



Divisió de Ciències de la Salut

Facultat de Farmàcia

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I PARASITOLOGIA SANITÀRIES

Laboratori de Parasitologia

TESIS DOCTORAL

**SYSTÉMATIQUE ET PHYLOGÉNIE DE
PLATHELMINTHES PARASITES
(TREMATODA ET CESTODA) :
APPORTS DES ÉTUDES ULTRASTRUCTURALES
DE LA REPRODUCTION**

Por

Papa Ibnou NDIAYE

Directores:

Dr. Jordi MIQUEL COLOMÉ
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries,
Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona

Prof. Bernard MARCHAND
Département Parasites et Écosystèmes Méditerranéens,
Faculté des Sciences et Techniques, Université de Corse

Barcelona, 2003

TABLE DES MATIÈRES

ABSTRACT

REMERCIEMENTS

1. INTRODUCTION

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. MATÉRIEL D'ÉTUDES

2.1.1. TRÉMATODES ÉTUDIÉS

2.1.2. CESTODES ÉTUDIÉS

2.2. MÉTHODES D'ÉTUDES

2.2.1. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE (MEB)

2.2.2. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION (MET)

2.2.3. CYTOCHIMIE

2.2.4. IMMUNOCYTOCHIMIE

3. RÉSULTATS : ARTICLES

3.1. Ndiaye, P. I., Miquel, J., Bâ, C. T., Feliu, C. & Marchand, B.

Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Scaphiostomum palaearticum* Mas-Coma, Esteban et Valero, 1986 (Trematoda, Digenea, Brachylaimidae)
Acta Parasitologica (2002) **47**(4): 259-271

3.2. Ndiaye, P. I., Miquel, J., Feliu, C. & Marchand, B.

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 (2003) **43**(2): 105-115

3.3. Ndiaye, P. I., Miquel, J., Bâ, C. T. & Marchand, B.

Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of the liver fluke *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856 (Digenea, Fasciolidae), a parasite of cattle in Senegal
Journal of Parasitology (2003) in press

3.4. Ndiaye, P. I., Miquel, J., Fons, R. & Marchand, B.

Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the liver fluke *Fasciola hepatica* L., 1758 (Digenea, Fasciolidae): scanning and transmission electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry

Acta Parasitologica (2003) **48**(3): 182-194.

- 3.5. Ndiaye, P.I., Miquel, J. & Marchand, B.
Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoa of *Taenia parva* Baer, 1926 (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae), a parasite of the common genet (*Genetta genetta*)
Parasitology Research (2003) **89**(1): 34-43
- 3.6. Ndiaye, P. I., Agostini, S., Miquel, J. & Marchand, B.
Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon in the genus *Joyeuxiella* Fuhrmann, 1935 (Cestoda, Cyclophyllidea, Dipylidiidae): Comparative analysis of *J. echinorhynchoides* (Sonsino, 1889) and *J. pasqualei* (Diamare, 1893)
Parasitology Research (2003) **91**(3): 175-186.

4. DISCUSSION

5. CONCLUSIONS

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre les laboratoires de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Barcelone (Espagne), de Parasites et Écosystèmes Méditerranéens de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Corse (France) et de Biologie de la Reproduction de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (Sénégal).

Nous exprimons notre profonde gratitude à la « Agencia Española de Cooperación Internacional del Ministerio de Asuntos Exteriores de España » pour nous avoir attribué une bourse de trois ans pour réaliser ce travail.

Cette thèse a été dirigée par le Docteur Jordi MIQUEL COLOMÉ, maître de conférence, inscrit à la « Unitat de Parasitologia (Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries) » de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Barcelone et par le Professeur Bernard MARCHAND, directeur du laboratoire Parasites et Écosystèmes Méditerranéens de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Corse. Nous vous remercions de tout coeur d'avoir accepté, au moment opportun, de diriger notre thèse malgré vos nombreuses charges académiques. Votre soutien moral et scientifique a été très important pour la réalisation de ce travail.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance au Professeur Carlos FELIU JOSÉ, directeur de la « Unitat de Parasitologia (Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries) » de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Barcelone et tuteur du programme de doctorat « Medicaments, Alimentació i Salut », d'avoir autorisé notre long séjour au dit laboratoire. Votre soutien continu et vos conseils ont beaucoup facilité la réalisation de ce travail.

Nous tenons également à remercier le Professeur Cheikh Tidiane BÂ du département de Biologie Animale de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar. Malgré vos multiples charges académiques, votre disponibilité à nous aider à récolter du matériel biologique pendant nos différents séjours au Sénégal, vos encouragements et vos suggestions ne nous ont jamais fait défaut. Nos rencontres, particulièrement en Corse et à Barcelone ont été à chaque fois d'une grande utilité pour la suite de nos travaux.

Nous remercions également le Docteur Roger FONS, Directeur de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique du Département d'Écologie Évolutive du Laboratoire Arago, CNRS UMR 7628, de Banyuls-sur-Mer (France) pour nous avoir aidé à disposer de rats noirs de l'embouchure du Fango (île de

Corse), naturellement parasités par Fasciola hepatica. Il a toujours été pour nous un plaisir de vous rencontrer, aussi bien au Centre d'Écologie Terrestre du Mas de la Serre de Banyuls-sur-Mer que lors des missions (Réserve Naturelle de Py et Mantet des Pyrénées et en Corse). Nous associons à ces remerciements tous les membres de votre équipe, en particulier à votre doctorante Elodie MAGNANOU.

Merci au Docteur Pere BALFAGÓN et monsieur Daouda NDIAYE respectivement des abattoirs de Barcelone (« Servicio de Inspección Sanitaria de Mercados Centrales -Escorxador de Mercabarna») (Espagne) et de Dakar (Sénégal) de votre collaboration pour la récolte d'échantillons de Fasciola hepatica et Fasciola gigantica.

Nos vifs remerciements à toutes les personnes avec qui nous avons effectué des sorties de terrain, en particulier les Docteurs Jordi TORRES, Juan Carlos CASANOVA, Antoni ARRIZABALAGA, Alexis RIBAS, Joëlle GUY DE BELLOCQ, Bettina LEPROUX DE LA RIVIÈRE, entre autres.

Nous remercions aussi très sincèrement tous les collègues des laboratoires de Parasitologie de Barcelone (Espagne), de Parasites et Ecosystèmes Méditerranéens de Corse (France) et de Biologie de la Reproduction de Dakar (Sénégal) pour votre soutien et votre sympathie.

Un grand merci au Docteur María Soledad GÓMEZ, maître de conférence, inscrite à la « Unitat de Parasitologia » de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Barcelone pour sa collaboration et son hospitalité.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance aux Docteurs Francis SANTALLA de nous avoir cédé son ordinateur pendant la rédaction de la mémoire, Olga GONZÁLEZ-MORENO, Sylvia AGOSTINI, Matías SEGOVIA, Soledad CASTILLEJO, Catarina EIRA, Jaume CARRIÓ et à tous les doctorants du laboratoire de Parasitologie de Barcelone pour leur collaboration et leur amitié.

Nous exprimons notre gratitude à tout le personnel de la « Unitat de Microscòpia Electrònica » de l'Université de Barcelone, particulièrement aux Docteurs Núria CORTADELLAS et Robert BARGALLÓ, à Almudena GARCÍA, Ana RIVERO, Juan MENDOZA, Gemma MARTÍNEZ, Palmira et à toute l'équipe de scanning, dirigée par le Docteur Ramon FONTARNAU.

Un grand merci à toutes les personnes, de toutes les nationalités confondues, avec qui nous avons partagé de bons moments durant notre séjour à Barcelone. Nous associons à ces remerciements tous ceux qui, de près ou de loin, nous ont

aidé à avoir une certaine stabilité pour pouvoir s'occuper correctement de notre travail.

Un grand merci également à ma famille, particulièrement à mon père, ma mère et ma femme pour l'amour voué à ma personne.

Notre étude a été subventionnée en partie par les projets 2001-SGR-00088 du "Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya" et BOS2000-0570-CO2-01 et HF2002-0063 du « Ministerio de Ciencia y Tecnología de España ».

CONTRIBUTION OF ULTRASTRUCTURAL STUDIES ON REPRODUCTION TO THE SYSTEMATICS AND PHYLOGENY OF PARASITIC PLATYHELMINTHES (TREMATODA AND CESTODA)

ABSTRACT: The present study contributes to our knowledge of the ultrastructure of spermatogenesis and the spermatozoon of parasitic platyhelminthes. We emphasize those ultrastructural characters that are most useful for the systematics, taxonomy and phylogeny of this group. Because of this, we have studied the ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of seven platyhelminthes. These were: four digeneans (*Scaphiostomum palaearticum*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* and *Notocotylus neyrai*) and three cyclophyllideans (*Joyeuxiella pasqualei*, *Joyeuxiella echinorhynchoides* and *Taenia parva*).

