne les Digènes où les ornementations externes sont absentes.

Suivant cette classification, les espèces décrites dans ce Mémoire seraient du groupe 2 à l'exception de *Wardula capitella*, où les ornementations apparaissent aussi bien dans la partie proximale que dans la distale. De plus, récemment, des spermatozoïdes caractérisés par la présence d'ornementations externes tout au long de la partie antérieure (de la proximale à la distale) ont été décrits chez *Neoapocreadium chabaudi* (Kacem *et al.*, 2010a), *Cricocephalus albus* (Ndiaye *et al.*, 2011) et *Pleurogonius truncatus* (Ndiaye *et al.*, 2012a). Ces observations apportent la possibilité d'un quatrième groupe (groupe 4), en suivant la classification de Quilichini *et al.* (2007c, 2011a).

Cette tentative de classification pourrait avoir son importance à des échelles taxonomiques différentes. En effet, chez la super-famille Microphalloidea, traitée dans ce Mémoire, toutes les espèces étudiées possèdent des ornementations externes (groupe 1 ou 2) à l'exception de

Maritrema linguilla (Hendow & James, 1988) et *Ganeo tigrinum* (Sharma & Rai, 1995) qui n'en possèdent pas (groupe 3). Parallèlement, nos observations concordent avec les études phylogénétiques de Tkach *et al.* (2003), basées sur des données moléculaires, qui remettent en question le statut du genre *Maritrema*, de même qu'avec la proposition de Pojmańska *et al.* (2008) de reconsiderer le statut du genre *Ganeo* dans les Lecithodendridae.

Nous avons observé chez toutes les espèces étudiées dans ce Mémoire que les ornementations externes semblent être associées, au sens large du terme, avec les microtubules corticaux sous-membranaires. Cette association pourrait avoir son importance lors de l'établissement des modèles de spermatozoïdes chez les Digènes. Cependant, il faut noter que certaines espèces de Digènes présentent, au niveau de leurs spermatozoïdes, des ornementations externes dans une région dépourvue de microtubules corticaux. C'est le cas chez *Pronoprymna ventricosa*, *Aponurus laguncula* et *Lecithocladium excisum* (Quilichini *et al.*, 2007c, 2010a ; Ndiaye *et al.*, sous presse), mais également chez *Parahemius merus* (observations personnelles non publiées).

Concernant le rôle des ornementations externes, il est à ce jour inconnu. Néanmoins, Justine & Mattei (1982b) ont postulé qu'elles interviendraient dans l'adhérence du spermatozoïde sur la membrane de l'ovocyte lors de la fécondation.

L'expansion latérale

L'expansion latérale est une structure qui a été décrite chez certaines espèces de Digènes. L'appellation est plutôt variable et dépend de la considération de chaque auteur. Ainsi, on peut retrouver dans la littérature des noms comme expansion cytoplasmique ou expansion dorso-latérale pour désigner la même structure (Ndiaye *et al.*, 2003a, 2004 ; Agostini *et al.*, 2005 ; Miquel *et al.*, 2006).

Comme son nom l'indique, l'expansion latérale est une expansion qui émerge latéralement au-delà du plan formé par les deux axonèmes. Son extension peut être plus ou moins développée selon les espèces. Elle est jusqu'ici présente au niveau de l'extrémité antérieure du spermatozoïde et associée à des microtubules corticaux, aux ornementations externes de la membrane plasmique, et quelquefois à des corps en forme d'épine.

Cette association « *expansion latérale+ornementations externes+microtubules corticaux* » est observée chez *Diplodiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum* et *Wardula capitellata*, mais également chez plusieurs autres espèces de Digènes comme *Echinostoma caproni*, *Fasciola hepatica*, *F. gigantica*, *Troglotrema acutum*, *Basidiodiscus ectorchis*, *Sandonia sudanensis*,

Paramphistomum microbothrium, *Cotylophoron cotylophorum* et *Carmyerius endopapillatus* (Iomini & Justine, 1997 ; Ndiaye *et al.*, 2003a, 2004 ; Miquel *et al.*, 2006 ; Ashour *et al.*, 2007 ; Seck *et al.*, 2007, 2008a, b), entre autres.

Cette association de caractères pourrait avoir un intérêt phylogénétique et aider à la meilleure compréhension de la phylogénie interne des Digènes. De plus, elle pourrait également être intéressante lors de l'établissement des modèles de spermatozoïdes chez les Digènes.

Il est important de mentionner qu'une expansion latérale telle que nous l'avons décrite antérieurement n'est pas observée chez quelques espèces de Digènes, où les auteurs y ont observé une structure décrite comme étant une expansion latérale ou cytoplasmique. C'est le cas chez *Poracanthium furcatum*, *Helicometra epinepheli*, *H. fasciata* ou *Holorchis micracanthum* (Levron *et al.*, 2003, 2004a ; Bâ *et al.*, 2011 ; Quilichini *et al.*, 2011b). Nous évoquerions chez ces espèces ci-dessus une « *dilatation de la membrane plasmique* », plutôt qu'une expansion latérale comme celle observée chez *Diplodiscus subclavatus*, par exemple. De plus, chez ces espèces, l'association « *expansion latérale+ornementations externes+microtubules corticaux* » n'est pas observée. Cependant, comme ces appellations dépendent des considérations de chaque auteur, seul une définition conventionnelle pourra régler cette question.

L'intérêt phylogénétique de l'expansion latérale et/ou de l'association « *expansion latérale+ornementations externes+microtubules corticaux* » réside dans l'observation de leur présence au niveau des familles, superfamilles ou ordres des Digènes. En effet, au niveau de la famille Mesometridae, deux expansions latérales sont observées pour la première fois sur le spermatozoïde de *Wardula capitellata*, alors qu'une seule expansion latérale a été décrite jusqu'ici chez les Digènes, comme c'est le cas de *Elstia stossichianum* ou *Diplosdiscus subclavatus* (voir Tableau 2).

En évaluant la présence de l'association antérieurement décrite, nous avons remarqué son observation au niveau des superfamilles Echinostomoidea, Haploporoidea, Microscaphidioidea, Paramphistomoidea et Pronocephaloidea, appartenant à l'ordre Echinostomida (voir Tableau 2). Parmi ces superfamilles, les Paramphistomoidea présentent un spermatozoïde qui, de par son expansion latérale bien développée, pourrait être corrélé aux membranes ondulantes rapportées au niveau du spermatozoïde chez les Aspidogastrea (groupe-frère des Digènes), en particulier chez *Multicotyle purvisi* (Watson & Rohde, 1995). Ces similitudes pourraient être intéressantes à l'heure de la détermination du groupe basal chez les Digènes. Néanmoins, il faut mentionner l'existence d'une expansion latérale chez des espèces n'appartenant pas aux superfamilles antérieurement citées, à l'image du Dicrocoeliidé

Dicrocoelium hospes (Agostini *et al.*, 2005) ou encore du Troglotrematidé *Troglotrema acutum* (Miquel *et al.*, 2006).

Les corps en forme d'épine ou corps épineux

Depuis la première description des corps épineux chez *Opecoeloides furcatus* (Miquel *et al.*, 2000), plusieurs auteurs ont mentionné la présence de ces structures au sein du spermatozoïde dans des études postérieures (voir Tableau 2). Ils apparaissent, morphologiquement, comme des protubérances opaques aux électrons qui contiennent une sorte de vésicule et qui font saillie au niveau de la région antérieure du spermatozoïde, accompagnés ou non des ornements externes de la membrane plasmique. Lors de leur description, Miquel *et al.* (2000) ont suggéré que, durant la spermiogenèse, ces structures se formeraient après la fusion des flagelles avec l'expansion cytoplasmique médiane au sein de la spermatide âgée. Cependant, nous avons observé, durant la spermiogenèse chez *Diplodiscus subclavatus*, *Rubenstrema exasperatum* et *Wardula capitellata*, la présence des corps en forme d'épine bien avant la fusion des flagelles avec l'expansion cytoplasmique médiane. Cette observation laisse présager que leur formation, au moins chez ces espèces, s'effectuerait très tôt durant la spermiogenèse dans la zone de différenciation avant la fusion proximo-distale des flagelles avec l'expansion médiane.

Concernant les espèces étudiées dans ce Mémoire, les corps épineux sont observés chez l'ensemble des espèces excepté *Euryhelmis squamula*. Cependant, quelques particularités sont à mentionner.

Ainsi, *Brachycoelium salamandrae*, *Diplodiscus suclavatus*, *Elstia stossichianum*, *Mediogonimus jourdanei*, *Rubenstrema exasperatum* et *Wardula capitellata* exhibent des corps épineux au niveau de la région pourvue d'ornements externes, comme chez la plupart des Digènes d'ailleurs (Ndiaye, 2003 ; Levron, 2004 ; Agostini *et al.*, 2005 ; Quilichini, 2007 ; Ternengo *et al.*, 2009 ; Foata *et al.*, 2012 ; Ndiaye *et al.*, 2012b). En revanche, chez *Robphildolfusium fractum*, ces corps épineux sont observés au niveau d'une zone dépourvue de toute ornementation externe, mais également sur une zone ornementée que nous qualifions de transition. Cette présence de corps épineux dans une région dépourvue d'ornements, observée chez *R. fractum*, a été également rapportée chez un autre Gyliauchenidé, à savoir *Gyliauchen* sp. (Quilichini *et al.*, 2011a), mais aussi chez l'Apocreadiidé *Neoapocreadium chabaudi* (Kacem *et al.*, 2010a).

Certains auteurs ont tenté d'évaluer la périodicité de l'apparition des corps épineux le long de l'extrémité antérieure du spermatozoïde. Ainsi, une périodicité de 1 µm est rapportée chez *Opecoeloides furcatus*, *Fasciola gigantica* et *Nicolla testiobliquum* (Miquel *et al.*, 2000 ; Ndiaye *et al.*, 2004 ; Quilichini *et al.*, 2007d), de 0,7 µm chez *Poracanthium furcatum* (Levron *et al.*, 2004a) et de 0,6 µm chez *Nicolla wisniewskii* (Quilichini *et al.*, 2007b). En ce qui concerne les espèces étudiées dans ce Mémoire, la distribution irrégulière des corps épineux observée ne nous a pas permis d'évaluer la périodicité de leur apparition.

Il est important de souligner que, à notre connaissance, les corps en forme d'épine n'ont pas été observés chez les autres groupes de Neodermata, ce qui confirme l'importance de ce caractère pour comprendre la phylogénie des Digènes.

De plus, certains auteurs ont évoqué le parallélisme entre ces corps épineux et les corps en crête décrits chez la majorité de Cestodes et chez un Monogène du genre *Calceostoma* (Justine & Mattei, 1986 ; Levron, 2004 ; Miquel *et al.*, 2006). Cependant, ces deux structures diffèrent sur certains points : (i) leurs morphologies sont différentes, tenant en compte que les corps épineux contiennent une sorte de vésicule ; (ii) les corps en crête apparaissent comme un cordon hélicoïdal continu, tandis que les corps épineux ressemblent plus à des structures isolées (voir Miquel *et al.*, 2006).

Les boutons cytoplasmiques ornementés

Tel que nous les avons mentionnés pour la spermiogenèse, les boutons cytoplasmiques ornementés sont décrits aussi pour la première fois au niveau du spermatozoïde des Digènes chez *Elstia stossichianum* et *Wardula capitellata*, appartenant à la famille Mesometridae, formant avec les Microscaphididae la superfamille Microscaphidioidea.

Concernant la relation entre les expansions latérales et boutons cytoplasmiques ornementés, on pourrait penser que chez *W. capitellata* ces boutons proviendraient de la réduction des deux expansions latérales. Cependant, chez *E. stossichianum* l'observation de la formation de ces boutons cytoplasmiques ornementés durant la spermiogenèse et leur présence sur le spermatozoïde mûr, qui exhibe une seule expansion, nous permet d'affirmer que ces boutons cytoplasmiques ornementés sont des structures indépendantes des expansions latérales.

En addition aux genres *Elstia* et *Wardula*, nous avons également observé la présence de ces boutons dans une étude préliminaire du spermatozoïde d'une espèce du genre *Mesometra*, en l'occurrence *Mesometra orbicularis* (Bakhoum & Miquel, 2011). D'autre part, les premières observations effectuées chez *Centroderma spinosissima* montrent aussi la présence de ces

structures (observations personnelles non publiées). Ces observations rapportent à quatre le nombre de genres où ces boutons cytoplasmiques ornementés sont présents sur les cinq genres qui composent les Mesometridae (*Centroderma*, *Elstia*, *Mesometra*, *Parawardula* et *Wardula*). Ainsi, l'apparition de ces structures chez les Mésométridés différencierait leurs spermatozoïdes de ceux des autres familles de Digènes. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires chez le genre restant (*Parawardula*) et les autres espèces inexplorées, ainsi que chez la famille Microscaphididae (proche des Mesometridae), afin de voir si cette particularité ne pourrait pas s'étendre à la super-famille Microscaphidoidea et être considérée dans l'avenir comme une autapomorphie pour ce groupe.

Le nombre de mitochondries

Pour l'heure, la détermination du nombre de mitochondries est en grande partie dépendante de l'interprétation de chaque auteur. C'est ainsi que la présence d'une, deux ou de trois mitochondries a été mentionnée au niveau du spermatozoïde des Digènes (voir Tableau 2), exception faite des Schistosomes où un « *agglomérate* » de mitochondries apparaît au niveau antérieur du spermatozoïde, surmontant le noyau (Justine *et al.*, 1993 ; Yang *et al.*, 1998).

Les toutes premières descriptions faisaient état de la présence au niveau du spermatozoïde d'une seule mitochondrie qui résulterait de la fusion de plusieurs mitochondries procédant de la zone de différentiation (voir Burton, 1972 ; Rees, 1979 ; Jamieson & Daddow, 1982 ; Robinson & Halton, 1982 ; Iomini & Justine, 1997 ; Ndiaye, 2003, Levron, 2004). Parmi les espèces que nous avons étudiées dans ce travail, quatre exhibent un spermatozoïde contenant une mitochondrie, en l'occurrence *Diplodiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum*, *Mediogonimus jourdanei* et *Wardula capitellata*. Nous avons bien observé chez ces espèces plusieurs mitochondries durant la spermiogenèse et une seule au sein du spermatozoïde mûr. Nonobstant, deux mitochondries ont été observées chez les spermatozoïdes mûrs de *Brachycoelium salamandrae*, *Rubenstrema exasperatum* et *Robphildollfusium fractum*, et trois mitochondries chez *Euryhelmis squamula*. En effet, plusieurs auteurs en effectuant des interprétations logiques sur la base des coupes transversales ont révélé l'existence de plus d'une mitochondrie au sein du spermatozoïde (voir Tableau 2). Chez *B. salamandrae* et *E. squamula* l'observation de coupes transversales avec les deux mitochondries parallèles constitue une preuve irréfutable de la présence de plus d'une mitochondrie chez le spermatozoïde de certaines espèces de Digènes. Il est important de souligner que Agostini *et*

al. (2005) avaient déjà observé des mitochondries parallèles au niveau du spermatozoïde de *Dicrocoelium hospes*.

En addition, l'utilisation des techniques de marquage, par exemple, l'immufluorescence des mitochondries serait un moyen pour résoudre l'épineuse question du nombre de mitochondries.

Cependant, il faut souligner que l'existence de mitochondrie au sein du spermatozoïde des Digènes peut avoir une importance phylogénétique, puisque chez les Eucestoda, où le spermatozoïde est dépourvu de mitochondrie, l'absence de cette dernière est considérée comme une synapomorphie (Justine, 1991a, 1998a).