The study of *S. palaearticum* is the first ultrastructural analysis of a representative of the subfamily Ityogoniminae (Brachylaimidae). Our observations of the spermatozoon of *N. neyrai* are the first study of a species of the Notocotylidae family. We compared *Fasciola hepatica* isolated from *Bos taurus* and *Rattus rattus* from the mouth of Fango river (Corsica, Mediterranean sea) with *F. gigantica* isolated from *Bos indicus* in Senegal. Moreover, we studied the external morphology of the spermatozoon in *F. hepatica* by both scanning (SEM) and whole mount transmission electron microscopy (TEM). Finally, the pattern of distribution of tubuline in the microtubular cytoskeleton of *F. hepatica* is also analysed by means of monoclonal anti-tubulins (anti- α -tubulin, anti- β -tubulin, anti- α -acetylated tubulin and anti- α -tyrosinated tubulin). We established the general pattern of spermiogenesis for the genus *Joyeuxiella* and also for the family Dipylidiidae. In the case of *T. parva*, the present results also contribute to the establishment of the ultrastructural features of the spermatozoon of Taeniidae species.

Features of the digeneans such as the ornamentation of the cell membrane, the cytoplasmic expansions and the spine-like bodies are reviewed and discussed. Concerning the cestodes, the formation of the periaxonemal sheath is described for the first time during spermiogenesis in *Joyeuxiella* spp. Moreover, certain aspects of the spermiogenesis patterns, such as striated rootlets or flagellar rotation are discussed.

KEY WORDS: Systematics, Taxonomy, Phylogeny, Platyhelminthes, Trematoda, Digenea, Brachylaimidae, Fasciolidae, Notocotylidae, Cestoda, Cyclophyllidea, Dipylidiidae, Taeniidae, Ultrastructure, Spermiogenesis, Spermatozoon, Immunocytochemistry, Tubulin, *Scaphiostomum palaearticum*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Notocotylus neyrai*, *Joyeuxiella pasqualei*, *Joyeuxiella echinorhynchoides*, *Taenia parva*.

SISTEMÁTICA Y FILOGENIA DE PLATELMINTOS PARÁSITOS (TREMATODA Y CESTODA): APORTACIONES DEL ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LA REPRODUCCIÓN

Palabras clave: Sistemática, Taxonomía, Filogenia, Platelminfos, Trematoda, Digenea, Brachylaimidae, Fasciolidae, Notocotylidae, Cestoda, Cyclophyllidea, Dipylidiidae, Taeniidae, Ultraestructura, Espermiogénesis, Espermatozoide, Inmunocitoquímica, Tubulina, *Scaphiostomum palaearticum*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Notocotylus neyrai*, *Joyeuxiella pasqualei*, *Joyeuxiella echinorhynchoides*, *Taenia parva*.

RESUMEN

Introducción

Los caracteres ultraestructurales del espermatozoide “*a priori*” son independientes del fenómeno del parasitismo y de las influencias de aspectos relativos a la especificidad parásito-hospedador (Justine, 1998a). Además, los espermatozoides muestran un grado de variabilidad tal que ha inducido a su utilización como fuente de caracteres para la interpretación de las relaciones filogenéticas en un gran número de phyla (Jamieson *et al.*, 1995).

En los últimos años la comprensión de la evolución de los Platelminfos se halla en un estado de revolución permanente, básicamente:

- 1) por la utilización de la metodología cladística (Ehlers, 1984, 1985a, 1985b, 1986; Brooks, 1989a, 1989b, 1989c; Brooks & McLennan, 1993),
- 2) por la utilización de nuevos caracteres, principalmente los ultraestructurales (Justine, 1991a, 1991b, 1998a, 2001; Bâ & Marchand, 1995; etc.) y
- 3) por la Sistemática y Filogenia moleculares, que en el caso de los Platelminfos han utilizado básicamente las secuencias del ARN 18S (Baverstock *et al.*, 1991; Rohde *et al.*, 1993, 1994, 1995; Carranza *et al.*, 1997; Littlewood *et al.*, 1998a; Mariaux, 1998; etc.) y 28S (Mollaret *et al.*, 1997; Littlewood *et al.*, 1998b).

Además, cabe considerar que, mientras la cladística y la biología molecular se encuentran aplicadas en la inmensa mayoría de grupos zoológicos, la utilización de caracteres ultraestructurales se ha aplicado únicamente en los Platelminfos. Así, la microscopía electrónica de transmisión ha permitido observar un gran número de caracteres y, fruto de ello, las filogenias cladísticas han incorporado una elevada cantidad de caracteres

estrictamente ultraestructurales que conciernen principalmente a cilios, tegumento y espermatozoide.

Desde un punto de vista filogenético ya se utilizan los caracteres espermatológicos en estudios antiguos como el de Hendelberg (1969) en los “Turbellaria”. Con posterioridad, Ehlers (1984, 1985a, 1985b, 1986), Brooks (1989a, 1989b, 1989c) y Brooks & McLennan (1993) incorporan caracteres ultraestructurales del espermatozoide en la definición de diversos grandes grupos de Platelminos en general en el caso del primer autor y de Platelminos parásitos (o Cercomeridea) en el caso de los otros. Así, Ehlers describió, dentro de los Platelminos, el taxón de los Trepaxonemata en 1984, caracterizado por ostentar sus representantes un espermatozoide con un axonema con el patrón 9 + ‘1’. El nombre Trepaxonemata significa “axonema torsionado” y hace referencia a la estructura del elemento central de este tipo de axonema en visión longitudinal (Ehlers, 1984, 1985a, 1985b, 1986). Este hecho es extremadamente interesante ya que en el resto de grupos el patrón presente es el de la estructura universal 9 + 2. Es importante señalar dos aspectos de gran interés:

- 1) los cilios presentes en los Trepaxonemata, ya sean los de la epidermis, de las vías genitales o de las células excretoras, son del tipo 9 + 2, coexistiendo por ello los dos tipos (9 + ‘1’ y 9 + 2) en el mismo organismo, y
- 2) los estudios inmunocitoquímicos han demostrado en diversos taxones de los Trepaxonemata la ausencia de tubulina en el elemento central de este axonema 9 + ‘1’. En los Temnocephalidea (Justine *et al.*, 1998; Justine, 1999), los Monogenea (Mollaret & Justine, 1997; Justine, 1999), los Digenea (Iomini *et al.*, 1995; Iomini & Justine, 1997; Justine, 1999; González-Moreno, 2002) y los Eucestoda (Miquel & Marchand, 2001) la tubulina no forma parte de este elemento central del axonema 9 + ‘1’, lo que refuerza más todavía el carácter excepcional de este tipo de axonema.

Los Platelminos Trepaxonemata están formados por los Polycladida + Neophora (Lecithoepitheliata + Prolecithophora + Seriata (Proseriata + Tricladida) + Rhabdocoela (Typhloplanoida + Doliopharyngiophora (Dalyellioidea + Cercomeria (Temnocephalidea + Neodermata (Udonellidea + Cercomeridea (Trematoda (Aspidobothrea + Digenea) + Cercomeromorphae (Monogenea (Polyopisthocotylea + Monopysthocotylea) + Cestodaria (Gyrocotylidea + Cestoidea (Amphilinidea + Eucestoda (no Cyclophyllidea + Cyclophyllidea)))))))))) [véase el árbol filogenético propuesto por Justine (1991a, 1997) a partir de las propuestas de Ehlers (1984, 1985a, 1985b, 1986, 1988), Brooks *et al.* (1985), Ax (1987), Brooks (1989a, 1989b)]. En cuanto a los Platelminos no Trepaxonemata, éstos comprenden los Catenulida + Acoelomorpha (Nemertodermatida + Acoela) + Macrostomida (Justine, 1991a, 1997). Por su parte, Brooks (1989a) aborda la filogenia de los grupos mayores de los Platelminos parásitos mediante la utilización de 120 caracteres, de los que 88 son anatómicos y 32 ultraestructurales, entre ellos, por ejemplo, la ausencia de mitocondria en el espermatozoide de los Eucestoda.

Estos caracteres espermatológicos ultraestructurales utilizados por Ehlers y Brooks en sus análisis cladísticos son estudiados de forma crítica en el escrito de Justine (1991a). Dicho autor analiza las diversas sinapomorfías establecidas para los Platelminetos en base a caracteres ultraestructurales de la espermiogénesis y del espermatozoide, refutando algunas, confirmando otras y proponiendo nuevas. Las nuevas sinapomorfías propuestas, así como las confirmadas son:

- 1) en los Cercomeridea los centriolos están ubicados en la base de las espermátidas en elongación y los flagelos se incorporan a un elemento central por un proceso de fusión denominado “fusión próximo-distal” (“*proximodistal fusion*”),
- 2) presencia en los monogénidos Polyopisthocotylea de microtúbulos laterales en la región principal del espermatozoide,
- 3) ausencia de microtúbulos dorsales y ventrales en la región principal del espermatozoide en los monogénidos Monopisthocotylea,
- 4) ausencia de gránulos opacos a los electrones en los Neodermata,
- 5) presencia de una capa de microtúbulos longitudinales espiralados en los Temnocephalidea,
- 6) ausencia de mitocondria en los Eucestoda,
- 7) presencia de microtúbulos corticales torsionados en los Cyclophyllidea.

Los caracteres 1, 2, 3 y 7 constituyen las nuevas sinapomorfías establecidas por Justine (1991a), mientras que los otros son confirmaciones de caracteres utilizados ya anteriormente por Ehlers (1984, 1985a, 1985b, 1986), Justine *et al.* (1987), Brooks (1989a) y Xylander (1989).

En el caso de los digénidos y particularmente de los cestodos, durante los años 80 y más recientemente en la década de los 90, la proliferación de los estudios ultraestructurales del espermatozoide, ha permitido constatar el interés de estos caracteres espermatológicos (espermatozoide y espermiogénesis) desde un punto de vista taxonómico y filogenético. Buen reflejo de ello son los escritos de Euzet *et al.* (1981), Justine & Mattei (1985), Justine *et al.* (1985, 1993), Swiderski (1986a, 1986b, 1986c), Justine (1991a, 1991c, 1991d, 1995, 1997, 1998a, 1998b, 1999, 2001), Bâ & Marchand (1994a, 1995), Watson & Rohde (1995), Hoberg *et al.* (1997), Miquel *et al.* (1999), Raikova *et al.* (2001) o Xylander (2001), entre otros.

En este sentido, Euzet *et al.* (1981) analizan las relaciones filogenéticas en los cestodos considerando dos tipos de espermatozoides, el “tipo con un axonema” y el “tipo con dos axonemas”, admitiendo el carácter apomorfo para el primer tipo y el carácter plesiomorfo para el segundo. Además, plantean dos posibles líneas evolutivas para los cestodos Diphyllidea, Tetraphyllidea, Proteocephalidea y Cyclophyllidea en función de estos caracteres espermatológicos:

- 1) la existencia de dos líneas evolutivas, una rama con los órdenes que presentan espermatozoide con dos axonemas y otra para los órdenes con gameto con un único axonema, y
- 2) la existencia de una única rama con los órdenes con espermatozoide con dos axonemas de la que derivan en distintos periodos los órdenes con gameto con un único axonema.

Años después, Swiderski (1986a), en base a los datos existentes hasta la fecha, establece tres tipos fundamentales de espermiogénesis en los cestodos en función de dos condiciones:

- 1) del número de flagelos originados en la zona de diferenciación y
- 2) de si hay o no fusión entre flagelo/s y expansión citoplasmática.

Se trata de los tipos Pseudophyllidea, Caryophyllidea y Cyclophyllidea. El “tipo Pseudophyllidea” se caracteriza por la formación de una zona de diferenciación con dos centriolos con raíces estriadas (“*striated roots*”, “*striated rootlets*”) asociadas y un cuerpo intercentriolar (“*intercentriolar body*”) entre ellos. Se forman dos flagelos que fusionan con una expansión citoplasmática mediana (“*median cytoplasmic process*”) a lo largo de la cual migra el núcleo. Se trata de un tipo primitivo hallado también en Platelminfos de vida libre y observado en los órdenes Pseudophyllidea, Proteocephalidea, Tetrarhynchidea y Tetraphyllidea-Onchobothriidae. El “tipo Caryophyllidea” se caracteriza por producirse una desaparición temprana de uno de los axonemas y elongación del otro que, posteriormente, fusiona con la expansión citoplasmática. Según dicho autor, la migración nuclear induce la fusión del axonema que es bastante “superficial” y no llega nunca a incorporarse al cuerpo de la espermátida, como se aprecia en los Pseudophyllidea. Este tipo es considerado como único y exclusivo del orden Caryophyllidea. Finalmente, en el “tipo Cyclophyllidea” existe un único axonema que se desarrolla a lo largo de la expansión citoplasmática, en la que también se produce la migración del núcleo. De este modo, en este tipo no se produce fusión del axonema con la expansión. Asimismo, el autor considera el hecho de la presencia de un único axonema como una reducción secundaria del número primitivo de dos axonemas observado en órdenes de cestodos más primitivos. Este tipo, según Swiderski (1986a), se presenta en el orden Cyclophyllidea y, probablemente, en el Tetraphyllidea-Phyllobothriidae y el Diphyllidea.

Posteriormente, gracias a una base más amplia de conocimientos, principalmente en lo que a Cyclophyllidea se refiere, Bâ & Marchand (1995) amplían en uno los tipos de espermiogénesis posibles en los Eucestoda (tipos I a IV). Estos cuatro patrones son establecidos en base a tres condiciones:

- 1) el número de flagelos originados a partir de la zona de diferenciación,
- 2) la presencia o no de fusión próximo-distal y
- 3) la presencia o no de rotación flagelar (“*flagellar rotation*”).

Así, según los autores, la espermiogénesis de “tipo I” se da en los Tetracysthida-Onchobothriidae, Proteocephalida, Tetrarhynchida y Pseudophyllida. La espermiogénesis de “tipo II” se produce en los Tetracysthida-Phyllobothriidae y Caryophyllida. Finalmente, el “tipo III” y el “tipo IV” se dan en los Cyclophyllida. Además, Bâ & Marchand (1995) tras el estudio comparado de la espermiogénesis y/o espermatozoide de 43 especies consideran que:

- 1) la rotación flagelar y la fusión próximo-distal son caracteres plesiomorfos de los Eucestoda,
- 2) la ausencia de rotación flagelar es una sinapomorfía para los Cyclophyllida,
- 3) la presencia de “cuerpos en cresta” (“*crest-like bodies*” o “*crested bodies*”) en la parte anterior del espermatozoide es una sinapomorfía del espermatozoide en los Eucestoda, y
- 4) la ausencia de mitocondria es también una sinapomorfía para los Eucestoda.

Finalmente, tan solo merece la pena ser apuntado que, recientemente, Swiderski & Mackiewicz (2002), a propósito del análisis de la espermatogénesis y del espermatozoide de *Glavidacris catostomi*, siguen manifestando la divergencia existente entre los tres tipos (Swiderski, 1986a) y los cuatro tipos (Bâ & Marchand, 1995) de espermiogénesis, cuestionando la existencia de dos tipos distintos para los Cyclophyllida.

Sin duda alguna, uno de los escritos más interesantes con respecto a los caracteres ultraestructurales del espermatozoide en los cestodos es la extensa revisión de Justine (1998a). El autor aborda el interés filogenético de los caracteres ultraestructurales de la espermiogénesis y del espermatozoide en los Eucestoda, analizando todos los estudios al respecto, incidiendo en las particularidades de cada orden y valorando los distintos caracteres espermatológicos, así como la dirección a seguir en el futuro en la investigación en este campo de la Ciencia. Considerando caracteres como la mitocondria, los cuerpos en cresta, el cuerpo intercentriolar, las raíces estriadas, los microtúbulos corticales, la vaina periaxonemal (“*periaxonemal sheath*”), la rotación flagelar, el número de axonemas en la zona de diferenciación y en el espermatozoide, y los tipos de microtúbulos corticales establece 10 posibles sinapomorfías. La influencia del trabajo de Justine (1998a) se pone de manifiesto en el escrito de Hoberg *et al.* (1997) en el que los autores realizan un análisis de las relaciones filogenéticas en los Eucestoda mediante la combinación de caracteres morfológicos clásicos y caracteres ultraestructurales del espermatozoide; de los 49 caracteres utilizados incluyen nueve caracteres espermatológicos ultraestructurales. Dichos caracteres son:

- 1) espermatozoide con o sin mitocondria,
- 2) espermatozoide con o sin cuerpo en cresta,
- 3) espermatozoide con microtúbulos corticales paralelos o torsionados,
- 4) tipo de espermiogénesis,
- 5) espermatozoide con o sin vaina periaxonemal,
- 6) número de axonemas en el espermatozoide,

- 7) presencia o ausencia de raíces estriadas,
- 8) presencia o ausencia de cuerpo intercentriolar, y
- 9) tipo de organización de los microtúbulos corticales.

Objetivos del estudio

Los objetivos planteados en el presente estudio han sido los siguientes:

- incrementar el nivel de conocimiento de la gametogénesis de distintos Platelminfos (trematodos y cestodos) mediante la descripción de la ultraestructura de la espermiogénesis y del espermatozoide.
- establecer el patrón general de la espermiogénesis y la ultraestructura del espermatozoide en las familias Fasciolidae, Dipylidiidae y Taeniidae.
- analizar el interés taxonómico y filogenético de diversos caracteres ultraestructurales del gameto masculino en los Platelminfos, en particular para los grupos objeto de estudio.
- determinar y localizar la tubulina en el citoesqueleto del espermatozoide de *Fasciola hepatica*.

Material y métodos

En la actualidad existe un gran número de especies de Platelminfos estudiadas desde la faceta de la ultraestructura del espermatozoide. En el caso de los digénidos y los cestodos el número de especies estudiadas supera las 140, en concreto unas 65 especies de digénidos pertenecientes a 49 géneros y unas 82 especies de cestodos pertenecientes a 57 géneros. Sin embargo, es preciso apuntar que muchos de estos estudios son incompletos o deficientes.