L'extrémité postérieure du spermatozoïde

À l'instar de la variabilité observée au niveau de l'extrémité antérieure du spermatozoïde, celle postérieure offre certaines différences selon les espèces. Pour cela, plusieurs auteurs ont préconisé l'utilisation de cette variabilité à des intérêts phylogénétiques (Levron, 2003 ; Agostini *et al.*, 2005 ; Miquel *et al.*, 2006 ; Quilichini *et al.*, 2010b ; Foata *et al.*, 2012).

Quilichini *et al.* (2010b) furent les premiers à proposer trois types d'extrémités postérieures du spermatozoïde chez les Digènes étudiés sauf les Schistosomes et certains Didymozoides. En effet, ces auteurs se sont basés sur la succession des caractères ultrastructuraux vers la partie postérieure du spermatozoïde, tels que : (i) l'extrémité postérieure du dernier axonème, (ii) celle du noyau, (iii) la présence/absence de microtubules corticaux.

Nous avons considéré dans notre étude uniquement le dernier caractère ultrastructural présent au niveau de l'extrémité postérieure, comme d'ailleurs dans la plupart des études ultrastructurales, plutôt que la succession de caractères vers l'extrémité distale. Cependant, dans les deux cas de figure, trois types de morphologies de l'extrémité postérieure du spermatozoïde mûr seraient présents chez les Digènes :

- le premier type concerne les Digènes exhibant seulement un noyau au niveau de l'extrémité distale de leur spermatozoïde comme cela a été observé chez *Brachycoelium salamandrae*, *Diplodiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum*, *Rubenstrema exasperatum*, *Robphildolfusium fractum* et *Wardula capitellata*. Ce type d'extrémité postérieure est le plus fréquent chez les Digènes (voir Tableau 2). Il est important de mentionner que le noyau peut être accompagné de granules de glycogène et même quelquefois d'un nombre très réduit de microtubules qui peuvent être ceux corticaux ou simplement des singulets résultant de la désorganisation du dernier axonème.

- le deuxième type de morphologie regroupe les Digènes présentant un seul axonème au sein de leur extrémité postérieure. Ce type est observé chez deux des espèces que nous avons étudiées, à savoir *Euryhelmis squamula* et *Mediogonimus jourdanei*. En relation avec l'extrémité postérieure, nous avons observé chez *M. jourdanei*, grâce aux images obtenues au microscope électronique à balayage, comment se termine le noyau, laissant la place au dernier axonème vers la partie distale du spermatozoïde. Des spermatozoïdes exhibant un axonème au niveau de leur extrémité postérieure ont été décrits chez plusieurs autres espèces appartenant à différentes familles (voir Tableau 2). Récemment, un spermatozoïde exhibant dans sa partie distale un axonème et une mitochondrie postérieure est rapporté chez *Aponurus laguncula* (Quilichini *et al.*, 2010a). L'intérêt de cette extrémité réside dans la présence de la mitochondrie là où est observé le noyau chez la grande majorité des Digènes étudiés à ce jour.
- le troisième type d'extrémité postérieure du spermatozoïde est caractérisé par la présence de microtubules corticaux. Cette morphologie est décrite, jusqu'ici, chez la grande majorité des espèces appartenant à la famille Opecoelidae, en l'occurrence chez *Opecoeloides furcatus*, *Poracanthium furcatum*, *Nicolla wisniewskii* et *N. testiobliquum* (Miquel *et al.*, 2000 ; Levron *et al.*, 2004a ; Quilichini *et al.*, 2007b, d), mais également chez *Heterolebes maculosus* (Quilichini *et al.*, 2010b), membre de la famille Opistholebetidae, considérée comme proche des Opecoelidae (Cable, 1956 ; Olson *et al.*, 2003 ; Cribb, 2005 ; Quilichini *et al.*, 2010b).

IV-4 Principaux caractères ultrastructuraux d'intérêt phylogénétique

Dans cette partie, nous présentons une brève récapitulation de l'ensemble des caractères ultrastructuraux qui ont été proposés dans la littérature pour la compréhension de la phylogénie des Digènes.

- 1- La zone de différenciation : concrètement, c'est un caractère que les Digènes partagent avec d'autres taxa des Plathelminthes et plus exactement avec ceux appartenant au Cercomeridea.
- 2- Le corps intercentriolaire : présente une certaine variabilité concernant le nombre de bandes opaques aux électrons le constituant chez les Neodermata en général et les Digènes en particulier.

- 3- L'angle de rotation flagellaire : montre, à l'image du corps intercentriolaire, une variabilité parmi les Neodermata, en particulier entre les Trématodes et les Cestodes.
- 4- Les microtubules corticaux : leur importance résiderait dans la variabilité de leur nombre au long du spermatozoïde mûr. En plus, ils sont habituellement organisés en deux champs (dorsal et ventral), mais l'absence d'un ou même des deux champs peut être un aspect intéressant dans certains groupes.
- 5- L'extrémité antérieure du spermatozoïde : de part ses différentes morphologies offre certaines particularités chez les Digènes.
- 6- L'expansion latérale : sa présence et/ou son absence et son association avec les ornementations externes et les microtubules corticaux, selon les espèces, familles et superfamilles, fait de ce caractère un critère phylogénétique important.
- 7- Les ornementations externes de la membrane plasmique : son observation ainsi que sa position au niveau de l'extrémité antérieure du spermatozoïde souligne l'importance de cette structure pour comparer les différents taxa chez les Digènes.
- 8- Les corps épineux : leur apparition récente sur plusieurs spermatozoïdes chez les Digènes et nulle part ailleurs chez les autres Neodermata octroie à ces structures un intérêt phylogénétique particulier.
- 9- Les boutons cytoplasmiques ornementés : observés pour la première fois au niveau du spermatozoïde des Digènes, ils seraient d'une grande importance pour différentier le spermatozoïde de certaines espèces, voir de certaines familles ou superfamilles.
- 10- Le nombre de mitochondries : variable selon les espèces de Digènes et important d'un point de vue phylogénétique en comparant les Digènes et les Eucestoda.
- 11- L'extrémité postérieure du spermatozoïde : sa variabilité morphologique au niveau des Digènes s'avère importante pour l'établissement des différents modèles de spermatozoïdes.

IV-5 Modélisation des spermatozoïdes chez les Digènes

Sur la base des résultats obtenus dans ce Mémoire et ceux procédant de la littérature, nous avons tenté l'établissement des modèles de spermatozoïdes qui seraient applicables aux Digènes. Pour cela, certains des caractères ultrastructuraux d'intérêt phylogénétique ont été utilisés et d'autres, par contre, ont été éliminés, compte tenu de leur variabilité plus ou moins importante, comme c'est le cas de la variation du nombre de microtubules corticaux tout au long du spermatozoïde ou de celle du nombre de mitochondries. Dans le cas des autres caractères comme les corps épineux et les boutons cytoplasmiques ornementés, du fait de leur récente description, nous avons jugé prématuré leur incorporation dans les modèles spermatologiques.

Ainsi, nous avons retenu pour l'établissement des modèles :

- le type d'axonèmes : 9+‘1’ des Trepaxonemata, 9+‘1’ spécial et 9+0.
- l'extrémité antérieure du spermatozoïde, qui exhibe un ou deux axonèmes. L'observation de coupes contenant deux axonèmes légèrement décalés ou deux centrioles en phase de formation apporte une ambiguïté et rend difficile, dans certains cas, la détermination de la morphologie de cette extrémité.
- l'association « *expansion latérale+ornementations externes+microtubules corticaux* », qui lorsque l'expansion latérale est absente se résume à l'association « *ornementations externes+microtubules corticaux* ». Cette association peut être absente comme nous le verrons dans certains modèles.
- la position des ornementations externes, selon qu'elles soient du groupe 1, 2, 3 ou 4.
- la présence ou non de microtubules corticaux et leur organisation en un ou deux champ(s) parallèle(s) à l'axe longitudinal du spermatozoïde.
- l'extrémité postérieure du spermatozoïde, qui peut contenir le noyau, un axonème ou des microtubules corticaux sous-membranaires. Dans les trois cas, les granules de glycogène peuvent être présents.

Considérant les caractères ainsi présentés, nous avons distingué sept modèles de spermatozoïdes (voir figure 55).

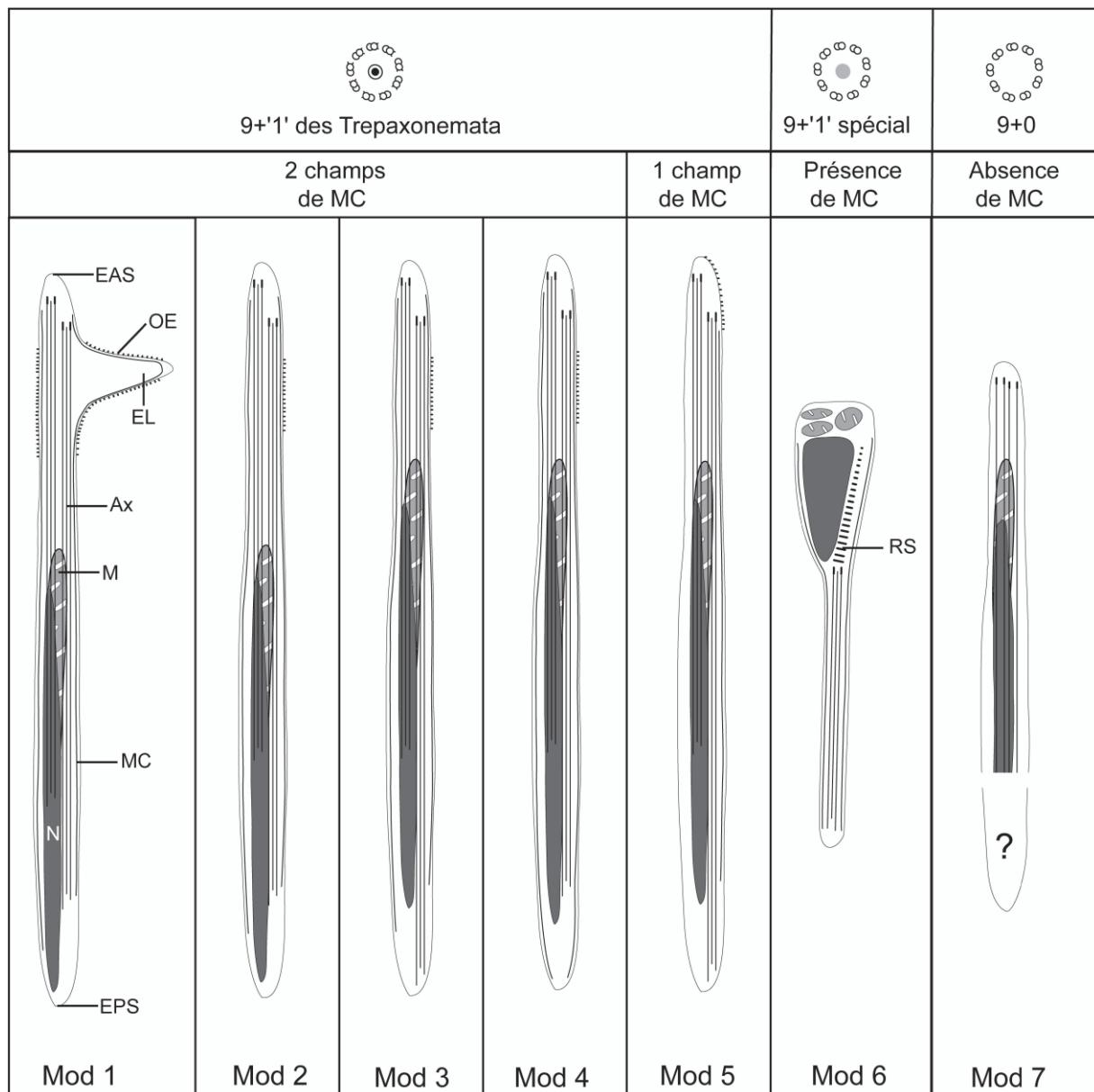


Figure 55. Schématisation des différents modèles de spermatozoïdes qui seraient applicables aux Digènes. Le modèle 6 est inspiré de Justine (1982). Ax : axonème, EAS : extrémité antérieure du spermatozoïde, EL : expansion latérale, EPS : extrémité postérieure du spermatozoïde, M : mitochondrie (elle symbolise la présence d'au moins une mitochondrie chez les Digènes), MC : microtubules corticaux sous-membranaires, Mod : modèle de spermatozoïde, N : noyau, OE : ornementations externes de la membrane plasmique, RS : racine striée, ? : absence d'information. Chez les modèles 1-4, nous avons représenté le groupe d'ornementations externes le plus fréquent.

Modèle 1

Ce modèle regroupe les spermatozoïdes caractérisés par la présence d'un ou deux axonèmes au sein de l'extrémité antérieure du spermatozoïde, de l'association « *expansion latérale+ornementations externes+microtubules corticaux* », de deux champs de microtubules corticaux parallèles, des ornementations externes localisées dans la partie distale de l'extrémité antérieure (groupe 2) ou sur toute la région antérieure (groupe 4), et finalement, du noyau au niveau de l'extrémité postérieure.

Dans ce modèle figurent les spermatozoïdes de trois des espèces traitées dans ce Mémoire, à savoir *Diplosdiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum* et *Wardula capitellata*. De plus, nous avons observé que les espèces étudiées appartenant aux superfamilles Echinostomatoidea, Microscaphidioidea, Paramphistomoidea ou Pronocephaloidea présentent ce modèle. Les Paramphistomoidea (avec quatre familles différentes explorées) serviraient de référence pour ce modèle. Concernant les Pronocephaloidea, chez le Notocotylidé *Notocotylus neyrai* (Ndiaye *et al.*, 2003b) nous avons remarqué la présence d'un spermatozoïde qui serait du modèle 3 (voir Tableau 3). Cependant, bien que le modèle 1 semble caractériser les superfamilles antérieurement citées, plusieurs études supplémentaires seront nécessaires, surtout chez les taxa inexplorés.

Modèle 2

Nous avons classé dans ce modèle, les spermatozoïdes de Digènes qui se singularisent par la présence d'un ou deux axonèmes au niveau de leur extrémité antérieure, de l'association « *ornementations externes+microtubules corticaux* », des ornementations externes généralement du groupe 2, de deux champs de microtubules corticaux parallèles et d'une extrémité postérieure exhibant un noyau.

Les spermatozoïdes de *Brachycoelium salamandrae*, *Robphildolfusium fractum* et *Rubenstrema exasperatum* sont classés dans ce modèle. Parmi les autres espèces de Digènes ayant un spermatozoïde similaire, nous pouvons mentionner l'Apocreadiidé *Neoapocreadium chabaudi* (Kacem *et al.*, 2010a), le Zoogonidé *Diphtherostomum brusinae* (Levron *et al.*, 2004c) ou encore le Plagiorchiidé *Enodiotrema reductum* (Ndiaye *et al.*, 2012b) (voir Tableau 3).

Modèle 3

Ce modèle est caractérisé par des spermatozoïdes contenant un ou deux axonèmes au sein de l'extrémité antérieure, mais également, la présence de l'association « *ornementations externes+microtubules corticaux* ». Ces ornementations externes peuvent correspondre aux groupes 1, 2, 3 ou 4 (voir tableau 3). De plus, les deux champs de microtubules corticaux sont présents et l'extrémité postérieure exhibe un seul axonème.

Parmi les espèces étudiées dans ce Mémoire, *Euryhelmis squamula* et *Mediogonimus jourdanei* présentent un spermatozoïde en accord avec ce modèle. Nous avons constaté la présence de ce modèle de spermatozoïde chez l'ensemble des espèces étudiées appartenant à la superfamille Opisthorchioidea, qui pourrait nous servir de référence (voir Tableau 3). En addition, le modèle 3 serait présent chez plusieurs autres familles, en l'occurrence les Allocreadiidae, Deropristidae, Lepocreediidae, Troglotrematidae, mais également chez certains Dicrocoeliidae (voir Tableau 3).