Para cumplir con los objetivos planteados se ha planificado el estudio ultraestructural de la espermiogénesis y del espermatozoide de diversas especies de digénidos y de cestodos Cyclophyllidea de distintas familias. Así, las especies estudiadas en la presente Memoria son cuatro digénidos [*Scaphiostomum palaearticum* Mas-Coma, Esteban et Valero, 1986 (Brachylaimidae), *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 y *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856 (Fasciolidae), y *Notocotylus neyrai* González Castro, 1945 (Notocotylidae)] y tres cestodos Cyclophyllidea [*Joyeuxiella pasqualei* (Diamare, 1893) y *Joyeuxiella echinorhynchoides* (Sonsino, 1899) (Dipylidiidae), y *Taenia parva* Baer, 1926 (Taeniidae)].

Los helmintos aislados tras disección de los hospedadores han sido procesados según la metodología pertinente para los estudios ultraestructurales a que van encaminados. Así, en el caso del material destinado a la microscopía electrónica de transmisión (MET) se ha utilizado como fijador el glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato sódico 0,1 M a pH 7,2 (fijación

de 2 h a 4°C). Tras diversos lavados con tampón se realiza una segunda fijación con tetróxido de osmio al 1% en el mismo tampón (1 h a 4°C). Tras los lavados posteriores se procede a la deshidratación del material mediante pasos sucesivos por soluciones de etanol de lipofilia creciente (50°, 70°, 80°, 90°, 96° y absoluto) y finalmente óxido de propileno. A continuación, se procede a la infiltración de la muestra en resina, utilizando en nuestro estudio la resina Spurr. Para ello, se somete la muestra a concentraciones crecientes de mezclas “Spurr: óxido de propileno” (1:3, 1:1, 3:1) y finalmente resina pura. Tras la polimerización de los bloques dentro de moldes de silicona (48 h a 60°C) se confeccionan los cortes semifinos para la localización de las zonas de interés para el estudio. Finalmente, se realizan los cortes ultrafinos que se depositan sobre rejillas de cobre de 200 mesh y se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo según el método de Reynolds (1963).

En el caso de *Fasciola gigantica* se ha aplicado la técnica citoquímica de Thiéry (Thiéry, 1967) para evidenciar la presencia de glucógeno. En este caso los cortes ultrafinos se depositan sobre rejillas de oro que se someten al siguiente tratamiento: 30 min en ácido peryódico al 10%, lavado con agua destilada, 24 h en tiocarbohidrazida, lavados en soluciones de acético y agua destilada, 30 min en proteinato de plata en oscuridad y, finalmente, lavado con agua destilada.

En el estudio de *Fasciola hepatica*, dada la procedencia del material de la rata negra (*Rattus rattus*), se ha podido diseccionar el hospedador en el laboratorio y aplicar más fácilmente otras técnicas. Este es el caso de las técnicas inmunocitoquímicas para evidenciar la tubulina en el citoesqueleto del espermatozoide y las de “*whole mount*” y de microscopía electrónica de barrido (MEB) destinadas a la observación de espermatozoides enteros.

En cuanto a las técnicas de inmunomarcaje, se ha ensayado la detección y caracterización de la tubulina en el citoesqueleto del espermatozoide mediante anticuerpos monoclonales anti- α -tubulina, anti- β -tubulina, anti-tubulina acetilada y anti-tubulina tirosinada. Para ello, el material vivo ha sido fijado mediante una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,25% en tampón cacodilato sódico 0,1 M a pH 7,2 (4-5 h a 4°C). Posteriormente, se ha procedido a una deshidratación a -35°C e infiltrado en resina Lowicryl K4M que se polimeriza a -35°C bajo luz ultravioleta. Inicialmente, en los cortes ultrafinos, depositados en rejillas de oro, se bloquean los antígenos inespecíficos con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% y glicina 20 nM en tampón fosfato (PBS) 0,1 M a pH 7,4 (30 min). A continuación, se aplican las diversas anti-tubulinas a distintas diluciones en BSA al 1% en PBS 0,1 M a pH 7,4 (2 h). Tras diversos lavados con BSA al 1% en el mismo tampón, se aplica un anticuerpo conjugado marcado con oro en BSA al 1% en el mismo tampón. En los controles se realiza el mismo proceso omitiendo el primer anticuerpo. Tras los lavados finales y secado en papel “*Whatman*” se efectúa un doble contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo.

La técnica de “*whole mount*” se ha aplicado para la observación de espermatozoides enteros al MET. Tras disección de los testículos y los canales eferentes y deferente en solución fisiológica, se fija un volumen de la suspensión con glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 (4°C toda una noche). A continuación, se efectúan lavados con el tampón. Posteriormente, se realiza la post-fijación con tetróxido de osmio al 1% en el mismo tampón (2 h a 4°C). Tras nuevos lavados con agua bidestilada, una gota de la solución que contiene los espermatozoides se deposita sobre una rejilla de cobre de 400 mesh con membrana de formvar para su observación al MET. Cabe puntualizar que tras cada fijación y lavado se centrifuga la solución a 2000 rpm (5 min) a fin de no perder material.

Para el estudio al MEB es necesaria la fijación o adherencia de los espermatozoides sobre un portaobjetos. Para ello se ha utilizado la poli-L-lisina que se deposita sobre la gota de solución con los espermatozoides. Tras secado se somete a deshidratación en soluciones alcohólicas de lipofilia creciente (etanol de 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 96° y absoluto). El material se acaba de desecar sometiéndolo al punto crítico. Tras depositar el portaobjetos sobre el “*stub*” se procede al recubrimiento con oro mediante un “*sputtering*” y, posteriormente, a la observación al MEB.

Resultados

Los resultados obtenidos en relación con estas especies forman parte de las publicaciones expuestas en la Memoria y de las que a continuación, para cada una de ellas, se plasma un resumen con los aspectos más interesantes:

1. Estudio ultraestructural de la espermiogénesis y del espermatozoide de *Scaphiostomum palaearticum* Mas-Coma, Esteban et Valero, 1986 (Trematoda, Digenea, Brachylaimidae).

Ndiaye, P. I., Miquel, J., Bâ, C. T., Feliu, C. & Marchand, B. (2002). Spermogenesis and sperm ultrastructure of *Scaphiostomum palaearticum* Mas-Coma, Esteban et Valero, 1986 (Trematoda, Digenea, Brachylaimidae). *Acta Parasitologica*, 47(4): 259-271.

Resumen: El estudio representa el cuarto trabajo espermatólogico ultraestructural efectuado en la familia Brachylaimidae y primero en la subfamilia Ityogoniminae. Los estudios ultraestructurales precedentes hacen referencia a los géneros *Postharmostomum* y *Brachylaima* (Zdarska *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1993; Chen & Lu, 1994; González-Moreno, 2002). *Scaphiostomum palaearticum* fue descrito por Mas-Coma *et al.* (1986) a partir de

material extraído de roedores (*Mus spretus* y *Apodemus sylvaticus*) capturados en las islas Baleares. Englobada en su momento en la subfamilia Brachylaiminae (Mas-Coma *et al.*, 1986), recientemente se ha incluido en la Ityogoniminae (véase Gibson *et al.*, 2001).

La espermiogénesis en *S. palaearticum* se inicia con la formación de una zona de diferenciación caracterizada por la presencia de dos centriolos con raices estriadas asociadas a cada uno de ellos y por la existencia de un cuerpo intercentriolar entre ambos centriolos. Dicha zona de diferenciación está delimitada por microtúbulos corticales y en su base presenta un anillo de membranas arqueadas. Cada centriolo desarrolla un flagelo que crece externa y perpendicularmente a una expansión citoplasmática mediana que emerge de la zona de diferenciación. Los microtúbulos corticales o periféricos inician su migración a lo largo de dicha expansión. Con posterioridad, se produce una rotación de dichos flagelos hasta situarse paralelos a la expansión mediana y una subsiguiente fusión de las tres estructuras. La rotación flagelar y la fusión próximo-distal son procesos asincrónicos, de modo que un flagelo sufre rotación y fusión antes que el otro. Antes de que se produzca la fusión próximo-distal ya se aprecian los denominados puntos de fusión (“*attachment zones*” o “*attachment points*”) en la zona de la expansión citoplasmática mediana que fusionará con los flagelos libres. La fusión próximo-distal de los flagelos y la expansión mediana determina la aparición de dos haces de microtúbulos corticales paralelos. El núcleo inicia su migración a lo largo de la expansión mediana antes de que se produzca la fusión próximo-distal pero, después de la rotación flagelar. Por su parte, la mitocondria inicia su migración hacia el cuerpo de la espermátida después de la fusión próximo-distal del primer flagelo. En los estadios finales de la espermiogénesis las raices estriadas se desplazan progresivamente hacia la base de la espermátida y finalmente el anillo de membranas arqueadas (“*arched membranes*” o “*arching membranes*”) se constriñe y el espermatozoide recién formado se desprende del citoplasma residual.

El espermatozoide de *S. palaearticum* es una célula filiforme y afilada en las dos extremidades, que, como en todos los digénidos, se caracteriza por la presencia de dos axonemas del tipo 9 + '1' característico de los Plelmintos Trepaxonemata, mitocondria, núcleo y dos haces de microtúbulos corticales paralelos. El estudio detallado de numerosas secciones del espermatozoide nos ha permitido distinguir seis regiones distintas en función de los caracteres ultraestructurales presentes en cada una de ellas. La región I constituye la extremidad anterior del espermatozoide y se caracteriza por presentar dos axonemas del tipo 9 + '1', ornamentación externa de la membrana, una expansión citoplasmática lateral y una capa submembrana de microtúbulos corticales paralelos que rodean prácticamente toda la célula. No obstante, en las zonas más anteriores de esta región, el espermatozoide carece de microtúbulos corticales, de expansión citoplasmática lateral y de ornamentación externa de la membrana plasmática, además de presentar un único axonema. La región II del espermatozoide viene marcada por la presencia de dos axonemas, microtúbulos corticales

paralelos separados en dos haces y un acúmulo de gránulos de glucógeno en el citoplasma. La región III es la región mitocondrial y se caracteriza por presentar los caracteres de la región II más la mitocondria. En la región IV aparece el núcleo y, por tanto, es la zona del espermatozoide con presencia simultánea de núcleo y mitocondria. La región V carece de mitocondria y presenta núcleo, dos axonemas, dos haces de microtúbulos corticales y gránulos de glucógeno. Es importante señalar que en esta región se aprecia una paulatina reducción en el número de microtúbulos corticales y en su parte distal se produce la desorganización de uno de los axonemas. Finalmente, la región VI del gameto masculino se caracteriza por ostentar un único axonema, algunos microtúbulos corticales, gránulos de glucógeno y algunos dobletes y singuletes del axonema desorganizado. Así, tanto microtúbulos corticales como singuletes del axonema alcanzan la extremidad posterior del espermatozoide.

2. Estudio ultraestructural de la espermiogénesis y del espermatozoide de *Notocotylus neyrai* González Castro, 1945 (Digenea, Notocotylidae), parásito intestinal de *Microtus agrestis* (Rodentia, Arvicolidae) en España.

Ndiaye, P. I., Miquel, J., Feliu, C. & Marchand, B. (2003). 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**(2): 105-115.

Resumen: Se trata del primer estudio ultraestructural del espermatozoide y de su proceso de formación en un representante de la familia Notocotylidae: *Notocotylus neyrai*. Dicho digénido constituye una de las tres especies del género parásitas de roedores en Europa (Simón-Vicente *et al.*, 1985a).

La espermiogénesis en *N. neyrai* se inicia con la formación de una zona más o menos cónica, la zona de diferenciación. Dicha zona está rodeada por microtúbulos corticales y contiene dos centriolos separados por un cuerpo intercentriolar y asociados cada uno a una raíz estriada. Cada centriolo desarrolla un flagelo que crece externa y perpendicularmente a una expansión citoplasmática mediana. Con posterioridad, se produce una rotación flagelar y una fusión próximo-distal que son asincrónicas. Tras la rotación flagelar, aunque previamente a la fusión próximo-distal, se inicia la migración nuclear y tras la completa fusión de los dos flagelos con la expansión citoplasmática migran las mitocondrias. Finalmente, se produce la constricción del anillo de membranas arqueadas y se libera el espermatozoide recién formado.

El espermatozoide de *N. neyrai* presenta las características básicas observadas en todos los digénidos, con la particularidad de presentar dos mitocondrias. El estudio detallado de

numerosas secciones ha permitido establecer seis regiones distintas en función de las diversas características ultraestructurales. La región I constituye la extremidad anterior del espermatozoide. Es bastante afilada, carece de microtúbulos corticales y presenta un único axonema. En zonas más posteriores se observa la aparición de los microtúbulos corticales paralelos, de la ornamentación externa de la membrana y del segundo axonema de un modo simultáneo. Los microtúbulos corticales forman una capa submembranar continua tan solo interrumpida en la zona donde se observan dos puntos de fusión. Por su parte, la ornamentación externa de la membrana rodea todo el gameto a excepción de una parte de la zona ventral. Finalmente, señalamos una cierta área de esta región I está ocupada por una mitocondria y presenta, externamente y de un modo intercalado con la ornamentación, los denominados “cuerpos espinosos” (“*spine-like bodies*”). Estos cuerpos espinosos sólo han sido observados con anterioridad en *Opecoeloides furcatus* (Opecoelidae) (Miquel *et al.*, 2000a). Esta zona con ornamentación externa de la membrana presenta en cortes transversales una característica forma de quilla. En la región II se aprecia sólo dos axonemas del tipo 9 + ‘1’ y dos campos de microtúbulos corticales. En áreas más distales de esta zona aparecen acúmulos de glucógeno. La región III, además de las características citadas para la región II, se caracteriza por contener una segunda mitocondria, aparentemente mucho más desarrollada que la anterior. En la región IV se observa la presencia simultánea de núcleo y mitocondria. La región V se caracteriza por presentar núcleo y mitocondria pero tan solo un axonema. Finalmente, la región VI carece de mitocondria, conteniendo el núcleo y el segundo axonema, que se desorganiza a nivel de la extremidad posterior del núcleo. A su vez, el número de microtúbulos corticales se va reduciendo hasta que desaparecen, llegando al extremo posterior del espermatozoide dobles y singletes del axonema.

3. Estudio ultraestructural de la espermiogénesis y del espermatozoide de *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856 (Trematoda, Digenea, Fasciolidae), parásito del ganado bovino en Senegal.

Ndiaye, P. I., Miquel, J., Bâ, C. T. & Marchand, B. (2003). Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of the liver fluke *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856 (Digenea, Fasciolidae), a parasite of cattle in Senegal. *Journal of Parasitology*, in press.

Resumen: En este estudio se describe la ultraestructura de la espermiogénesis y del espermatozoide de una de las dos especies del género *Fasciola*: *F. gigantica*. Se trata de una especie de gran interés tanto económico como sanitario, tal como se refleja en el escrito de Spithill *et al.* (1999).

La espermiogénesis en *F. gigantica* se inicia con la formación de la típica zona de diferenciación descrita para numerosos digénidos. Dicha zona contiene dos centriolos con

raíces estriadas asociadas y separados por un cuerpo intercentriolar. Cada centriolo desarrolla un flagelo perpendicularmente a una expansión citoplasmática mediana. Tras sufrir una rotación flagelar los tres procesos (los dos flagelos y la expansión mediana) fusionan en un proceso de fusión próximo-distal. Se trata de dos procesos asincrónicos. La fusión del segundo flagelo va acompañada de la formación de la denominada “expansión citoplasmática dorso-lateral” (“*dorsolateral cytoplasmic expansion*”) presente en el espermatozoide maduro. Antes de la fusión del segundo flagelo, pero tras la rotación flagelar, se produce la elongación del núcleo a lo largo de la espermátida. Con posterioridad, se inicia la migración mitocondrial.

El espermatozoide de *F. gigantica* presenta los caracteres típicos de los digénidos. La observación de los distintos caracteres ultraestructurales presentes en el espermatozoide ha permitido distinguir cinco regiones distintas. La región I constituye la extremidad anterior del espermatozoide que se inicia con un extremo uniflagelar. Con posterioridad, se aprecian dos axonemas y una capa submembrana continua de microtúbulos corticales. Otra estructura característica de la región I es una expansión citoplasmática dorso-lateral en forma de gancho y una ornamentación externa de la membrana plasmática. Esta ornamentación rodea toda la célula a excepción de la parte ventral de la expansión dorso-lateral, zona en donde los microtúbulos corticales están más próximos unos de otros. La región II contiene además la mitocondria y cuerpos espinosos espaciados aproximadamente 1 μm . La ornamentación externa de la membrana va desapareciendo y la expansión se reduce y se va desplazando hacia zonas dorsales hasta también desaparecer. Asimismo, los microtúbulos corticales se disponen en dos haces y aparece material granular de glucógeno. En la región III aparece el núcleo y los microtúbulos corticales ventrales se desplazan a zonas laterales. La región IV carece de mitocondria y en ella se desorganiza uno de los dos axonemas. La región V y última presenta un axonema y el núcleo. El elemento central del axonema desaparece, los dobletes pierden sus brazos y se desorganizan, se transforman en singuletes y desaparecen. La extremidad posterior del espermatozoide contiene sólo el núcleo.

La ultraestructura del espermatozoide de *F. gigantica* es muy similar a la observada en *Echinostoma caproni* (Iomini & Justine, 1997), especie del mismo orden que presenta la ornamentación externa de la membrana, la expansión citoplasmática y la disposición nuclear, mitocondrial y axonemal semejantes.