Modèle 4

Le modèle 4 fait référence aux Digènes dont le spermatozoïde présente un ou deux axonèmes au niveau de leur extrémité antérieure et l'association « *ornementations externes+microtubules corticaux* », avec des ornementations en majorité du groupe 2. Outre ces caractères, les spermatozoïdes de ce modèle exhibent, comme chez les modèles cités antérieurement, les deux champs de microtubules corticaux. Finalement, l'extrémité postérieure de ces spermatozoïdes se caractérise par la présence des microtubules corticaux.

Ce modèle est observé chez deux familles de Digènes (Opecoelidae et Opistholebetidae). À l'exception de l'Opecoelidé *Helicometra fasciata* (Levron *et al.*, 2003), toutes les autres espèces étudiées exhibent ce modèle 4 de spermatozoïde.

Modèle 5

Dans ce modèle nous avons observé plusieurs particularités. D'abord, l'extrémité antérieure des spermatozoïdes semble contenir un seul axonème. Puis, l'association « *ornementations externes+microtubules corticaux* » est absente, puisque ces ornementations apparaissent dans la partie proximale (groupe 1), sur une zone dépourvue de microtubules corticaux. Ensuite, contrairement aux modèles précédents, un seul champ de microtubules corticaux, présent sur la face ventrale du spermatozoïde, est observé. Finalement, l'extrémité postérieure des spermatozoïdes de ce modèle 5 contient l'axonème.

Pour l'heure, trois espèces de Digènes appartenant à trois familles différentes exhibent ce modèle. Ce sont : le Faustulidae *Pronoprymna ventricosa* (Quilichini *et al.*, 2007c), l'Hemiuuridae *Lecithocladium excisum* (Ndiaye *et al.*, sous presse) et le Lecithasteridae *Aponurus laguncula* (Quilichini *et al.*, 2010a) (voir Tableau 3). Ces deux dernières familles appartiennent à la superfamille Hemiuroidea où nous avons observé chez une autre espèce d'Hemiuuridé, à savoir *Parahemiuurus merus* (observations personnelles non publiées), tous les aspects qui sont définis pour le modèle 5 de spermatozoïde.

Il est important de signaler que jusqu'ici, tous les modèles antérieurement exposés sont caractérisés par la présence, chez leurs spermatozoïdes, de deux axonèmes de type 9+'1' des Trepaxonemata (Ehlers, 1984).

Modèle 6

Au sein de ce modèle, nous avons regroupé l'ensemble des spermatozoïdes décrits chez les espèces du genre *Schistosoma*. L'ensemble des espèces de Schistosomes décrites présente un spermatozoïde similaire, dont la morphologie est plutôt piriforme (en cône allongé), contrairement à celle filiforme rapportée chez les autres Digènes. Le seul axonème présent chez ce spermatozoïde aberrant est du type 9+'1' spécial (voir Justine, 1995, 2003), différent du type 9+'1' des Trepaxonemata. En effet, l'élément central chez les axonème du type 9+'1' spécial est faiblement contrasté. D'autre part, les doublets ne présentent pas des bras. L'extrémité antérieure du spermatozoïde chez les Schistosomes contient un « *agglomérat* » de mitochondries et un noyau, localisé juste en dessous de celles-ci. Les microtubules corticaux décrivent un cercle quasi continu autour du noyau. Chez ces spermatozoïdes l'ornementation est absente (groupe 3). Quant à l'extrémité postérieure, elle contient uniquement l'axonème.

Modèle 7

Le modèle 7 de spermatozoïde concerne, pour le moment, une seule espèce de Digène, en l'occurrence *Didymozoon* sp. (Justine & Mattei, 1983, 1984a). Le spermatozoïde de cette espèce est filiforme, comme d'ailleurs chez les autres Digènes (à l'exception des espèces du genre *Schistosoma*). De plus, Justine & Mattei (1983, 1984a) ont mentionné l'absence de microtubules corticaux sur ce spermatozoïde et la présence de deux axonèmes particuliers, appartenant au type 9+0. Quant aux ornementations externes, elles sont absentes (groupe 3). Par conséquent, l'association « *ornementations externes+microtubules corticaux* » n'est pas

présente. Concernant l'extrémité antérieure du spermatozoïde, nous avons observé la présence de deux axonèmes avant l'apparition de la mitochondrie et du noyau dans une région plus postérieure. Cependant, nous n'avons pas pu évaluer la morphologie de l'extrémité postérieure. En effet, seules des coupes contenant le noyau et les deux axonèmes ont été décrites. Par conséquent, le dernier caractère ultrastructural (noyau ou axonème) reste inconnu.

Tableau 3 : Les différents modèles de spermatozoïdes chez les Digènes associés aux différents groupes d'ornementations. GO : groupe d'ornementations externes, Mod : modèle de spermatozoïde.

| | Mod | GO | Observations |
|--|-----|-----|---|
| ECHINOSTOMATOIDEA | | | |
| Echinostomatidae | | | |
| <i>Echinostoma caproni</i> (Iomini & Justine, 1997) | 1 | G2 | |
| Fasciolidae | | | |
| <i>Fasciola gigantica</i> (Ndiaye <i>et al.</i> , 2004) | 1 | G2 | |
| <i>F. hepatica</i> (Ndiaye <i>et al.</i> , 2003a) | 1 | G2 | |
| MICROSCAPHIDIOIDEA | | | |
| Mesometridae | | | |
| <i>Elstia stossichianum</i> (Bakhoum <i>et al.</i> , sous presse a) | 1 | G2 | |
| <i>Wardula capitellata</i> (Bakhoum <i>et al.</i> , 2012a) | 1 | G4 | |
| PARAMPHISTOMOIDEA | | | |
| Cladorchidae | | | |
| <i>Basidioidiscus ectorchis</i> (Ashour <i>et al.</i> , 2007) | 1 | G2 | |
| <i>Sandonia sudanensis</i> (Ashour <i>et al.</i> , 2007) | 1 | G2 | |
| Diplodiscidae | | | |
| <i>Diplodiscus subclavatus</i> (Bakhoum <i>et al.</i> , 2011b) | 1 | G2 | |
| Gastrothylacidae | | | |
| <i>Carmyrius endopapillatus</i> (Seck <i>et al.</i> , 2008a) | 1 | G2* | *Ornementations décrites uniquement sur l'expansion latérale. |
| Paramphistomidae | | | |
| <i>Cotylophoron cotylophorum</i> (Seck <i>et al.</i> , 2008b) | 1 | G2 | |
| <i>Paramphistomum microbothrium</i> (Seck <i>et al.</i> , 2007) | 1 | G2 | |

Tableau 3 : suite

| PRONOCEPHALOIDEA | | | |
|---|----|----|---|
| Notocotylidae | | | |
| <i>Notocotylus neyrai</i> (Ndiaye et al., 2003b) | 3 | G2 | |
| Pronocephalidae | | | |
| <i>Cricocephalus albus</i> (Ndiaye et al., 2011) | 1 | G4 | |
| <i>Pleurogonius truncatus</i> (Ndiaye et al., 2012a) | 1 | G4 | |
| ALLOCREADIOIDEA | | | |
| Allocreadiidae | | | |
| <i>Crepidostomum metoecus</i> (Quilichini et al., 2007a) | 3 | G2 | |
| Opecoelidae | | | |
| <i>Helicometra epinepheli</i> (Quilichini et al., 2011b) | 4 | G2 | Présence d'une « <i>dilatation du cytoplasme</i> » décrite comme expansion latérale non associée aux microtubules corticaux et ornementations externes. |
| <i>H. fasciata</i> (Levron et al., 2003) | 4* | G3 | *L'extrémité postérieure contient le noyau et des microtubules corticaux. Nous attribuons le modèle général des Opecoelidés à cette espèce. |
| <i>Nicolla testiobliquum</i> (Quilichini et al., 2007d) | 4 | G2 | |
| <i>N. wisniewskii</i> (Quilichini et al., 2007b) | 4 | G2 | |
| <i>Opecoeloides furcatus</i> (Miquel et al., 2000) | 4 | G2 | |
| <i>Poracanthium furcatum</i> (Levron et al., 2004a) | 4 | G2 | Présence d'une « <i>dilatation du cytoplasme</i> » décrite comme expansion latérale non associée aux microtubules corticaux et ornementations externes. |
| Opistholebetidae | | | |
| <i>Heterolebes maculosus</i> (Quilichini et al., 2010b) | 4 | G2 | |
| GORGODEROIDEA | | | |
| Brachycoeliidae | | | |
| <i>Brachycoelium salamandrae</i> (Bakhoum et al., sous presse b) | 2 | G2 | |
| Dicrocoeliidae | | | |
| <i>Corrigia vitta</i> (Robinson & Halton, 1982) | 3 | G3 | |
| <i>Dicrocoelium dendriticum</i> (Cifriani et al., 1993) | 3 | G3 | |
| <i>D. hospes</i> (Agostini et al., 2005) | 1 | G2 | |
| Paragonimidae | | | |
| <i>Paragonimus ohirai</i> (Orido, 1988) | 3 | * | *Les micrographies observées sur cette espèce ne permettent pas d'attribuer un groupe d'ornementations. |
| Troglotrematidae | | | |
| <i>Troglotrema acutum</i> (Miquel et al., 2006) | 3 | G2 | Présence d'« <i>expansion latérale+microtubules corticaux+ornementations externes</i> ». |

Tableau 3 : suite

| LEPOCREADIOIDEA | | | |
|---|-----|----|---|
| Apocreadiidae | | | |
| <i>Neoapocreadium chabaudi</i> (Kacem <i>et al.</i> , 2010a) | 2 | G4 | |
| Deropristidae | | | |
| <i>Deropristis inflata</i> (Foata <i>et al.</i> , 2007) | 3 | G2 | |
| Gyliauchenidae | | | |
| <i>Gyliauchen</i> sp. (Quilichini <i>et al.</i> , 2011a) | 3 | G2 | |
| <i>Robphildolfusium fractum</i> (Bakhoum <i>et al.</i> , 2012b) | 2 | G2 | |
| Lepocreadiidae | | | |
| <i>Holorchis micracanthum</i> (Bâ <i>et al.</i> , 2011) | 3 | G2 | Présence d'une « <i>dilatation du cytoplasme</i> » décrite comme expansion latérale non associée aux microtubules corticaux et ornementations externes. |
| <i>Hypocreadium caputvadum</i> (Kacem <i>et al.</i> , 2012) | 3 | G2 | |
| MICROPHALLOIDEA | | | |
| Faustulidae | | | |
| <i>Pronoprymna ventricosa</i> (Quilichini <i>et al.</i> , 2007c) | 5 | G1 | |
| Phaneropsolidae | | | |
| <i>Postorchigenes gymnesicus</i> (Gracenea <i>et al.</i> , 1997) | 3 | G2 | |
| Prosthogonimidae | | | |
| <i>Mediogonimus jourdanei</i> (Bakhoum <i>et al.</i> , 2012c) | 3 | G2 | |
| Zoogonidae | | | |
| <i>Diphterostomum brusinae</i> (Levron <i>et al.</i> , 2004c) | 2 | G2 | |
| MONORCHIOIDEA | | | |
| Monorchiidae | | | |
| <i>Monorchis parvus</i> (Levron <i>et al.</i> , 2004b) | 2/3 | G4 | L'extrémité postérieure avec noyau et axonème ne permet pas d'attribuer un modèle précis. |
| OPISTHORCHIOIDEA | | | |
| Cryptogonimidae | | | |
| <i>Adlardia novaecaledoniae</i> (Quilichini <i>et al.</i> , 2009) | 3 | G2 | |
| <i>Anisocoelium capitellatum</i> (Ternengo <i>et al.</i> , 2009) | 3 | G2 | |
| <i>Aphallus tubarium</i> (Foata <i>et al.</i> , 2012) | 3 | G2 | |
| <i>Neochasmus</i> sp. (Jamieson & Daddow, 1982 ; Daddow & Jamieson, 1983) | 3 | G2 | |
| Heterophyidae | | | |
| <i>Cryptocotyle lingua</i> (Rees, 1979) | 3 | G3 | |
| <i>Euryhelmis squamula</i> (Bakhoum <i>et al.</i> , 2009b) | 3 | G2 | |

Tableau 3 : suite

| PLAGIORCHIOIDEA | | | |
|--|---|----|---|
| Haematoloechidae | | | |
| <i>Haematoloechus</i> sp. (Justine & Mattei, 1982b) | * | G1 | *L'absence d'information sur l'extrémité postérieure ne permet pas d'attribuer un modèle. |
| Omphalometridae | | | |
| <i>Rubenstrema exasperatum</i> (Bakhoum et al., 2011c) | 2 | G2 | |
| Plagiorchiidae | | | |
| <i>Enodiotrema reductum</i> (Ndiaye et al., 2012 b) | 2 | G2 | |
| BRACHYLAIMOIDEA | | | |
| Brachylaimidae | | | |
| <i>Scaphiostomum palaearcticum</i> (Ndiaye et al., 2002) | 3 | G2 | |
| BUCEPHALOIDEA | | | |
| Bucephalidae | | | |
| <i>Prosorhynchoides gracilescens</i> (Erwin & Halton, 1983) | 3 | G1 | |
| HEMIUROIDEA | | | |
| Didymozoidae | | | |
| <i>Didymozoon</i> sp. (Justine & Mattei, 1983, 1984a) | 7 | G3 | |
| <i>Didymocystis wedli</i> (Pamplona-Basilio et al., 2001) | * | G3 | *L'absence de données sur les extrémités antérieure et postérieure ne permet pas d'attribuer un modèle. Contrairement au genre <i>Didymozoon</i> , il y a la présence d'axonèmes de type 9+'1'. |
| <i>Gonapodasmius</i> sp. (Justine & Mattei, 1982a, 1984b) | 3 | G1 | |
| Hemuriidae | | | |
| <i>Lecithocladium excisum</i> (Ndiaye et al., sous presse) | 5 | G1 | |
| Lecithasteridae | | | |
| <i>Aponurus laguncula</i> (Quilichini et al., 2010a) | 5 | G1 | |
| SCHISTOSOMATOIDEA | | | |
| Schistosomatidae | | | |
| <i>Schistosoma bovis</i> (Justine et al., 1993) | 6 | G3 | |
| <i>S. curassoni</i> (Justine et al., 1993) | 6 | G3 | |
| <i>S. intercalatum</i> (Justine et al., 1993) | 6 | G3 | |
| <i>S. japonicum</i> (Justine & Mattei, 1981 ; Yang et al., 1998, 2003) | 6 | G3 | |
| <i>S. mansoni</i> (Justine & Mattei, 1981 ; Justine et al., 1993) | 6 | G3 | |
| <i>S. margrebowiei</i> (Justine & Mattei, 1981 ; Justine et al., 1993) | 6 | G3 | |
| <i>S. rodhaini</i> (Justine et al., 1993) | 6 | G3 | |

CINQUIÈME CHAPITRE :

CONCLUSIONS

V- Conclusions

Les résultats obtenus dans ce Mémoire et l'analyse globale de l'ensemble des études concernant l'ultrastructure de la spermiogenèse et/ou du spermatozoïde chez les Digènes nous ont permis d'établir les conclusions suivantes :

- ❖ Nous avons bien contribué à l'ampliation de la base de données ultrastructurales chez les Digènes en étudiant huit espèces différentes (*Brachycoelium salamandrae*, *Diplodiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum*, *Euryhelmis squamula*, *Mediogonimus jourdanei*, *Robphildolfusium fractum*, *Rubenstrema exasperatum* et *Wardula capitellata*) appartenant à sept familles et sept superfamilles différentes.
- ❖ La spermiogenèse décrite chez les espèces étudiées suit le modèle général rapporté chez la plupart des Digènes. Un corps intercentriolaire (généralement constitué de 7 bandes opaques aux électrons) et un angle de rotation flagellaire de 90° sont observés durant la spermiogenèse de ces espèces.
- ❖ La variabilité de l'angle de rotation flagellaire, ainsi que celle du nombre de bandes constituant le corps intercentriolaire sont deux caractères qui auraient un intérêt phylogénétique lorsqu'on compare les Digènes et certains Neodermata, en particulier les Aspidogastres et les Cestodes.
- ❖ L'étude de la spermiogenèse chez les Digènes, bien qu'elle semble homogène, permettrait, en plus de la description de certains critères d'intérêt phylogénétique, la meilleure compréhension des structures qui apparaissent au niveau du spermatozoïde mûr.
- ❖ Les spermatozoïdes des espèces étudiées possèdent les éléments ultrastructuraux classiques et constants décrits chez la grande majorité des Digènes : deux axonèmes de type 9+'1' des Trepaxonemata, un noyau, une ou plusieurs mitochondries et des microtubules corticaux parallèles.

- ❖ Des caractères ultrastructuraux additionnels tels que les expansions latérales, les ornementations externes de la membrane plasmique, les corps épineux et les morphologies variables des extrémités antérieure et postérieure, offrent un spectre intéressant de caractères utiles pour une meilleure compréhension de la phylogénie chez les Trématodes en général et les Digènes en particulier.
- ❖ Les boutons cytoplasmiques ornementés constituent un nouveau caractère décrit pour la première fois au niveau de la famille Mesometridae, grâce à l'étude de *Elstia stossichianum* et *Wardula capitellata*.
- ❖ L'analyse minutieuse de l'ensemble de ces caractères, candidats pour la phylogénie des Digènes, nous a permis de proposer sept modèles de spermatozoïdes chez les Digènes, bien que certaines études, que nous considérons incomplètes, ne soient pas tenues en compte lors de l'établissement de ces modèles.
- ❖ Les spermatozoïdes des espèces *Diplosdicus subclavatus*, *Elstia stossichianum* et *Wardula capitellata* sont placés dans le modèle 1. Dans le modèle 2 figurent les spermatozoïdes de *Brachycoelium salamandrae*, *Robphildollfusium fractum* et *Rubenstrema exasperatum*. Quant aux espèces *Euryhelmis squamula* et *Mediogonimus jourdanei*, elles présentent des spermatozoïdes qui correspondent au modèle 3.
- ❖ À l'issue de cette contribution, plusieurs perspectives sont envisageables, entre autres :
 - (a) la poursuite des études concernant l'ultrastructure de la spermiogenèse et/ou du spermatozoïde chez les taxa encore inexplorés au niveau des Trématodes en général et des Digènes en particulier,
 - (b) l'établissement d'une matrice sur la base des caractères ultrastructuraux originaires de la spermiogenèse et/ou du spermatozoïde,
 - (c) l'incorporation de ces caractères ultrastructuraux ensemble avec le reste des données, particulièrement celles moléculaires, au niveau des matrices pour l'élaboration des arbres phylogénétiques, et
 - (d) l'étude de la biologie de la fécondation afin d'apporter des informations concernant le rôle de ces différentes structures observées sur les spermatozoïdes.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- AGOSTINI S., MIQUEL J., NDIAYE P.I. & MARCHAND B. (2005).** *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 (Digenea, Dicrocoeliidae) : spermiogenesis, mature spermatozoon and ultrastructural comparative study. *Parasitology Research*, **96** : 38-48.
- AGOSTINI S., NDIAYE P.I., EIRA C., MIQUEL J. & MARCHAND B. (2004).** Ultrastructural study of the liver fluke *Dicrocoelium hospes* Looss, 1907 (Dicrocoeliidae) : the mature spermatozoa. *IXth European Multicolloquium of Parasitology*, Valencia, Spain : 607.
- AGUINALDO A.M., TURBEVILLE J.M., LINFORD L.S., RIVERA M.C., GAREY J.R., RAFF R.A. & LAKE J.A. (1997).** Evidence for a clades of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*, **387** : 489-493.
- AHN H., RIM H.-J. & KIM S.-J. (1991).** Antigenic localities in the tissues of *Metagonimus yokogawai* observed by immunogoldlabeling method. *Korean Journal of Parasitology*, **29** : 245-257.
- ASHOUR A.A., GARO K. & GAMIL I.S. (2007).** Spermiogenesis in two paramphistomes from Nile fish in Egypt : an ultrastructural study. *Journal of Helminthology*, **81** : 219-226.
- AWAD A.H.H. & PROBERT A.J. (1989).** Transmission and scanning electron microscopy of the male reproductive system of *Schistosoma margrebowiei* Le Roux, 1933. *Journal of Helminthology*, **63** : 197-205.
- AX P. (1987).** *The phylogenetic system. The systematization of organisms on the basis of their phylogensis*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
- BÂ C.T. & MARCHAND B. (1995).** Spermiogenesis, spermatozoa and phyletic affinities in the Cestoda. Dans : Jamieson B.G.M., Ausió J. & Justine J.-L. (Eds.), *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, **166** : 87-95.
- BÂ C.T., NDIAYE P.I., DIONE A., QUILICHINI Y. & MARCHAND B. (2011).** Ultrastructure of the spermatozoon of *Holorchis micracanthum* (Digenea : Lepocreadiidae), an intestinal parasite of *Plectorchinhus mediterraneus* (Pisces, Teleostei) in Senegal. *Parasitology Research*, **109** : 1099-1106.
- BAGUÑÀ J. & RIUTORT M. (2004).** Molecular phylogeny of the Platyhelminthes. *Canadian Journal of Zoology*, **82** : 168-193.
- BAKHOUM A.J.S. (2010).** *Caracteres ultraestructurales de la reproducción en el trematodo Mediogonimus jourdanei : utilidad en la filogenia de los Trematodos*. Máster de Biodiversidad, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, 29 pp.

- BAKHOUM A.J.S., BÂ C.T., FOURNIER-CHAMBRILLON C., TORRES J., FOURNIER P. & MIQUEL J. (2009b).** Spermatozoon ultrastructure of *Euryhelmis squamula* (Rudolphi, 1819) (Digenea, Opisthorchioidea, Heterophyidae), an intestinal parasite of *Mustela vison* (Carnivora, Mustelidae). *Revista Ibero-latinoamericana de Parasitología*, **1** : 37-45.
- BAKHOUM A.J.S., BÂ C.T., SHIMALOV V.V., TORRES J. & MIQUEL J. (2011c).** Spermatological characters of the digenean *Rubenstrema exasperatum* (Rudolphi, 1819) (Plagiorchioidea, Omphalometridae). *Parasitology Research*, **108** : 1283-1293.
- BAKHOUM A.J.S., BÂ C.T., TORRES J., SHIMALOV V.V. & MIQUEL J. (2009a).** Spermiogenesis of the digenean *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) (Paramphistomoidea, Diplodiscidae), an intestinal parasite of the pool frog *Rana lessonae*. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **16** : 348-349.
- BAKHOUM A.J.S., FELIU C., BÂ C.T. & MIQUEL J. (2012c).** Spermiogenesis and spermatozoon of the liver fluke *Mediogonimus jourdanei* (Microphalloidea : Prosthogonimidae), a parasite of *Myodes glareolus* (Rodentia : Cricetidae). *Folia Parasitologica*, **59** : 32-42.
- BAKHOUM A.J.S. & MIQUEL J. (2011).** Caracteres ultraestructurales del espermatozoide en la familia Mesometridae Poche, 1926 (Trematoda, Digenea). *Biología de la reproducción*, **12** : 33-36.
- BAKHOUM A.J.S., NDIAYE P.I., BÂ C.T. & MIQUEL J. (sous presse a).** Spermatological characteristics of *Elstia stossichianum* (Digenea, Mesometridae), from the intestine of the cow bream (*Sarpa salpa*) off Dakar, Senegal. *Journal of Helminthology*.
- BAKHOUM A.J.S., NDIAYE P.I., SÈNE A., BÂ C.T., MARIGO A.M. & MIQUEL J. (2011a).** Caracteres ultraestructurales del espermatozoide de *Elstia stossichianum* (Trematoda, Digenea), parásito de *Sarpa salpa* en las costas de Dakar (Senegal). *XII Congreso Ibérico de Parasitología*, Zaragoza, Spain : 239.
- BAKHOUM A.J.S., NDIAYE P.I., SÈNE A., BÂ C.T. & MIQUEL J. (2012a).** Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of *Wardula capitellata* (Digenea, Mesometridae) an intestinal parasite of the sparid teleost *Sarpa salpa* in Senegal. *Acta Parasitologica*, **57** : 34-45.
- BAKHOUM A.J.S., RIBAS A., EIRA C., BÂ C.T. & MIQUEL J. (sous presse b).** *Brachycoelium salamandrae* (Frölich, 1789) (Digenea : Brachycoeliidae) : ultrastructural study of spermiogenesis and the mature spermatozoon. *Zoologischer Anzeiger*.

- BAKHOUM A.J.S., SÈNE A., NDIAYE P.I., BÂ C.T. & MIQUEL J. (2012b).** Spermiogenesis and the spermatozoon ultrastructure of *Robphildolfusium fractum* (Digenea : Gyliauchenidae), an intestinal parasite of *Sarpa salpa* (Pisces : Teleostei). *Comptes Rendus Biologies*, **335** : 435-444.
- BAKHOUM A.J.S., ŚWIDERSKI Z., BÂ C.T., FELIU C. & MIQUEL J. (2010b).** SEM and TEM studies of the spermatozoon of the liver fluke *Mediogonimus jordanei* Mas-Coma and Rocamora, 1978. *XIIth International Congress of Parasitology*, Melbourne, Australia : 1690.
- BAKHOUM A.J.S., ŚWIDERSKI Z., KACEM H., NEIFAR L., TORRES J. & MIQUEL J. (2010a).** Ultrastructural characters of the spermatozoon of the apocreadiid digenean *Neoapocreadium chabaudi*, a parasite of *Balistes capriscus* (Pisces, Teleostei). *XIIth International Congress of Parasitology*, Melbourne, Australia : 1858.
- BAKHOUM A.J.S., TORRES J., SHIMALOV V.V., BÂ C.T. & MIQUEL J. (2011b).** Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) (Paramphistomoidea, Diplodiscidae), an intestinal fluke of the pool frog *Rana lessonae* (Amphibia, Anura). *Parasitology International*, **60** : 64-74.
- BAPTISTA-FARIAS M.F.D., KOHN A. & COHEN S.C. (2001).** Ultrastructure of spermatogenesis and sperm development in *Saccocoelioides godoyi* Kohn & Froes, 1986 (Digenea, Haploporidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96** : 61-70.
- BARTOLI P. (1987).** Caractères adaptatifs originaux des Digènes intestinaux de *Sarpa salpa* (Teleostei, Sparidae) et leur interprétation en termes d'évolution. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **62** : 542-576.
- BEDFORD J.M. (1975).** *The functional anatomy of the spermatozoon. Proceedings of the Second International Symposium, Wenner-Gren Center, Stockholm, August 1973*, Pergamon Press, Oxford, 373 pp.
- BERTMAN M. (1986).** *Brachycoelium salamandrae* (Frolich, 1789) (Trematoda, Brachycoeliidae) in *Salamandra salamandra*. *Wiadomosci Parazytologiczne*, **32** : 173-175.
- BLEIDORN C. (2008).** Lophotrochozoan relationships and parasites. A snap-shot. *Parasites*, **15** : 329-332.
- BOEGER W.A. & KRITSKY D.C. (1997).** Coevolution of the Monogenoidea (Platyhelminthes) based on a revised hypothesis of parasite phylogeny. *International Journal for Parasitology*, **27** : 1495-1511.

- BOLEK M.G. & COGGINS J.R. (1998).** Helminth parasites of the spotted salamander *Ambystoma maculatum* and red-backed salamander *Plethodon c. cinereus* from northwestern Wisconsin. *Journal of the Helminthological Society of Washington*, **65** : 98-102.
- BOURGAT R., DOSSOU C. & GASC C. (1976).** Trematodes from amphibians in south Benin. Description of *Gorgoderina beninensis* n.sp. *Annales de l'Université du Benin, Togo*, **2** : 63-68.
- BOURGAT R. & KULO S.D. (1977).** Research on the life-cycle of paramphistomid (Trematoda) of amphibians in Africa. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **52** : 7-12.
- BRAY R.A., GIBSON D.I. & JONES A. (2008).** *Keys to the Trematoda, Volume 3*. CABI Publishing and The Natural History Museum, London, 824 pp.
- BRAY R.A., WAESCHENBACH A., CRIBB T.H., WEEDALL G.D., DYAL P. & LITTLEWOOD D.T.J. (2009).** The phylogeny of the Lepocreadioidea (Platyhelminthes, Digenea) inferred from nuclear and mitochondrial genes : Implications for their systematics and evolution. *Acta Parasitologica*, **54** : 310-329.
- BROOKS D.R. (1989a).** A summary of the database pertaining to the phylogeny of the major groups of parasitic platyhelminthes, with a revised classification. *Canadian Journal of Zoology*, **67** : 714-720.
- BROOKS D.R. (1989b).** Erratum : A summary of the database pertaining to the phylogeny of the major groups of parasitic Platyhelminthes, with a revised classification. *Canadian Journal of Zoology*, **67** : 2607-2608.
- BROOKS D.R., BANDONI S.M., MACDONALD C.A. & O'GRADY R.T. (1989).** Aspects of the phylogeny of the Trematoda Rudolphi, 1808 (Platyhelminthes : Cercomeria). *Canadian Journal of Zoology*, **67** : 2609-2624.
- BROOKS D.R. & MCLENNAN D.A. (1993a).** Macroevolutionary patterns of morphological diversification among parasitic flatworms (Platyhelminthes : Cercomeria). *Evolution*, **47** : 495-509.
- BROOKS D.R. & MCLENNAN D.A. (1993b).** Comparative study of adaptative radiations with an example using parasitic flatworms (Platyhelminthes : Cercomeria). *American Naturalist*, **142** : 755-778.
- BROOKS D.R., O'GRADY R.T. & GLEN D.R. (1985).** The phylogeny of the Cercomeria Brooks, 1982 (Platyhelminthes). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, **52** : 1-20.