4. Estudio ultraestructural de la espermiogénesis y del espermatozoide de *Fasciola hepatica* L., 1758 (Trematoda, Digenea, Fasciolidae): microscopía electrónica de barrido y de transmisión y estudio inmunocitoquímico de la tubulina.

Ndiaye, P. I., Miquel, J., Fons, R. & Marchand, B. (2003). Spermogenesis and sperm ultrastructure of the liver fluke *Fasciola hepatica* L., 1758 (Digenea, Fasciolidae):

scanning and transmission electron microscopy, and tubulin immunocytochemistry. *Acta Parasitologica*, **48**(3), in press.

Resumen: En este estudio se analiza la ultraestructura de la espermiogénesis y del espermatozoide de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Fasciolidae) mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET). Asimismo se realiza un estudio inmunocitoquímico para determinar la presencia de tubulina en el esqueleto microtubular del espermatozoide. El material objeto de estudio ha procedido de vacas de diversas localidades de la Cerdaña (Cataluña, España) y de ratas negras capturadas en la desembocadura del río Fango (Galéria, isla de Córcega, Francia).

La espermiogénesis en *F. hepatica* es un proceso similar al descrito para *F. gigantica* y para los digénidos en general. No obstante, existe un aspecto característico y diferencial que es la presencia de una rotación flagelar superior a 90°, en concreto de unos 120°, al menos en uno de los dos flagelos.

En cuanto al espermatozoide, en *F. hepatica* presenta una ultraestructura similar a la observada en *F. gigantica*, con la presencia como aspectos de mayor interés de una expansión citoplasmática dorsolateral en forma de gancho, cuerpos espinosos y ornamentación externa de la membrana celular. Tal y como se ha comentado en *F. gigantica*, la ultraestructura del espermatozoide en *F. hepatica* es también muy similar a la observada en *E. caproni* (Iomini & Justine, 1997). Sin embargo, la disposición de la mitocondria en la zona con la expansión citoplasmática es un aspecto diferencial entre el espermatozoide de *Fasciola* spp. y el de *E. caproni*. Las especies del género *Fasciola* la poseen dorsalmente entre los dos axonemas, mientras que en *E. caproni* se sitúa en la propia expansión lateral.

El estudio mediante MEB y mediante la técnica de “whole mount” al MET denota el patrón helicoidal de los axonemas alrededor del cuerpo del espermatozoide, aspecto difícilmente observable en el estudio de cortes ultrafinos al MET.

En cuanto al estudio inmunocitoquímico mediante el uso de anticuerpos monoclonales, se ha detectado la presencia de α -tubulina, β -tubulina, α -tubulina acetilada y α -tubulina tirosinada, tanto en los microtúbulos del axonema, como en los corticales. Por otra parte, ninguna de las anti-tubulinas ensayadas ha marcado el elemento central del espermatozoide 9 + '1' típico de los Trepaxonemata. Resultados similares se muestran en otros estudios en *Troglocaridicola* sp., especies del género *Echinostoma*, *Brachylaima mascomai* y *Mesocestoides litteratus* (Iomini *et al.*, 1995; Iomini & Justine, 1997; Mollaret & Justine, 1997; Justine *et al.*, 1998; Justine, 1999; Miquel & Marchand, 2001; González-Moreno, 2002), aunque en el presente estudio se incrementan los datos con el estudio de la tubulina tirosinada.

5. Estudio ultraestructural de la espermiogénesis y del espermatozoide de *Taenia parva* Baer, 1926 (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae), parásito de la jineta (*Genetta genetta*).

Ndiaye, P. I., Miquel, J. & Marchand, B. (2003). Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoa of *Taenia parva* Baer, 1926 (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae), a parasite of the common genet (*Genetta genetta*). *Parasitology Research*, **89**(1): 34-43.

Resumen: Hasta la fecha, los estudios ultraestructurales del espermatozoide de representantes del género *Taenia* hacen referencia sólo a 5 de las numerosas especies de este género (*T. hydatigena*, *T. mustelae*, *T. solium*, *T. saginata* y *T. pisiformis*) (Featherston, 1971; Tian *et al.*, 1998a; Miquel *et al.*, 2000b).

La espermiogénesis en *Taenia parva* se corresponde con el patrón III según los tipos postulados por Bâ & Marchand (1995) para los Eucestoda, aunque presenta alguna modificación como es la existencia de una rotación flagelar. Este proceso de espermiogénesis se inicia con la formación de una zona de diferenciación delimitada en su zona basal por un anillo de membranas arqueadas y rodeada por microtúbulos corticales. Esta zona de diferenciación contiene dos centriolos. Uno de ellos desarrolla un flagelo que crece externamente a una expansión citoplasmática con un ángulo de unos 45°. El otro centriolo queda orientado en un pequeño “botón citoplasmático” (“*cytoplasmic bud*”) y posteriormente aborta. En este estadio, el núcleo ya ha sobrepasado el anillo de membranas arqueadas, penetrando en la zona de diferenciación. El flagelo sufre una rotación y se sitúa paralelo a la expansión citoplasmática con la que fusiona. Tras esta fusión próximo-distal, los microtúbulos corticales, que en la expansión citoplasmática antes de la fusión con el flagelo son paralelos al hipotético eje longitudinal de la espermátida, sufren una torsión. En esta fase de la espermiogénesis el núcleo migra a lo largo del cuerpo de la espermátida. Se producen unas densificaciones citoplasmáticas en la periferia de la espermátida que probablemente son el origen de los “tabiques intracitoplasmáticos transversos” (“*transverse intracytoplasmic walls*”) presentes en el espermatozoide. En estos estadios finales se produce una densificación que origina el cuerpo en cresta helicoidal. Finalmente, se produce la constricción del anillo de membranas arqueadas y la liberación del espermatozoide recién formado.

El espermatozoide de *T. parva* se caracteriza por ser una célula filiforme y afilada en sus dos extremidades, y por carecer de mitocondria. Ultraestructuralmente se pueden distinguir cuatro regiones distintas. La región I constituye el extremo anterior del gameto. Esta extremidad está formada por un cono apical, opaco a los electrones, de longitud superior a 1900 nm. En este cono apical se inicia el cuerpo en cresta de disposición helicoidal que bordea externamente el espermatozoide en esta región I. El espesor de este cuerpo en cresta es de unos 60 nm. Los

microtúbulos corticales forman una capa submembrana y están espiralados con el mismo ángulo que el cuerpo en cresta, unos 45°. Tras el cono apical se inicia el axonema del tipo 9 + '1'. La región II carece de cuerpo en cresta y en ella aparece una vaina periaxonemal adosada al axonema. El espacio citoplasmático entre la vaina y la capa continua y submembrana de microtúbulos corticales está ocupado por unas estructuras engrosadas y opacas a los electrones que son los denominados tabiques intracitoplasmáticos transversos. La región III constituye la región nuclear del espermatozoide. El núcleo forma un cordón espiralado alrededor del axonema, situándose entre éste y la vaina periaxonemal. En cortes transversales se observa desde una forma de herradura hasta una forma anular, llegando a rodear totalmente el axonema. En alguna zona llega incluso a rodear el axonema más de una vez. La zona citoplasmática ocupada por el núcleo carece de vaina periaxonemal y de tabiques intracitoplasmáticos. Finalmente, la región IV constituye la extremidad posterior del gameto. En ella desaparecen de un modo progresivo, primero la vaina periaxonemal y los tabiques intracitoplasmáticos y, posteriormente, los microtúbulos corticales. En áreas más terminales se desorganiza el axonema, llegando algunos singuletes a la extremidad posterior. El extremo posterior del espermatozoide es aguzado y presenta un citoplasma ligeramente opaco a los electrones.

Los resultados comparados con los existentes en otros representantes Taeniidae estudiados hasta la fecha parecen indicar que el patrón espermiogénico de tipo III, la longitud del cono apical, la presencia de un solo cuerpo en cresta, de vaina periaxonemal y de tabiques intracitoplasmáticos transversos pueden ser caracteres ultraestructurales típicos de esta familia de Cyclophyllidea.

6. Estudio ultraestructural de la espermiogénesis y del espermatozoide en el género *Joyeuxiella* Fuhrmann, 1935 (Cestoda, Cyclophyllidea, Dipylidiidae): análisis comparado de *J. echinorhynchoides* (Sonsino, 1889) y *J. pasqualei* (Diamare, 1893)

Ndiaye, P. I., Agostini, S., Miquel, J. & Marchand, B. (2003). Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon in the genus *Joyeuxiella* Fuhrmann, 1935 (Cestoda, Cyclophyllidea, Dipylidiidae): Comparative analysis of *J. echinorhynchoides* (Sonsino, 1889) and *J. pasqualei* (Diamare, 1893). *Parasitology Research*, in press.