- BRUŇANSKÁ M., NEBESÁŘOVÁ J., SCHOLZ T. & FAGERHOLM H.-P. (2001).** Spermiogenesis in the pseudophyllid cestode *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779). *Parasitology Research*, **87** : 579-58.
- BRUŇANSKÁ M., SCHOLZ T., DEZFULI B.S. & PODDUBNAYA L.G. (2006).** Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Cyathocephalus truncatus* (Pallas, 1781) Kessler, 1868 (Cestoda : Spathebothriidea). *Journal of Parasitology*, **92** : 884-892.
- BURTON P.R. (1972).** Fine structure of the reproductive system of a frog lung-fluke. III. The spermatozoon and its differentiation. *Journal of Parasitology*, **58** : 68-83.
- BUŠTA J. & NAŠINCOVÁ V. (1991).** Developmental cycle of *Rubenstrema exasperatum* (Rudolphi, 1819) (Trematoda : Omphalometridae). *Folia Parasitologica*, **38** : 209-215.
- CABLE R.M. (1956).** *Opistholebes diodontis* n. sp., its development in the final host, the affinities of some amphistomatous trematodes from marine fishes and the allocreadioid problem. *Parasitology*, **46** : 1-13.
- CASANOVA J.C. (1993).** *Análisis ecológico de las helmintofaunas de Mamíferos silvestres : Genetta genetta (Linnaeus, 1758) (Carnivora : Viverridae), Clethrionomys glareolus Schreber, 1790 (Rodentia : Arvicolidae) y Talpa occidentalis Cabrera, 1907 (Insectívora : Talpidae)*. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 708 pp.
- CASTILHO F. & BARANDELA T. (1990).** Ultrastructural study on the spermiogenesis and spermatozoon of the metacercariae of *Microphallus primas* (Digenea), a parasite of *Carcinus maenas*. *Molecular Reproduction and Development*, **25** : 140-146.
- CATALANO P.A., WHITE A.M. & ETGES F.J. (1982).** Helminths of the salamanders *Gyrinophilus porphyriticus*, *Pseudotriton ruber*, and *Pseudotriton montanus* (Caudata : Plethodontidae) from Ohio. *Ohio Journal of Science*, **82** : 120-128.
- CHEN K., HUANG H., LU W. & DAI W. (1996).** Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis of *Hypoderaeum conoideum*, Bloch 1872 (Trematoda : Digenea : Echinostomatidae). *Journal of Shanghai Agricultural College*, **14** : 186-195.
- CHEN K.Q. & LU Y.J. (1994).** Ultrastructural studies on the spermatozoa and spermatogenesis in *Postharmostomum gallinum* (Trematoda : Digenea). *Journal of Shanghai Agricultural College*, **12** : 235-239.
- CIFRIAN B., GARCIA-CORRALES P. & MARTINEZ-ALOS S. (1993).** Ultrastructural study of the spermatogenesis and mature spermatozoa of *Dicrocoelium dendriticum* (Plathelminthes, Digenea). *Parasitology Research*, **79** : 204-212.

- COIL W.H. (1990).** Sperm and cirrus sac morphology in *Gynaecotyle adunca*. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, **8** : 187.
- COLE, R.A. & SHOOP W.L. (1987).** Helminths of the raccoon (*Procyon lotor*) in Western Kentucky. *Journal of Parasitology*, **73** : 762-768.
- COMBES C. (1991).** The schistosome scandal. *Acta Oecologica*, **12** : 165-173.
- COMBES C. & JOURDANE J. (1974).** Originalité de la chaîne des Pyrénées pour l'évolution et biologie des helminthes. *Proceedings of the III International Congress of Parasitology*, München, **1** (sec. B 2, 12) : 338-339.
- COMBES C., JOURDANE J. & RICHARD J. (1974).** Studies on the life-cycle of *Euryhelmis squamula* (Rudolphi, 1819) a parasite of *Neomys fodiens* in the Pyrenees. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **44** : 81-92.
- CRIBB T.H. (2005).** Family Opistholebetidae Fukui, 1929. Dans : Jones A., Bray R.A. & Gibson D.I. (Eds.), *Key to the Trematoda, Volume 2*. CABI Publishing and The Natural History Museum, London : 533-539.
- CRIBB T.H., BRAY R.A., LITTLEWOOD D.T.J., PICHELIN S.P. & HERNIOU E.A. (2001).** The Digenea. Dans : Littlewood D.T.J. & Bray R.A. (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London : 168-185.
- DADDOW L.Y.M. & JAMIESON B.G.M. (1983).** An ultrastructural study of spermiogenesis in *Neochasmus* sp. (Cryptogonimidae : Digenea : Trematoda). *Australian Journal of Zoology*, **31** : 1-14.
- DAVIES C. (1975).** The use of ultrastructural technique to assess the development of two metacercariae in vitro. *Parasitology*, **71** : XXV-XXVI.
- DAWES B. (1968).** *The Trematoda : with special reference to British and other European forms*. Cambridge University Press, London, 644 pp.
- DENTON J.F. (1962).** The life cycle of *Brachycoelium mesorchium* Byrd, 1937. *Journal of Parasitology*, **48**(suppl.) : 22.
- DUSEN S. & OZ M. (2006).** Helminths of the Marsh frog, *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (Anura : Ranidae), from Antalya Province, Southwestern Turkey. *Comparative Parasitology*, **73** : 121-129.
- EHLERS U. (1984).** Phylogenetisches System der Plathelminthes. *Verhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg (NF)*, **27** : 291-294.
- EHLERS U. (1985a).** Das phylogenetische System der Plathelminthes. G. Fischer, Stuttgart.

- EHLERS U. (1985b).** Phylogenetic relationships within the Platyhelminthes. Dans : Conway M.S., George J.D., Gibson R. & Platt H.M. (Eds.), *The origins and relationships of lower invertebrates*. Oxford University Press, Oxford : 143-158.
- EHLERS U. (1986).** Comments on phylogenetic system of the platyhelminthes. *Hydrobiologia*, **132** : 1-12.
- EHLERS U. (1988).** The Prolecithophora - a monophyletic taxon of the Platyhelminthes? *Fortschritte Zoologie*, **36** : 359-365.
- ENRIQUEZ G.L., RAMOS M.I. & QUERUBIN L.B. (1989).** Ultrastructure of *Schistosoma japonicum* III. The male reproductive system. *Philippine Journal of Science*, **118** : 287-305.
- ERASMUS D.A. (1987).** The adult schistosome : structure and reproductive biology. Dans : Rollinson D. & Simpson A.J.G. (Eds.), *The biology of schistosomes, from genes to latrines*. Academic Press, London : 51-82.
- ERWIN B.E. & HALTON D.W. (1983).** Fine structural observations on spermatogenesis in a progenesis trematode, *Bucephaloïdes gracilescens*. *International Journal for Parasitology*, **13** : 413-426.
- EUZET L., ŚWIDERSKI Z. & MOKHTAR-MAAMOURI F. (1981).** Ultrastructure comparée du spermatozoïde des Cestodes. Relations avec la phylogénèse. *Annales de Parasitologie (Paris)*, **56** : 247-259.
- FALTYNKOVA A., NAŠINCOVÁ V. & KABLASKOVA L. (2008).** Larval trematodes (Digenea) of planorbid snails (Gastropoda : Pulmonata) in Central Europe : a survey of species and key to their identification. *Systematic Parasitology*, **69** : 155-178.
- FELIU C. (1980).** *Contribución al conocimiento de la helmintofauna de micromamíferos ibéricos. Helmintos de Gliridae y Muridae (Rodentia)*. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 556 pp.
- FELIU C., TORRES J. & MOTJÉ M. (1989).** Primera cita en España del adulto de *Euryhelmis squamula* (Rudolphi, 1819) (Trematoda: Heterophyidae). *Revista Ibérica de Parasitología*, **49** : 215-216.
- FELSENSTEIN J. (1978).** Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology*, **27** : 401-410.
- FERRER J., GRACENA M. & GONZÁLEZ-MORENO O. (2000).** Tubulin localization in the spermatogenesis steps in *Brachylaima* sp. (Digenea). *Acta Parasitologica*, **45** : 168.

- FOATA J., QUILICHINI Y., GREANI S. & MARCHAND B. (2012).** Sperm ultrastructure of the digenetic *Aphallus tubarium* (Rudolphi, 1819) Poche, 1926 (Platyhelminthes, Cryptogonimidae) intestinal parasite of *Dentex dentex* (Pisces, Teleostei). *Tissue & Cell*, **44** : 15-21.
- FOATA J., QUILICHINI Y. & MARCHAND B. (2007).** Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Deropristis inflata* Molin, 1859 (Digenetia, Deropristidae), a parasite of *Anguilla anguilla*. *Parasitology Research*, **101** : 843-852.
- FUJINO T. & ISHII Y. (1982).** Ultrastructural studies on spermatogenesis in a parthenogenetic type of *Paragonimus westermani* (Kerbert 1878) proposed as *P. pulmonalis* (Baelz 1880). *Journal of Parasitology*, **68** : 433-441.
- FUJINO T., ISHII Y. & MORI T. (1977).** Ultrastructural studies on the spermatozoa and spermatogenesis in *Paragonimus* and *Eurytrema* (Trematoda : Digenetia). *Japanese Journal of Parasitology*, **26** : 240-255.
- GALAKTIONOV K.V. & DOBROVOLSKIY A.A. (2003).** *The biology and evolution of trematodes : An Essay on the Biology, Morphology, Life Cycle, Transmissions, and Evolution of Digenetic Trematodes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 592 pp.
- GALEANO M., NAVARRO P. & LLUCH J. (1996).** Helmintofauna de algunos herpetos del Sistema Ibérico español. *Anales de Biología*, **21** : 23-30.
- GASSMANN M. (1975).** Contribution to the study of trematodes in amphibians from the Cameroon. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **50** : 559-577.
- GENOV T. (1984).** Helminths of insectivores and rodents in Bulgaria, 348 pp.
- GETSEVICHYUTE C. (1978).** The parasite fauna of *Rana temporaria* and *R. ridibunda* on the littoral of the bay of Kurshy-Mares. *Acta Parasitologica Lituanica*, **16** : 33-43.
- GIBSON D.I. (1971).** *Studies of some helminth parasites of the flounder Platichthys flesus (L.)*. PhD, University of Aberdeen.
- GIBSON D.I., JONES A. & BRAY R.A. (2002).** *Keys to the Trematoda, Volume 1*. CABI Publishing and The Natural History Museum, London, 521 pp.
- GINETSINSKAYA T.A. & GOLUBEVA E.B. (1991).** Changes in the helminth fauna of *Rana temporaria* in the Peterhof Park over fifty years. Evolyutsiya Parazitov. Materialy pervogo vsesoyuznogo simpoziuma (Tol'yatti, 16-19 Oktyabrya 1990 g.) : 211-215.
- GOLDBERG S.R., BURSEY C.R., CALDWELL J.P., VITT L.J. & COSTA G.C. (1999).** Gastrointestinal helminths from six species of frogs and three species of lizards, sympatric in Para State, Brazil. *Comparative Parasitology*, **74** : 327-342.

- GONG R.-C., LI B.-F. & ZHU H.-Q. (1992).** The syncitial cluster forms in spermatogenesis in *Fasciola* sp. *Acta Zoologica Sinica*, **38** : 1-5.
- GONZÁLEZ-MORENO O. (2002).** Contribución al conocimiento de la bionomía de digénidos de la Familia Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930, en el delta del Llobregat (Barcelona). Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 375 pp.
- GRABDA-KAZUBSKA B. (1980).** Observations on the life cycle of *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) (Trematoda, Diplodiscidae). *Acta Parasitologica Polonica*, **27** : 261-271.
- GRACENEA M., FERRER J. & GONZÁLEZ-MORENO O. (2000).** The spermatogenesis and the spermatozoon in *Brachylaima* sp. (Digenea) : ultrastructural study. *Acta Parasitologica*, **45** : 169.
- GRACENEA M., FERRER J.R., GONZÁLEZ-MORENO O. & TRULLOLS M. (1997).** Ultrastructural study of spermatogenesis and spermatozoon in *Postorchigenes gymnesicus* (Trematoda, Lecithodendriidae). *Journal of Morphology*, **234** : 223-232.
- GRACENEA M., MONTOLIU I. & FELIU C. (1987).** Nuevos datos sobre *Mediogonimus jourdanei* Mas-Coma et Rocamora, 1978 (Trematoda : Prosthognomidae) parásito de arvicolídos en la Península Ibérica. *Revista Ibérica de Parasitología*, **47** : 127-132.
- GRANT W.C., HARKEMA R. & MUSE K.E. (1976).** Ultrastructure of *Pharyngostomoides procyonis* Harkema 1942 (Diplostomatidae). I. Observations on the male reproductive system. *Journal of Parasitology*, **62** : 39-49.
- GRESSON R.A.R. & PERRY M.M. (1961).** Electron microscope studies of spermatogenesis in *Fasciola hepatica* L. *Experimental Cell Research*, **22** : 1-8.
- HA D.N. & NGUYEN T.L. (1995).** Some species of trematodes and acanthocephalans parasitic in frogs (*Rana rugulosa*) in suburban regions of Hanoi. *Khoa Hoc Ky Thuat Thu Y*, **2** : 78-80.
- HALL K.A. & CRIBB T.H. (2005).** Family Gyliauchenidae Fukui, 1929. Dans : Jones A., Bray R.A. & Gibson D.I. (Eds.), *Keys to the Trematoda, Volume 2*. CABI Publishing and The Natural History Museum, London : 665-678.
- HENDELBURG J. (1969).** On the development of different types of spermatozoa from spermatids with two flagella in the Turbellaria with remarks on the ultrastructure of the flagella. *Zoologiska Bidrag fran Uppsala*, **38** : 1-50.
- HENDOW H.T. & JAMES B.L. (1988).** Ultrastructure of spermatozoon and spermatogenesis in *Maritrema linguilla* (Digenea : Microphallidae). *International Journal for Parasitology*, **18** : 53-63.

- HERSHENOV B.R., TULLOCH G.S. & JOHNSON A.D. (1966).** The fine structure of trematode sperm-tails. *Transactions of the American Microscopical Society*, **85** : 480-483.
- HIDALGO C., MIQUEL J., TORRES J. & MARCHAND B. (2000).** Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon in *Catenotaenia pusilla*, an intestinal parasite of *Mus musculus*. *Journal of Helminthology*, **74** : 73-81.
- HIRAI H. & TADA I. (1991).** Morphological features of spermatozoa of *Paragonimus ohirai* (Trematoda : Platyhelminthes) examined by a silver nitrate staining technique. *Parasitology*, **103** : 103-110.
- HOBERG E.P., AUBRY K.B. & BRITTELL J.D. (1990).** Helminth parasitism in martens (*Martes americana*) and ermines (*Mustela erminea*) from Washington, with comments on the distribution of *Trichinella spiralis*. *Journal of Wildlife Diseases*, **26** : 447-452.
- HOBERG E.P., MARIAUX J., JUSTINE J.-L., BROOKS D.R. & WEEKES P.J. (1997).** Phylogeny of the orders of the Eucestoda (Cercomeromorphae) based on comparative morphology : historical perspectives and a new working hypothesis. *Journal of Parasitology*, **83** : 1128-1147.
- HUANG S.-F., ZHANG Y. & YUAN L. (1998).** The submicroscopic structure of *Clonorchis sinensis*. V. The differentiation of spermatid. *Chinese Journal of Zoonoses*, **14** : 15-17.
- HUANG S.-F., ZHANG Y.-Z., YUAN L.-J., HUO X.-Q. & HAN X.-L. (1999).** The submicroscopic structure of *Clonorchis sinensis* VI. Spermiogenesis. *Chinese Journal of Zoonoses*, **15** : 32-34.
- IOMINI C. (1998).** *Le cytosquelette des spermatozoïdes des Plathelminthes parasites : la tubuline et ses modifications post-traductionnelles*. Thèse de Doctorat du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, 179 pp.
- IOMINI C., BRÉ M.-H., LEVILLIERS N. & JUSTINE J.-L. (1998).** Tubulin polyglycylation in Platyhelminthes : diversity among stable microtubule network and very late occurrence during spermiogenesis. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **39** : 318-330.
- IOMINI C. & JUSTINE J.-L. (1997).** Spermiogenesis and spermatozoon of *Echinostoma caproni* (Platyhelminthes, Digenea) : transmission and scanning electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. *Tissue & Cell*, **29** : 107-118.
- IOMINI C., MOLLARET I., ALBARET J.-L. & JUSTINE J.-L. (1997).** Spermatozoon and spermiogenesis in *Mesocoelium monas* (Platyhelminthes : Digenea) : ultrastructure and epifluorescence microscopy of labelling of tubulin and nucleus. *Folia Parasitologica*, **44** : 26-32.