Resumen: En este trabajo se analiza de un modo comparado la ultraestructura del espermatozoide y la espermiogénesis de dos cestodos Dipylidiidae del género *Joyeuxiella*: *J. pasqualei* y *J. echinorhynchoides*. La familia Dipylidiidae engloba sólo tres géneros, todos ellos propios de carnívoros: *Dipylidium*, *Diplopylidium* y *Joyeuxiella* (Jones, 1994a). Por su parte, el género *Joyeuxiella* comprende sólo tres especies (*J. pasqualei*, *J. echinorhynchoides* y *J. fuhrmanni* -Jones, 1983) de las que en la presente Memoria se estudian dos. Hasta la

fecha, en esta familia existían estudios ultraestructurales del gameto masculino sólo en una especie: *Dipylidium caninum* (Miquel & Marchand, 1997; Miquel *et al.*, 1998a) De todo ello, puede desprenderse el enorme interés de este análisis, ya que permite configurar los caracteres ultraestructurales de la espermiogénesis y del espermatozoide en esta familia.

La espermiogénesis en las dos especies se ha mostrado idéntica y concordante con un patrón III según los postulados por Bâ & Marchand (1995) para los Eucestoda, con la modificación de presentar raíces estriadas. Así, en el género *Joyeuxiella* la espermiogénesis sigue este patrón III, aunque cabe destacar distintos aspectos. En primer lugar, en la zona de diferenciación los centriolos presentan asociadas unas raíces estriadas bien desarrolladas. La migración nuclear se produce antes de la fusión próximo-distal del flagelo con la expansión citoplasmática. Otro aspecto es la observación en la expansión citoplasmática de dos puntos de fusión, que luego no son visibles en el espermatozoide. Probablemente, estos puntos de fusión desaparecen tras la torsión de los microtúbulos corticales. Finalmente, otro detalle de interés en este estudio es la observación por primera vez del proceso de formación de la vaina periaxonemal. Tras la fusión próximo-distal se produce una condensación de material citoplasmático en la periferia de la espermátida, formando una estructura estriada radialmente en cortes transversos. Esta estructura anular y periférica, posteriormente, se desplaza hacia el interior de la espermátida, situándose alrededor del axonema y en íntimo contacto con él. Este es el origen de la vaina periaxonemal presente en el espermatozoide. Este desplazamiento, probablemente, es inducido por la torsión de los microtúbulos corticales.

El espermatozoide de las dos especies del género *Joyeuxiella* estudiadas ostenta unas características ultraestructurales similares, siendo las diferencias entre ambas muy escasas. Se trata de una célula filiforme y afilada en ambos extremos. Se puede distinguir cinco regiones distintas en función de los caracteres ultraestructurales observados. La región I es la extremidad anterior y termina en un cono apical opaco a los electrones y de longitud superior a 2000 nm en ambas especies. En dicho cono apical se inicia el único cuerpo en cresta helicoidal presente en ambas especies. El espesor máximo de dicha estructura constituye el único aspecto diferencial entre las dos especies: 75 nm en *J. pasqualei* y 150 nm en *J. echinorhynchoides*. El axonema, del tipo 9 + '1', carece en esta región de vaina periaxonemal. Los microtúbulos corticales forman una capa submembrana continua y están torsionados con un ángulo de unos 40-45° con respecto al hipotético eje longitudinal del espermatozoide. La región II se caracteriza por la desaparición del cuerpo en cresta y por la aparición de una vaina periaxonemal rodeando al axonema. La región III se caracteriza por la aparición entre la vaina periaxonemal y la capa de microtúbulos periféricos de un material granular de glucógeno, dispuesto en forma de dos cordones espiralados con el mismo ángulo que el cuerpo en cresta y los microtúbulos corticales. La región IV es la región nuclear en la que el núcleo se interpone entre la vaina periaxonemal y el axonema. En secciones transversales se aprecia una morfología que va desde una forma de herradura hasta una forma casi anular. La región

posterior del espermatozoide constituye la región V. Esta región carece de núcleo y de vaina periaxonemal. En sus áreas anteriores presenta todavía los microtúbulos corticales espiralados. Posteriormente se vuelven paralelos y van desapareciendo. Tras su total desaparición se desorganiza el axonema, alcanzando algunos dobletes y singuletes la extremidad posterior del gameto.

De este estudio se desprende que la única diferencia entre *J. pasqualei* y *J. echinorhynchoides* radica en el espesor del cuerpo en cresta helicoidal. Comparando estos caracteres con los observados en otro Dipylidiidae estudiado (*D. caninum*), se puede establecer la longitud del cono apical, la presencia o no de los dos cordones de gránulos de glucógeno y la morfología de la extremidad posterior como los aspectos diferenciales entre el espermatozoide de los representantes de los dos géneros de Dipylidiidae. Con referencia a la espermiogénesis, en los representantes de esta familia el tipo III parece ser el característico. Además, aunque finas y reducidas, la especie *D. caninum* también presenta raíces estriadas asociadas a los centriolos.

Discusión

El análisis global de todos los estudios espermátológicos ultraestructurales en digénidos existentes hasta la actualidad muestra que el proceso de espermiogénesis es muy homogéneo, no apreciándose grandes diferencias entre las diversas especies. En cuanto al espermatozoide, cabe apuntar como aspectos más interesantes la morfología de las dos extremidades (principalmente la posterior), las expansiones citoplasmáticas, la ornamentación externa de la membrana, los cuerpos espinosos y la presencia de una o más de una mitocondria.

En los Digenea el proceso de espermiogénesis se caracteriza básicamente por la elongación de dos flagelos a partir de la zona de diferenciación y de un modo ortogonal a una expansión citoplasmática mediana. Dichos flagelos sufren una rotación flagelar hasta situarse paralelos a la expansión citoplasmática mediana con la que posteriormente fusionan en un proceso de fusión próximo-distal. Este proceso, no sólo es característico de los Digenea, sino también de los Cercomeridea (Platelmintos parásitos) en general y fue establecido como una sinapomorfía para el taxón de los Cercomeridea por Justine (1991a). Se diferencia de otro proceso de espermiogénesis distinto que se da en los “Turbellaria” (Hendelberg, 1969). Estos dos procesos (la rotación flagelar y la fusión próximo-distal), en la mayoría de estudios, son descritos como procesos asincrónicos (Burton, 1972; Cifrián *et al.*, 1993; Gracenea *et al.*, 1997; Miquel *et al.*, 2000a; Baptista-Farias *et al.*, 2001; etc.). En la presente Memoria, nuestros resultados en *Scaphiostomum palaearticum* (Brachylaimidae) (Ndiaye *et al.*, 2002), *Fasciola hepatica* y *F. gigantica* (Fasciolidae) (Ndiaye *et al.*, 2003a, 2003b, 2003c) y *Notocotylus neyrai* (Notocotylidae) (Ndiaye *et al.*, 2003d), también apuntan en esta dirección.

En el caso de *F. hepatica* (Ndiaye *et al.*, 2003b), se ha observado por primera vez en un digénido una rotación flagelar de alrededor de 120°.

En los procesos de migración nuclear y mitocondrial, hay discrepancias entre distintos estudios. Existen especies en las que se describe una migración mitocondrial previa a la nuclear. Este es el caso, por ejemplo, de *Dicrocoelium dendriticum* (Dicrocoeliidae) (Cifrián *et al.*, 1993) y de *Postorchigenes gymnesicus* (Lecithodendriidae) (Gracenea *et al.*, 1997). Por el contrario, en la mayoría de especies se describe la migración nuclear como un proceso previo a la migración de la mitocondria. Este es el caso de *Haematoloechus medioplexus* (Haematoloechidae) (Burton, 1972), *Prosorhynchoides gracilescens* (= *Bucephaloides gracilescens*) (Bucephalidae) (Erwin & Halton, 1983), *Maritrema linguilla* (Microphallidae) (Hendow & James, 1988), *Echinostoma caproni* (Echinostomatidae) (Iomini & Justine, 1997), *Opecoeloides furcatus* (Opecoelidae) (Miquel *et al.*, 2000a), *Saccocoeloides godoyi* (Haploporidae) (Baptista-Farias *et al.*, 2001), entre otros, y, tras el presente estudio, *S. palaearticum*, *N. neyrai*, *F. hepatica* y *F. gigantea* (Ndiaye *et al.*, 2002, 2003b, 2003c, 2003d).

Para los cestodos, Swiderski (1986a) establece tres tipos de espermiogénesis, el tipo Pseudophyllidea, el tipo Caryophyllidea y el tipo Cyclophyllidea en función del número de flagelos originados de la zona de diferenciación y de si se produce o no fusión entre flagelo/s y la expansión citoplasmática.