- IOMINI C., RAIKOVA O., NOURY-SRAÏRI N. & JUSTINE J.-L. (1995).** Immunocytochemistry of tubulin in spermatozoa of Platyhelminthes. Dans : Jamieson B.G.M., Ausió J. & Justine J.-L. (Eds.), *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, **166** : 97-104.
- IRIE Y., BASCH P.F. & BEACH N. (1983).** Reproductive ultrastructure of adult *Schistosoma mansoni* grown in vitro. *Journal of Parasitology*, **69** : 559-566.
- IVANOV V.M. & SEMENOVA N.N. (2000).** Species composition and ecological peculiarities of trematodes from reptiles in the Volga delta. *Parazitologiya*, **34** : 228-233.
- JAMIESON B.G.M., AUSIÓ J. & JUSTINE J.-L. (1995).** *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, **166**, Paris, 564 pp.
- JAMIESON B.G.M. & DADDOW L.M. (1982).** The ultrastructure of the spermatozoon of *Neochasmus* sp. (Cryptogonimidae, Digenea, Trematoda) and its phylogenetic significance. *International Journal for Parasitology*, **12** : 547-559.
- JANCEV J. (1987).** On the morphology, taxonomy and distribution of *Euryhelmis squamula* (Rudolphi, 1819) (Trematoda : Heterophyidae) in some Mustelidae in Bulgaria. *Khelmintologiya*, **23** : 50-58.
- JEONG K.-H. & RIM H.-J. (1984).** A study on the fine structure of *Clonorchis sinensis*, a liver fluke. V. The mature spermatozoa. *Korean Journal of Parasitology*, **22** : 30-36.
- JEONG K.-H., RIM H.-J., YANG H.-Y., KIM W.-K. & KIM C.-W. (1976).** A morphological study on spermatogenesis in the liver fluke, *Clonorchis sinensis*. *Korean Journal of Parasitology*, **14** : 123-132.
- JETTON T.L. & BOGITSH B.J. (1987).** Morphological and cytochemical observations on spermatogenesis and mature sperm in schistosomes. *Transactions of the American Microscopical Society*, **106** : 99-100.
- JONES A. (2005).** Family Diplodiscidae Cohn, 1904. Dans : Jones A., Bray R.A. & Gibson D.I. (Eds.), *Keys to the Trematoda, Volume 2*. CABI Publishing and The Natural History Museum, London : 319-324.
- JONES A. & BLAIR D. (2005).** Family Mesometridae Poche, 1926. Dans : Jones A., Bray R.A. & Gibson D.I. (Eds.), *Keys to the Trematoda, Volume 2*. CABI Publishing and The Natural History Museum, London : 213-219.
- JONES A., BRAY R.A. & GIBSON D.I. (2005).** *Keys to the Trematoda, Volume 2*. CABI Publishing and The Natural History Museum, London, 745 pp.

- JORDAN H.E. & BYRD E.E. (1967).** The life cycle of *Brachycoelium mesorchium* Byrd, 1937 (Trematoda : Digenea : Brachycoeliinae). *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, **29** : 61-84.
- JOURDANE J. (1977).** Ecology of the development and transmission of the platyhelminths parasitic in Soricidae of the Pyrenees. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, **103** : 173 pp.
- JOUSSON O., BARTOLI P., ZANINETTI L. & PAWLOWSKI J. (1998).** Use of the ITS rDNA for elucidation of some life-cycles of Mesometridae (Trematoda, Digenea). *International Journal for Parasitology*, **28** : 1403-1411.
- JUSTINE J.-L. (1980).** *Étude ultrastructurale de la gamétogenèse chez Schistosoma bovis Sonsino, 1876* (Trematoda : Schistosomatidae). Thèse de 3ème Cycle, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 161 pp.
- JUSTINE J.-L. (1981).** La spermogenèse et le spermatozoïde d'un Plathelminthe : *Gonapodasmius* (Trematoda : Didymozoidae). *Biology of the Cell*, **42** : 8a.
- JUSTINE J.-L. (1982).** Étude ultrastructurale de la spermogenèse des Schistosomes (Trematoda : Schistosomatidae). *Afrique Médicale*, **21** : 287-292.
- JUSTINE J.-L. (1983).** A new look at Monogenea and Digenea spermatozoa. Dans : André J. (Ed.), *The sperm cell. Proceedings of the Fourth International Symposium on Spermatology*, Seillac, France : 454-457.
- JUSTINE J.-L. (1985).** *Étude ultrastructurale comparée de la spermogenèse des Digènes et des Monogènes (Plathelminthes). Relations entre la morphologie du spermatozoïde, la biologie de la fécondation et la phylogénie*. Thèse d'Etat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc (Montpellier II), 230 pp.
- JUSTINE J.-L. (1991a).** Phylogeny of parasitic Platyhelminthes : a critical study of synapomorphies proposed on the basis of the ultrastructure of spermogenesis and spermatozoa. *Canadian Journal of Zoology*, **69** : 1421-1440.
- JUSTINE J.-L. (1991b).** Cladistic study in the Monogenea (Platyhelminthes), based upon a parsimony analysis of spermogenetic and spermatozoal ultrastructural characters. *International Journal for Parasitology*, **21** : 821-838.
- JUSTINE J.-L. (1991c).** The spermatozoa of the schistosomes and the concept of progenetic spermogenesis. Dans : Baccetti B. (Ed.), *Comparative Spermatology 20 Years After*. Raven Press, New York : 977-979.

- JUSTINE J.-L. (1995).** Spermatozoal ultrastructure and phylogeny of the parasitic Platyhelminthes. Dans : Jamieson B.G.M., Ausió J. & Justine J.-L. (Eds.), *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, **166** : 55-86.
- JUSTINE J.-L. (1997).** La classification générale des Plathelminthes parasites : changements récents et utilisation des caractères ultrastructuraux, en particulier des spermatozoïdes. *Bulletin de la Société Française de Zoologie*, **122** : 226-277.
- JUSTINE J.-L. (1998a).** Spermatozoa as phylogenetic characters for the Eucestoda. *Journal of Parasitology*, **84** : 385-408.
- JUSTINE J.-L. (1998b).** Systématique des grands groupes de plathelminthes parasites : quoi de neuf ? *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, **16** : 34-52.
- JUSTINE J.-L. (1998c).** Non-monophyly of the monogeneans? *International Journal for Parasitology*, **28** : 1653-1657.
- JUSTINE J.-L. (1999).** Spermatozoa of Platyhelminthes : Comparative ultrastructure, tubulin immunocytochemistry and nuclear labeling. Dans : Gagnon C. (Ed.), *The Male Gamete. From Basic Science to Clinical Applications*. Cache River Press, Vienna : 352-362.
- JUSTINE J.-L. (2001).** Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes. Dans : Littlewood D.T.J. & Bray R.A. (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London : 231-238.
- JUSTINE J.-L. (2003).** Ultrastructure des spermatozoïdes et phylogénie des Neodermata. Dans : Combes C. & Jourdane J. (Eds.), *Taxonomie, écologie et évolution des métazoaires parasites*. PUP, Perpignan : 359-380.
- JUSTINE J.-L., IOMINI C., RAIKOVA O.I. & MOLLARET I. (1998).** The homology of cortical microtubules in platyhelminth spermatozoa : a comparative ultrastructural study of acetylated tubulin. *Acta Zoologica (Stockholm)*, **79** : 235-241.
- JUSTINE J.-L., JAMIESON B.G.M. & SOUTHGATE V.R. (1993).** Homogeneity of sperm structure in six species of Schistosomes (Digenea, Platyhelminthes). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **68** : 185-187.
- JUSTINE J.-L. & MATTEI X. (1981).** Étude ultrastructurale du flagelle spermatique des Schistosomes (Trematoda : Digenea). *Journal of Ultrastructure Research*, **76** : 89-95.
- JUSTINE J.-L. & MATTEI X. (1982a).** Étude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde d'un Plathelminthe : *Gonapodasmius* (Trematoda : Didymozoidae). *Journal of Ultrastructure Research*, **79** : 350-365.

- JUSTINE J.-L. & MATTEI X. (1982b).** Réinvestigation de l'ultrastructure du spermatozoïde d'*Haematoloechus* (Trematoda : Haematoloechidae). *Journal of Ultrastructure Research*, **81** : 322-332.
- JUSTINE J.-L. & MATTEI X. (1983).** A spermatozoon with two 9 + 0 axonemes in a parasitic flatworm, *Didymozoon* (Digenea : Didymozoidae). *Journal of Submicroscopic Cytology*, **15** : 1101-1105.
- JUSTINE J.-L. & MATTEI X. (1984a).** Atypical spermiogenesis in a parasitic flatworm, *Didymozoon* (Trematoda : Digenea : Didymozoidae). *Journal of Ultrastructure Research*, **87** : 106-111.
- JUSTINE J.-L. & MATTEI X. (1984b).** Ultrastructural observations on the spermatozoon, ovocyte and fertilization process in *Gonapodasmius*, a gonochoristic Trematode (Trematoda : Digenea : Didymozoidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, **65** : 171-177.
- JUSTINE J.-L. & MATTEI X. (1985).** Particularités ultrastructurales des spermatozoïdes de quelques Monogènes Polyopisthocotylea. *Annales des Sciences Naturelles (Zoologie)*, **7** : 143-152.
- JUSTINE J.-L. & MATTEI X. (1986).** Comparative ultrastructural study of spermiogenesis in monogeneans (flatworms). 5. *Calceostoma* (Monopisthocotylea, Calceostomatidae). *Journal of Ultrastructure Research*, **96** : 54-63.
- KACEM H., BAKHOUM A.J.S., NEIFAR L. & MIQUEL J. (2010a).** Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the digenous *Neoapocreadium chabaudi* (Apocreadiidae), a parasite of *Balistes capriscus* (Pisces, Teleostei). *Parasitology International*, **59** : 358-366.
- KACEM H., BAKHOUM A.J.S., TORRES J., NEIFAR L. & MIQUEL J. (2010b).** Apports de l'ultrastructure du spermatozoïde en Phylogénie. L'exemple de *Neoapocreadium chabaudi* (Digenea, Apocreadiidae). 2ème Congrès Franco-maghrébin de Zoologie et 4èmes Journées Franco-Tunisienne de Zoologie, Zarzis, Tunisia.
- KACEM H., BAKHOUM A.J.S., TORRES J., NEIFAR L. & MIQUEL J. (2012).** Étude ultrastructurale du spermatozoïde du digène *Hypocreadium caputvadum* Kacem *et al.*, 2011 (Lepocreadioidea, Lepocreadiidae), parasite intestinal du Baliste *Balistes capriscus* (Teleostei) du golfe de Gabès (Tunisie). *Ve Rencontres d'Ictyologie en France*, Paris, France : 92.
- KITAJIMA E.W., PARAENSE W.L. & CORREA L.R. (1976).** The fine structure of *Schistosoma mansoni* sperm (Trematoda : Digenea). *Journal of Parasitology*, **62** : 215-221.

- KLUPIEK P. (2001).** Die Helminthenfauna des Iltis (*Mustela putorius* L.) in seinem Nordwestdeutschen Verbreitungsgebiet, 94 pp.
- KNOEPFFLER L.P. & COMBES C. (1988).** L'Europrocte de Corse : originalité de sa faune parasitaire. Bulletin d'Écologie, **19** : 219-222.
- LANGERON M. (1949a).** *Précis de Microscopie. Tome I.* Masson & C^{IE}, Paris, 720 pp.
- LANGERON M. (1949b).** *Précis de Microscopie. Tome II.* Masson & C^{IE}, Paris, 1430 pp.
- LA RUE G.R. (1957).** The classification of digenetic Trematoda : a review and a new system. *Experimental Parasitology*, **6** : 306-344.
- LEES E. & HRISTOVSKI N.D. (1976).** The helminth fauna of the newt, *Triturus vulgaris* L., in the Pelagonia district of Macedonia - Yugoslavia. *Acta Parasitologica Iugoslavica*, **7** : 91-93.
- LEVRON C. (2004).** *Parasitisme et hyperparasitisme de poisons : études ultrastructurales de la reproduction de quatre Digènes et description de deux nouvelles espèces de Microsporidies parasites de Digènes.* Thèse doctorale, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Corse, 189 pp.
- LEVRON C., MIQUEL J., OROS M. & SCHOLZ T. (2010).** Spermatozoa of tapeworms (Platyhelminthes, Eucestoda) : advances in ultrastructural and phylogenetic studies. *Biological Reviews*, **85** : 523-543.
- LEVRON C., SUCHANOVÁ E., PODDUBNAYA L., OROS M. & SCHOLZ T. (2009).** Spermatological characters of the aspidogastrean *Aspidogaster limacoides* Diesing, 1835. *Parasitology Research*, **105** : 77-85.
- LEVRON C., TERNENGO S. & MARCHAND B. (2003).** Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Helicometra fasciata* (Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Labrus merula* (Pisces, Teleostei). *Acta Parasitologica*, **48** : 255-264.
- LEVRON C., TERNENGO S. & MARCHAND B. (2004a).** Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Poracanthium furcatum* (Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mullus surmuletus* (Pisces, Teleostei). *Acta Parasitologica*, **49** : 190-200.
- LEVRON C., TERNENGO S. & MARCHAND B. (2004b).** Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Monorchis parvus* Looss, 1902 (Digenea, Monorchiidae), a parasite of *Diplodus annularis* (Pisces, Teleostei). *Parasitology Research*, **93** : 102-110.
- LEVRON C., TERNENGO S. & MARCHAND B. (2004c).** Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Diphterostomum brusinae* (Digenea, Zoogonidae), a parasite of *Diplodus annularis* (Pisces, Teleostei). *Parasitology Research*, **94** : 147-154.

- LEWIN J. (1992).** Parasites of the sand lizard (*Lacerta agilis* L.) in Poland. *Acta Parasitologica*, **37** : 19-24.
- LI M.-M. & WANG X.-Y. (1997).** Spermatogenesis and ultrastructure of the metaphase chromosomes in *Ceylonocotyle scoliocoelium* (Digenea : Paramphistomidae). *Acta Zoologica Sinica*, **43** : 1-9.
- LITTLEWOOD D.T.J & BRAY R.A. (2001).** *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, 356 pp.
- LITTLEWOOD D.T.J., BRAY R.A. & CLOUGH K.A. (1998).** A phylogeny of the Platyhelminthes: towards a total-evidence solution. *Hydrobiologia*, **383** : 155-160.
- LITTLEWOOD D.T.J., ROHDE K., BRAY R.A. & HERNIOU E.A. (1999).** Phylogeny of the Platyhelminthes and the evolution of parasitism. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68** : 257-287.
- LITVAITIS M.K. & RHODE K. (1999).** A molecular test of platyhelminth phylogeny : inferences from partial 28S rDNA sequences. *Invertebrate Biology*, **118** : 42-56.
- LIU Y. & PAN Y. (1990).** Electron microscope studies of *Metorchis* (sic) *orientalis*. III. The spermatozoa and spermatogenesis. *Journal of the Shanghai Agricultural College*, **8** : 57-62.
- LIU Y., PAN Y. & FAN P. (1993).** Transmission electron microscope observations of the spermatozoa in three species of Trematode (Trematoda : Digenea). *Zoological Research*, **14** : 318-326.
- MANSOUR M.F.A. (2012).** Ultrastructure of the spermatozoon of *Acanthostomum spiniceps* (Digenea : Acanthostomidae), a parasite of *Bagrus* spp. (Siluriformes : Bagridae). *Parasitology Research*, **110** : 1357-1362.
- MARIGO A.M. (2011).** *Étude ultrastructurale de la spermio-génèse et du spermatozoïde chez les Cestodes. Apports en taxonomie et phylogénie*. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 273 pp.
- MARTÍNEZ M.L. (2012).** *Estudio ultraestructural de la espermiogénesis y del espermatozoide del digénido Brachycoelium salamandrae (Brachycoeliidae)*. Treball Dirigit de Salut Pública i Sanitat Ambiental I. Facultat de Farmàcia, Universidad de Barcelona, 34 pp.
- MAS-COMA S. & ROCAMORA J-M. (1978).** *Mediogonimus jourdanei* n. sp. (Trematoda : Prosthogonimidae), parasite de *Clethrionomys glareolus* Schreber, 1780 (Rodentia : Microtidae) dans les Pyrénées. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles*, **101** : 59-64.

- MASTKASI I. (1984).** Trematodes from insectivorous mammals in the Cergov Mountains (Western Carpathians, Czechoslovakia). *Miscellanea Zoologica Hungarica*, **2** : 15-16.
- MCALLISTER C.T., BURSEY C.R., UPTON S.J., TRAUTH S.E. & CONN D.B. (1995).** Parasites of *Desmognathus brimleyorum* (Caudata : Plethodontidae) from the Ouachita Mountains of Arkansas and Oklahoma. *Journal of the Helminthological Society of Washington*, **62** : 150-156.
- MEHLHORN H. (1988).** Reproduction, Platyhelminthes. Dans : Mehlhorn H. (Ed.), *Parasitology in Focus*. Springer-Verlag, Berlin : 330-344.
- MELVIN A.M. & BROOKE M.M. (1971).** *Métodos de laboratorio para diagnóstico de parasitosis intestinales*. Nueva Editorial Interamericana, Mexico, 188 pp.
- MILLÁN J., SEVILLA I., GERRIKAGOITIA X., GARCÍA-PÉREZ A.L. & BARRAL M. (2004).** Helminth parasites of the Eurasian badger (*Meles meles* L.) in the Basque Country (Spain). *European Journal of Wildlife Research*, **50** : 37-40.
- MIQUEL J. (1993).** *Contribución al conocimiento de la helmintofauna de los carnívoros silvestres de Cataluña*. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 737 pp.
- MIQUEL J., FOURNIER-CHAMBRILLON C., FOURNIER P. & TORRES J. (2006).** Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the cranial digenetic *Troglotrema acutum* (Leuckart, 1842). *Journal of Parasitology*, **92** : 441-453.
- MIQUEL J. & MARCHAND B. (2000).** Spermiogenesis and sperm ultrastructure in *Opecoeloides furcatus* (Trematoda, Digenea). *Biology of the Cell*, **2000** : 19.
- MIQUEL J. & MARCHAND B. (2001).** Tubulin immunocytochemistry of the spermatozoa in the cestode *Mesocestoides litteratus* (Mesocestoididae). *Acta Parasitologica*, **46** : 130-134.
- MIQUEL J., NDIAYE P.I., EIRA C. & MARCHAND B. (2004).** Spermatological ultrastructure of the mature spermatozoon in the genus *Fasciola* L., 1758 : a comparative analysis of *F. hepatica* L., 1758 and *F. gigantica* Cobbold, 1856. *Wiadomosci Parazyologiczne*, **50** : 79-80.
- MIQUEL J., NOURRISSON C. & MARCHAND B. (2000).** Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Opecoeloides furcatus* (Trematoda, Digenea, Opecoelidae), a parasite of *Mullus barbatus* (Pisces, Teleostei). *Parasitology Research*, **86** : 301-310.

- MIQUEL J., ŚWIDERSKI Z., FORONDA P., TORRES J. & FELIU C. (2009).** Ultrastructure of spermatogenesis of *Taenia taeniaeformis* (Batsch, 1786) (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) and comparison of spermatological characters in the family Taeniidae Ludwig, 1886. *Acta Parasitologica*, **54** : 230-243.
- MIQUEL J., ŚWIDERSKI Z., MACKIEWICZ J.S. & IBRAHEEM M.H. (2008).** Ultrastructure of spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Wenyonia virilis* Woodland, 1923, with re-assessment of flagellar rotation in *Glaridacris catostomi* Cooper, 1920. *Acta Parasitologica*, **53** : 19-29.
- MONTOLIU I. (1984).** *Revisión de la biología y ecología de la familia Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930 (Trematoda : Digenea), en especial énfasis en las especies parásitas de Mamíferos.* Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, 660 pp.
- MORAVEC F. (1984).** Some helminth parasites from amphibians of Vancouver Island, B.C., Western Canada. *věstnik Československe Společnosti Zoologické*, **48** : 107-114.
- MORSETH D.J. (1969).** Sperm tail finestructure of *Echinococcus granulosus* and *Dicrocoelium dendriticum*. *Experimental Parasitology*, **24** : 47-53.
- MOTJÉ M. (1995).** *Contribución al conocimiento de la helmintofauna de la familia Mustelidae (Carnivora) en la Península Ibérica.* Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 472 pp.
- NDIAYE P.I. (2002).** *Estudio ultraestructural de la espermiogénesis y del espermatozoide de un Trematodo *Notocotylus neyrai* González Castro, 1945 (Digenea, Notocotylidae) y de un Cestodo *Taenia parva* Baer, 1926 (Cyclophyllidea, Taeniidae).* Màster Experimental en Ciències Farmacèutiques (Parasitologia), Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 95 pp.
- NDIAYE P.I. (2003).** *Systématique et phylogénie de Plathelminthes parasites (Trematoda et Cestoda) : apports des études ultrastructurales de la reproduction.* Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 293 pp.
- NDIAYE P.I., AGOSTINI S., CORTADELLAS N., FONS R., FELIU C., MIQUEL J. & MARCHAND B. (2003d).** Scanning and transmission electron microscopy of spermatozoon of *Fasciola hepatica* parasitizing natural Muridae reservoirs in Corsica. *Proceedings of the IX International Helminthological Symposium*, Stara Lesna, Slovak Republic : 29.
- NDIAYE P.I., DIAGNE P.M., SÈNE A., BAKHOUM A.J.S. & MIQUEL J. (sous presse).** Ultrastructure of the spermatozoon of the digenetic *Lecithocladium excisum* (Rudolphi, 1819) (Hemimeroidea : Hemiuridae), a parasite of marine teleosts in Senegal. *Folia Parasitologica*.

- NDIAYE P.I., MIQUEL J., BÂ C.T., FELIU C. & MARCHAND B. (2002).** Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Scaphiostomum palaearcticum* Mas-Coma, Esteban et Valero, 1986 (Trematoda, Digenea, Brachylaimidae). *Acta Parasitologica*, **47** : 259-271.
- NDIAYE P.I., MIQUEL J., BÂ C.T. & MARCHAND B. (2001).** Desarrollo espermático en *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856 (Digenea, Fasciolidae): estudio ultraestructural. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **8** : 17.
- NDIAYE P.I., MIQUEL J., BÂ C.T. & MARCHAND B. (2004).** Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of the liver fluke *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856 (Digenea, Fasciolidae), a parasite of cattle in Senegal. *Journal of Parasitology*, **90** : 30-40.
- NDIAYE P.I., MIQUEL J., FELIU C. & MARCHAND B. (2003b).** Ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa of *Notocotylus neyrai* González Castro, 1945 (Digenea, Notocotylidae), intestinal parasite of *Microtus agrestis* (Rodentia : Arvicolidae) in Spain. *Invertebrate Reproduction and Development*, **43** : 105-115.
- NDIAYE P.I., MIQUEL J., FONS R. & MARCHAND B. (2003a).** Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the liver fluke *Fasciola hepatica* L., 1758 (Digenea, Fasciolidae) : scanning and transmission electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. *Acta Parasitologica*, **48** : 182-194.
- NDIAYE P.I., MIQUEL J. & MARCHAND B. (2003c).** Ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa of *Taenia parva* Baer, 1926 (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae), a parasite of the common genet (*Genetta genetta*). *Parasitology Research*, **89** : 34-43.
- NDIAYE P.I., QUILICHINI Y., SÈNE A., BÂ C.T. & MARCHAND B. (2011).** Ultrastructure of the spermatozoon of the digenean *Cricoccephalus albus* (Kuhl & van Hasselt, 1822) Looss, 1899 (Platyhelminthes, Pronocephaloidea, Pronocephalidae), parasite of “the hawksbill sea turtle” *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) in Senegal. *Zoologischer Anzeiger*, **250** : 215-222.
- NDIAYE P.I., QUILICHINI Y., SÈNE A., TKACH V.V., BÂ C.T. & MARCHAND B. (2012a).** Ultrastructural study of the male gamete of *Pleurogonius truncatus* Prudhoe, 1944 (Platyhelminthes, Digenea, Pronocephalidae) parasite of *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766). *Comptes Rendues Biologies*, **335** : 239-246.

- NDIAYE P.I., QUILICHINI Y., SÈNE A., TKACH V.V., BÂ C.T. & MARCHAND B. (2012b).** Ultrastructural study of the spermatozoon of the digenean *Enodiotrema reductum* Looss, 1901 (Platyhelminthes, Plagiorchioidea, Plagiorchiidae), parasite of the green turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) in Senegal. *Parasitology Research*, **111** : 859-864.
- NESEMERI L. & HOLLO F. (1961).** Diagnóstico parasitológico veterinario. Zaragoza, 303 pp.
- NOIKOV M.V. (1992).** The trematodes and cestodes of *Sorex araneus* L. in Valaam Island (Ladoga Lake, USSR). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **87** : 155-160.
- OLSON P.D., CRIBB T.H., TKACH V.V., BRAY R.A. & LITTLEWOOD D.T.J. (2003).** Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes : Trematoda). *International Journal for Parasitology*, **33** : 733-755.
- OLSON P.D., LITTLEWOOD D.T.J., BRAY R.A. & MARIAUX J. (2001).** Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes : Cestoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **19** : 443-467.
- ORIDO Y. (1988).** Ultrastructure of spermatozoa of the lung fluke, *Paragonimus ohirai* (Trematoda : Troglotrematidae), in the seminal receptacle. *Journal of Morphology*, **196** : 333-343.
- OTUBANJO O.O. (1980).** The ultrastructure of the ducts of the male reproductive system. *Parasitology*, **81** : 565-571.
- OTUBANJO O.O. (1981a).** *Schistosoma mansoni* : the sustentacular cells of the testes. *Parasitology*, **82** : 125-130.
- OTUBANJO O.O. (1981b).** *Schistosoma mansoni* : Astiban-induced damage to tegument and the male reproductive system. *Experimental Parasitology*, **52** : 161-170.
- PAMPLONA-BASILIO M.C., BAPTISTA-FARIAS M.F.D. & KOHN A. (2001).** Spermatogenesis and spermiogenesis in *Didymocystis wedli* Ariola, 1902 (Didymozoidae, Digenea). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96** : 1153-1159.
- PEARSON J. (2008).** Family Heterophyidae Leiper, 1909. Dans : Bray R.A., Gibson D.I. & Jones A. (Eds.), *Keys to the Trematoda, Volume 3*. CABI Publishing and The Natural History Museum, London : 113-141.
- PÉREZ-DEL OLMO A., GIBSON D.I., FERNÁNDEZ M., SANISIDRO O., RAGA J.A. & KOSTADINOVA A. (2006).** Descriptions of *Wardula bartolii* n. sp. (Digenea : Mesometridae) and three newly recorded accidental parasites of *Boops boops* L. (Sparidae) in the NE Atlantic. *Systematic Parasitology* **63** : 99-109.

- PHILIPPE H., LARTILLOT N. & BRINKMANN H. (2005).** Multigene analyses of bilaterian animals corroborate the monophyly of Ecdysozoa, Lophotrochozoa, and Protostomia. *Molecular Biology and Evolution*, **22** : 1246-1253.
- PIKE A.W. (1979).** Helminth parasites of the amphibians *Dicroglossus occipitalis* (Gunther) and *Bufo regularis* Reuss, in Khartoum, Republic of Sudan. *Journal of Natural History*, **13** : 337-376.
- POCHE F. (1926).** Das System der Platodaria. *Archiv für Naturgeschichte*, **91** : 1-459.
- PODVYAZNAYA I.M. (1996).** The fine structure of the male reproductive system and genital atrium of bat parasite *Allassogonoporus amphoraeformis* (Trematoda : Allassogonoporidae). *Parazitologiya*, **30** : 229-235.
- POJMAŃSKA T. (2008).** Family Brachycoeliidae Looss, 1899. Dans : Bray R.A., Gibson D.I. & Jones A. (Eds.), *Keys to the Trematoda, Volume 3*. CABI Publishing and The Natural History Museum, London : 219-223.
- POJMAŃSKA T., TKACH V.V. & GIBSON D.I. (2008).** Genera *incertae sedis*, genera *inquirenda*, *nomina nuda*, larval or collective names and recently erected genera. Dans : Bray R.A., Gibson D.I. & Jones A. (Eds.), *Keys to the Trematoda, Volume 3*. CABI Publishing and The Natural History Museum, London : 735-755.
- POPIOEK M., ROZENBLUT-KOSCISTY B., KOT M., NOSAL W. & OGIELSKA M. (2011).** Endoparasitic helminths of water frog complex in Poland : do differences exist between the parental species *Pelophylax ridibundus* and *Pelophylax lessonae*, and their natural hybrid *Pelophylax esculentus*? *Helminthologia*, **48** : 108-115.
- POWELL E.C. (1972).** Optical and electron microscope studies on the excretory bladder of the supposed epitheliocystid cercaria of *Ochetosoma aniarum*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **40** : 19-30.
- POWELL E.C. (1973).** Studies on the excretory ‘bladder’ and caudal ducts of the supposed anepitheliocystid cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **43** : 43-52.
- POWELL E.C. (1975).** The ultrastructure of the excretory bladder in the supposed anepitheliocystid cercariae of *Posthodiplostomum minimum* (MacCallum, 1921). *Iowa State Journal of Research*, **49** : 259-262.
- QUILICHINI Y. (2007).** *Étude ultrastructurale des Plathelminthes parasites de poissons. Parasitologie et écotoxicologie des salmonidés de Corse*. Thèse doctorale, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Corse, Volume I, 192 pp.

- QUILICHINI Y., FOATA J., JUSTINE J.-L., BRAY R.A. & MARCHAND B. (2009).** Sperm ultrastructure of the digenetic *Siphoderina elongata* (Platyhelminthes, Cryptogonimidae) intestinal parasite of *Nemipterus furcosus* (Pisces, Teleostei). *Parasitology Research*, **105** : 87-95.
- QUILICHINI Y., FOATA J., JUSTINE J.-L., BRAY R.A. & MARCHAND B. (2010a).** Spermatozoon ultrastructure of *Aponurus laguncula* (Digenea : Lecithasteridae), a parasite of *Aluterus monoceros* (Pisces, Teleostei). *Parasitology International*, **59** : 22-28.
- QUILICHINI Y., FOATA J., JUSTINE J.-L., BRAY R.A. & MARCHAND B. (2010b).** Ultrastructural study of the spermatozoon of *Heterolebes maculosus* (Digenea, Opistholebetidae), a parasite of the porcupinefish *Diodon hystrix* (Pisces, Teleostei). *Parasitology International*, **59** : 427-434.
- QUILICHINI Y., FOATA J., JUSTINE J.-L., BRAY R.A & MARCHAND B. (2011a).** Spermatozoon ultrastructure of *Gyliauchen* sp. (Digenea : Gyliauchenidae), an intestinal parasite of *Siganus fuscescens* (Pisces : Teleostei). *Biological Bulletin*, **221** : 197-205.
- QUILICHINI Y., FOATA J., JUSTINE J-L., BRAY R.A & MARCHAND B. (2011b).** Sperm ultrastructure of *Helicometra epinepheli* (Platyhelminthes, Digenea, Opecoelidae), parasite of *Epinephelus fasciatus* (Pisces, Teleostei). *Histology and Histopathology*, **26** : 1019-1028.
- QUILICHINI Y., FOATA J. & MARCHAND B. (2007c).** Ultrastructural study of the spermatozoon of *Pronoprymna ventricosa* (Digenea, Baccigerinae), parasite of the twaite shad *Alosa fallax* Lacepede (Pisces, Teleostei). *Parasitology Research*, **101** : 1125-1130.
- QUILICHINI Y., FOATA J. & MARCHAND B. (2007d).** Ultrastructural study of the spermatozoon of *Nicolla testiobliquum* (Digenea, Opecoelidae) parasite of brown trout *Salmo trutta* (Pisces, Teleostei). *Parasitology Research*, **101** : 1295-1301.
- QUILICHINI Y., FOATA J., ORSINI A. & MARCHAND B. (2007a).** Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon of *Crepidostomum metoecus* (Digenea : Allocryptadiidae), a parasite of *Salmo trutta* (Pisces : Teleostei). *Journal of Parasitology*, **93** : 458-468.

- QUILICHINI Y., FOATA J., ORSINI A. & MARCHAND B. (2007b).** Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of *Nicolla wisniewskii* (Digenea : Opecoelidae), an intestinal parasite of brown trout *Salmo trutta* (Pisces : Teleostei). *Journal of Parasitology*, **93** : 469-478.
- REES F.G. (1979).** The ultrastructure of the spermatozoon and spermiogenesis in *Cryptocotyle lingua* (Digenea : Heterophyidae). *International Journal for Parasitology*, **9** : 405-419.
- REYNOLDS E.S. (1963).** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, **17** : 208-212.
- RIBAS A., CASANOVA J.C., MIQUEL J., FONS R., GUISSET C. & FELIU C. (2005).** On the fauna of digenetic trematodes, parasites of small mammals, in the Natural Reserves of Py and Mantet (Oriental Pyrenees, France). *Helminthologia*, **42** : 71-75.
- RICCI M. (1987).** Parassiti del gen. *Speleomantes* (Amphibia : Urodela : Plethodontidae) in Italia. *Rivista di Parassitologia*, **4** : 5-25.
- ROBINSON R.D. & HALTON D.W. (1982).** Fine structural observations on spermatogenesis in *Corrigia vitta* (Trematoda : Dicrocoeliidae). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **68** : 53-72.
- ROHDE K. (2002).** Subclass Aspidogastrea Faust & Tang, 1936. Dans : Gibson D.I., Jones A. & Bray R.A. (Eds.), *Keys to the Trematoda. Volume 1*. CABI Publishing and The Natural History Museum, London : 5-14.
- ROHDE K., WATSON N.A. & CRIBB T. (1991).** Ultrastructure of sperm and spermatogenesis of *Lobatostoma manteri* (Trematoda, Aspidogastrea). *International Journal for Parasitology*, **21** : 409-419.
- SALAMI-CADOUX M.L. & DE GREGORIO R. (1976).** Présence de *Diplodiscus subclavatus* au Togo. Considérations sur le genre *Diplodiscus* (Digenea, Paramphistomidae) en Afrique et à Madagascar. *Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire, Série A*, **38** : 785-796.
- SAMPOUR M. (2004).** The ultrastructure of spermatogenesis of *Haploporus benedenii* (Digenea : Haploporidae). *IXth European Multicolloquium of Parasitology*, Valencia, Spain : 606.
- SATO M., OH M. & SAKODA K. (1967).** Electron microscopic study of the spermatogenesis in the lung fluke (*Paragonimus miyazakii*). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopisch-Anatomie*, **77** : 232-243.
- SCHMIDT G.D. (1986).** *Handbook of tapeworm identification*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 675 pp.

- SECK M.T., MARCHAND B. & BÂ C.T. (2007).** Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Paramphistomum microbothrium* (Fischoeder 1901; Digenea, Paramphistomidae), a parasite of *Bos taurus* in Senegal. *Parasitology Research*, **101** : 259-268.
- SECK M.T., MARCHAND B. & BÂ C.T. (2008a).** Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Carmyerius endopapillatus* (Digenea, Gastrothylacidae), a parasite of *Bos taurus* in Senegal. *Acta Parasitologica*, **53** : 9-18.
- SECK M.T., MARCHAND B. & BÂ C.T. (2008b).** Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Cotylophoron corylophorum* (Trematoda, Digenea, Paramphistomidae), a parasite of *Bos taurus* in Senegal. *Parasitology Research*, **103** : 157-166.
- SEGOVIA J.M., TORRES J., MIQUEL J., SOSPEDRA E., GUERRERO R. & FELIU C. (2007).** Analysis of helminth communities of the pine marten, *Martes martes*, in Spain : Mainland and insular data. *Acta Parasitologica*, **52** : 156-164.
- SHARMA P.N. & RAI N. (1995).** Ultrastructural study on spermatogenesis in *Ganeo trigrinum*, an intestinal trematode of *Rana tigrina*. *Journal of Helminthology*, **69** : 77-84.
- SHIMALOV V.V. & SHIMALOV V.T. (2002).** Helminth fauna of the red squirrel (*Sciurus vulgaris* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. *Parasitology Research*, **88** : 1008.
- SHIMALOV V.V., SHIMALOV V.T. & SHIMALOV A.V. (2001).** Helminth fauna of newts in Belorussian Polesie. *Parasitology Research*, **87** : 356.
- SMITH J.P.S. III, TYLER S. & RIEGER R.M. (1986).** Is the Turbellaria polyphyletic? *Hydrobiologia*, **132** : 71-78.
- SOHN W.M. & LEE S.H. (1993).** Transmission electron microscopic ultrastructure of the male germinal cells of *Fibricola seoulensis*. *Korean Journal of Parasitology*, **31** : 183-191.
- SOPOTT-EHLERS B. (1990).** Functional aspects of the intercentriolar body in the spermiogenesis of *Nematoplaena coelogynoporoidea* (Platyhelminthes, Proseriata). *Zoomorphology*, **109** : 245-250.
- SPURR A.R. (1969).** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy of the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Trematoda : Digenea). *Parasitology*, **101** : 395-407.
- STITT A.W. & FAIRWEATHER I. (1990).** Spermatogenesis and the fine structure of the mature spermatozoon of the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Trematoda : Digenea). *Parasitology*, **101** : 395-407.

- STITT A.W. & FAIRWEATHER I. (1992).** Spermatogenesis in *Fasciola hepatica* : an ultrastructural comparison of the effects of the anthelminthic, triclabendazole (“Fasinex”) and the microtubule inhibitor, tubulozole. *Invertebrate Reproduction and Development*, **22** : 139-150.
- STITT A.W., FAIRWEATHER I. & JOHNSTON C.F. (1991).** *Fasciola hepatica* : disruption of spermatogenesis by the microfilament inhibitor cytochalasin B. *Parasitology Research*, **77** : 123-128.
- SWARNAKAR G. (2010).** Ultrastructural study on spermatogenesis in rumen amphistome *Orthocoelium scoliocoelium* (Trematoda : Digenea), a parasite of *Bubalus bubalis* in Udaipur. *The Bioscan*, **5** : 347-353.
- ŚWIDERSKI Z. (1986).** Three types of spermogenesis in cestodes. *Proceedings of the XIth International Congress of Electron Microscopy*, Kyoto, Japan : 2959-2960.
- ŚWIDERSKI Z. & TSINONIS N. (1986).** Spermatogenesis in *Schistosoma mattheei*. *Proceedings of the 12th International Congress on Electron Microscopy*, Kyoto, Japan : 3325-3326.
- TANG J.-Y. (1996).** Ultrastructural studies on sperm of *Dicrocoelium chinensis* (Trematoda : Digenea). *Acta Zoologica Sinica*, **42** : 337-342.
- TANG J.-Y. & LI M.-M. (1996).** Ultrastructural studies on spermatogenesis of *Dicrocoelium chinensis* (Trematoda : Digenea). *Acta Zoologica Sinica*, **42** : 225-230.
- TANG J., WANG W. & WANG G. (1998).** Studies on ultrastructure of spermatogenesis and sperm in *Pseudorhipidocotyle elpichthys*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, **22** : 168-173.
- TERNENGO S., QUILICHINI Y., KATHARIOS P. & MARCHAND B. (2009).** Sperm ultrastructure of the gall bladder fluke *Anisocoelium capitellatum* (Digenea : Cryptagonimidae), a parasite of *Uranoscopus scaber* (Pisces : Uranoscopidae). *Parasitology Research*, **104** : 801-807.
- THIÉRY J.P. (1967).** Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *Journal of Microscopy*, **6** : 987-1018.
- THULIN J. (1981).** *On the morphology and early development of the marine blood-fluke Aporocotyle simplex Odhner, 1900 (Digenea, Sanguinicolidae)*. Dissertation, University of Göteborg, Sweden.
- THULIN J. (1982).** Observations on the process of fertilization in *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900 (Digenea, Sanguinicolidae). *Molecular and Biochemical Parasitology*, **Suppl.** : 115-116.

- TKACH V.V. (2008).** Family Omphalometridae Looss, 1899. Dans : Bray R.A., Gibson D.I. & Jones A. (Eds.), *Keys to the Trematoda, Volume. 3*. CABI Publishing and The Natural History Museum, London : 319-324.
- TKACH V., GRABDA-KAZUBSKA B. & ŚWIDERSKI Z. (2001).** Systematic position and phylogenetic relationships of the family Omphalometridae (Digenea, Plagiorchiida) inferred from partial lsrdNA sequences. *International Journal for Parasitology*, **31** : 81-85.
- TKACH V.V., LITTLEWOOD D.T.J., OLSON P.D., KINSELLA M. & ŚWIDERSKI Z. (2003).** Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda : Digenea). *Systematic Parasitology*, **56** : 1-15.
- TKACH V., PAWLOWSKI J. & MARIAUX J. (2000).** Phylogenetic analysis of the suborder Plagiorchiata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial lsrdNA sequences. *International Journal for Parasitology*, **30** : 83-93.
- TORRES J., FELIU C., MIQUEL J., CASANOVA J.C., GARCÍA-PEREÀ R. & GISBERT J. (1996).** Helmitofauna de *Mustela putorius* Linnaeus, 1758 (Carnivora: Mustelidae) en la península Ibérica. *Bulletí de la Societat d'Història Natural de les Balears*, **39** : 155-165.
- TORRES J., MAÑAS S., PALAZÓN S., CEÑA J.C., MIQUEL J. & FELIU C. (2003).** Helminth parasites of *Mustela lutreola* (Linnaeus, 1761) and *M. vison* Schreber, 1777 in Spain. *Acta Parasitologica*, **48** : 55-59.
- TORRES J., MIQUEL J., FOURNIER P., FOURNIER-CHAMBRILLON C., LIBERGE M., FONS R. & FELIU C. (2008).** Helminth communities of the autochthonous mustelids *Mustela lutreola* and *M. putorius* and the introduced *Mustela vison* in south-western France. *Journal of Helminthology*, **82** : 349-355.
- TORRES J., MIQUEL J. & MOTJÉ M. (2001).** Helminth parasites of the eurasian badger (*Meles meles* L.) in Spain: a biogeographic approach. *Parasitology Research*, **87** : 259-263.
- VAN BENEDEN P.J. (1858).** *Mémoire sur les vers intestinaux*. J. B. Baillière, Paris.
- VASHETKO E.V. & SIDDIKOV B.H. (1999).** The effect of the ecology of toads on the distribution of helminths. *Turkish Journal of Zoology*, **23** : 107-110.
- WAESCHENBACH A., WEBSTER B.L, BRAY R.A. & LITTLEWOOD D.T.J. (2007).** Added resolution among ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes : Cestoda) with complete small and large subunit nuclear ribosomal RNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **45** : 311-325.

- WAESCHENBACH A., WEBSTER B.L. & LITTLEWOOD D.T.J. (2012).** Adding resolution to ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes : Cestoda) with large fragments of mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **63** : 834-847.
- WATSON N.A. & ROHDE K. (1995).** Re-examination of spermatogenesis of *Multicotyle purvisi* (Platyhelminthes, Aspidogastrea). *International Journal for Parasitology*, **25** : 579-586.
- WITTRICK D.D. (1976).** *Histochemical and ultrastructural studies of Quinqueserialis quinqueserialis (Trematoda : Notocotylidae)*. Dissertation, Iowa State University, Ames, Iowa.
- YAMAGUTI S. (1971).** *Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. Volume V*. Interscience Publishers Co, Tokyo, 1074 pp.
- YAMAGUTI S. (1975).** *A synoptical review of life histories of Digenetic Trematodes of Vetebrates*. Keigaku Publishing Co, Tokyo, 590 pp.
- YANG M.-Y., DONG H.-F. & JIANG M.-S. (2003).** Ultrastructural observation of spermatozoa and fertilization in *Schistosoma japonicum*. *Acta Tropica*, **85** : 63-70.
- YANG M., JIANG M., LI Y., DONG H. & ZHOU S. (1998).** Ultrastructure of *Schistosoma japonicum* sperm. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, **16** : 264-272.
- YLDRMHAN H.S., BURSEY C.R. & GOLDBERG S.R. (2005).** Helminth parasites of the Caucasian salamander, *Mertensiella caucasica*, from Turkey. *Comparative Parasitology*, **72** : 75-87.
- YLDRMHAN H.S., SUMER N., INCEDOGAN S. & BURSEY C.R. (2012).** Helminth parasites of the lemon-yellow tree frog, *Hyla savignyi* (Hylidae), from Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, **36** : 171-174.
- YONEVA A., GEORGIEVA K., MIZINSKA Y., NIKOLOV P.N., GEORGIEV B.B. & STOITSOVA S.R. (2010).** Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Anonchotaenia globata* (von Linstow, 1879) (Cestoda, Cyclophyllidea, Paruterinidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, **91** : 184-192.
- ZBIKOWSKA E. (2007).** Digenea species in chosen populations of freshwater snails in northern and central part of Poland. *Wiadomosci Parazyologiczne*, **53** : 301-308.
- ŽDÁRSKÁ Z., SOBOLEVA T.N., ŠTĚRBA J. & VALKOUNOVÁ J. (1991).** Ultrastructure of the male reproductive system of the trematode *Brachylaimus aequans*. *Folia Parasitologica (Praha)*, **38** : 33-37.

ZHAO J. & HUANG S. (1989). Ultrastructural studies on the spermatogenesis in diploid and triploid types of *Paragonimus westermani*. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 7 : 204-206, plate p. 11.

ABSTRACT

The present Thesis represents a contribution to the knowledge about the ultrastructure of spermiogenesis and of the mature spermatozoon of digeneans. We present for the first time spermatological data concerning eight species belonging to seven families and superfamilies: *Brachycoelium salamandrae* (Gorgoderoidea: Brachycoeliidae), *Diplodiscus subclavatus* (Paramphistomoidea: Diplodiscidae), *Euryhelmis squamula* (Opisthorchioidea: Heterophyidae), *Elstia stossichianum* and *Wardula capitellata* (Microscaphidioidea: Mesometridae), *Mediogonimus jourdanei* (Microphalloidea: Prosthognomidae), *Robphildolfusium fractum* (Lepocreadioidea: Gyliauchenidae), and *Rubenstrema exasperatum* (Plagiorchioidea: Omphalometridae).

A global analysis of the spermatological characteristics of these species and those already described in the Digenea, allows us to establish seven sperm models within digeneans.

The importance of several ultrastructural characteristics, combined with the proposed models are discussed in order to contribute to a better understanding of digenean phylogenetic relationships.

Key words: Digenea, Spermiogenesis, Spermatozoon, Ultrastructure, TEM, SEM, *Brachycoelium salamandrae*, *Diplodiscus subclavatus*, *Elstia stossichianum*, *Euryhelmis squamula*, *Mediogonimus jourdanei*, *Robphildolfusium fractum*, *Rubenstrema exasperatum*, *Wardula capitellata*.