Posteriormente, Bâ & Marchand (1995) postulan cuatro tipos de espermiogénesis (I a IV). Teniendo en cuenta lo postulado por dichos autores y todos los estudios realizados hasta la fecha, se puede especificar los órdenes y especies que presentan estos distintos tipos espermiogénéticos como sigue. El tipo I se caracteriza por la rotación flagelar y posterior fusión próximo-distal de los dos flagelos libres con la expansión citoplasmática mediana. Se ha descrito en los Diphyllidea *Echinobothrium brachysoma*, *E. typus* (Azzouz-Draoui, 1985) y probablemente en *E. affine* (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984), en el Trypanorhyncha *Lacistorhynchus tenuis* (Euzet *et al.*, 1981; Swiderski, 1994), en los Tetraphyllidea-Onchobothriidae *Onchobothrium uncinatum* (Mokhtar-Maamouri & Swiderski, 1975), *Acanthobothrium benedeni* (= *A. filicolle benedeni*) (Mokhtar-Maamouri & Swiderski, 1975) y *Acanthobothrium filicolle* (= *A. filicolle filicolle*) (Mokhtar-Maamouri, 1982), en los Tetraphyllidea-Phyllobothriidae *Phyllobothrium lactuca* (Sène *et al.*, 1999) y *Trilocularia acanthiaevulgaris* (Mahendrasingam *et al.*, 1989), en los Pseudophyllidea *Bothriocephalus clavibothrium* (Swiderski & Mokhtar-Maamouri, 1980) y *Eubothrium crassum* (Brunanska *et al.*, 2001) y en los Proteocephalidea *Proteocephalus longicollis* (Swiderski, 1985), *Nomimoscolex* sp. (Sène *et al.*, 1997) y *Proteocephalus torulosos* (Brunanska *et al.*, en prensa). El tipo II se caracteriza por la rotación flagelar y la fusión próximo-distal de un único flagelo libre con la expansión citoplasmática. Ha sido descrito en

el Diphyllidea *Echinobothrium harfordi* (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984), en el Caryophyllidea *Glaridacris catostomi* (Swiderski & Mackiewicz, 2002), en el Tetrphyllidea-Phyllobothriidae *Phyllobothrium gracile* (Mokhtar-Maamouri, 1979), en el Tetrabothriidea *Tetrabothrius erostris* (Stoitsova *et al.*, 1995) y en el Cyclophyllidea *Mesocestoides litteratus* (Miquel *et al.*, 1999). Los tipos III y IV están restringidos a los cestodos del orden Cyclophyllidea. El tipo III se caracteriza por la ausencia de rotación flagelar y la presencia de una fusión próximo-distal del flagelo libre con la expansión citoplasmática. Así, en este tipo, el flagelo se desarrolla paralelo a la expansión citoplasmática. Se ha observado en el Anoplocephalidae *Mathevotaenia herpestis* (Bâ & Marchand, 1994b), en el Catenotaeniidae *Catenotaenia pusilla* (Hidalgo *et al.*, 2000), en el Davaineidae *Raillietina tunetensis* (Bâ & Marchand, 1994c), en los Dipylidiidae *Dipylidium caninum* (Miquel *et al.*, 1998a) y tras el presente estudio *Joyeuxiella pasqualei* y *J. echinorhynchoides* (Ndiaye *et al.*, 2003e), en el Nematotaeniidae *Nematotaenia chantalae* (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1990) y en los Taeniidae *Echinococcus granulosus* (Morseth, 1969), *Taenia hydatigena* (Featherston, 1971) y tras el presente estudio *Taenia parva* (Ndiaye *et al.*, 2003f). El tipo IV se caracteriza por la ausencia de rotación flagelar y de fusión próximo-distal, y se correspondería con el tipo Cyclophyllidea definido por Swiderski (1986a). En este tipo el axonema se desarrolla directamente dentro de la expansión citoplasmática. Se ha citado en los Anoplocephalidae *Anoplocephaloides dentata* (Miquel & Marchand, 1998a), *Aporina delafondi* (Bâ & Marchand, 1994d), *Sudarikovina taterae* (Bâ *et al.*, 2000) y *Thysaniezia ovilla* (Bâ *et al.*, 1991) y en los Hymenolepididae *Dicranotaenia coronula* (Chomicz & Swiderski, 1992a), *Monorcholepis dujardini* (Swiderski & Tkach, 1996a), *Rodentolepis nana* (= *Hymenolepis nana*) (Bâ & Marchand, 1992a) y *Rodentolepis microstoma* (= *Vampirolepis microstoma*) (Bâ & Marchand, 1998).

Por otra parte, existen ciertas modificaciones respecto a los cuatro patrones planteados en su día por Bâ & Marchand (1995). Estos casos particulares implican a los Cyclophyllidea, y con ello a los tipos III y IV de espermiogénesis. En este sentido, en el tipo III de espermiogénesis, Hidalgo *et al.* (2000) observaron una rotación flagelar de unos 45° en *Catenotaenia pusilla*. En el presente estudio, en el caso de *Taenia parva* (Ndiaye *et al.*, 2003f) se observa también este hecho. Por otra parte, otro aspecto que se aprecia en la espermiogénesis de algunas especies es la presencia en la zona de diferenciación de raíces estriadas asociadas a los centriolos. Así, tanto *Anoplocephaloides dentata* (Miquel & Marchand, 1998a) como *Dipylidium caninum* (Miquel *et al.*, 1998a) presentan raíces estriadas asociadas a los centriolos en los tipos espermiogénéticos IV y III respectivamente. Sin embargo, es importante señalar que se trata en ambos casos de unas raíces estriadas muy finas y poco desarrolladas. Este hecho motivó la recodificación del carácter “presencia o ausencia de raíces estriadas” por el de “presencia o ausencia de típicas raíces estriadas” por parte de Justine (2001), adquiriendo estas estructuras, probablemente, un interés filogenético a nivel de relaciones intraordinales en los Cyclophyllidea. A este aspecto citado con anterioridad, cabe

añadir que tras el presente estudio (Ndiaye *et al.*, 2003e) se incrementa este grupo de casos particulares con el hallazgo en la zona de diferenciación de *Joyeuxiella pasqualei* y *J. echinorhynchoides* de raíces estriadas, bien desarrolladas, asociadas a los centriolos. Este hecho denota la presencia de este carácter plesiomorfo en dos de los tres géneros de la familia Dipylidiidae. Además, los representantes de esta familia mostrarían las condiciones más primitivas entre los Cyclophyllidea en el tipo de espermiogénesis y el número de cuerpos en cresta. En este sentido, sería muy interesante el estudio del espermatozoide de algunas de las especies del género *Diplopylidium*, a fin y efecto de constatar la presencia o no de este carácter.

Justine (2001) manifiesta que los Cyclophyllidea constituyen un taxón terminal caracterizado por tres sinapomorfias: la ausencia de típicas raíces estriadas, la ausencia de rotación flagelar y la presencia de un único axonema en la zona de diferenciación. Al respecto, a la problemática de la presencia o no de raíces estriadas, ya sean poco o bien desarrolladas, hay que añadir la existencia de una rotación flagelar en algunos de los Cyclophyllidea estudiados hasta la actualidad. Se trata, no obstante, con la salvedad de *Mesocestoides litteratus* (Miquel *et al.*, 1999), de rotaciones de unos 45°, ya que en ninguno de los casos el flagelo libre crece perpendicular a la expansión citoplasmática. Además, tanto *Catenotaenia pusilla* (Hidalgo *et al.*, 2000) como *Taenia parva* (Ndiaye *et al.*, 2003f) carecen de típicas raíces estriadas y de cuerpo intercentriolar, caracteres plesiomorfos típicos de patrones espermiogénicos más primitivos como los tipos I y II. En el caso del Mesocestoididae, la situación parece bastante clara, ya que se trata de un grupo cuya posición sistemática no ha estado exenta de controversia y confusión a lo largo del tiempo. Diversos autores han abordado esta problemática (Brooks *et al.*, 1991; Rausch, 1994), llegando a proponer la exclusión de los Mesocestoididae del orden Cyclophyllidea adquiriendo a este grupo la categoría ordinal (Wardle *et al.*, 1974; Brooks *et al.*, 1991). Se trata de una familia cuyos representantes presentan un ciclo vital triheteroxeno, presentan una glándula vitelógena bipartida y presentan el poro genital con una situación medioventral, características únicas en los Cyclophyllidea. A estas particularidades de orden morfoanatómico y biológico se le añaden las de índole molecular tras el estudio de Mariaux (1998). Dicho autor manifiesta la necesidad de la exclusión de la familia Mesocestoididae, tras la erección de la familia Tetrabothriidae en orden Tetrabothriidea, para que el orden Cyclophyllidea conserve un carácter monofilético. En este caso particular, los datos espermátológicos ultraestructurales de la espermiogénesis, a los que cabe añadir el patrón paralelo de los microtúbulos corticales en el espermatozoide (Miquel *et al.*, 1999), apuntan también en esta dirección y apoyan la posible exclusión de este grupo del orden Cyclophyllidea. Así, según Justine (2001), los Mesocestoididae se situarían como grupo basal de los Tetrabothriidea y Cyclophyllidea. En nuestra opinión, esta ubicación basal de los Mesocestoididae es bastante lógica desde este punto de vista ultraestructural. Los Mesocestoididae representarían un taxón intermedio con caracteres plesiomorfos y en los que la reducción del cuerpo intercentriolar marcaría el paso de cestodos primitivos a

Tetrabothriidea y, posteriormente, a Cyclophyllidea. Otras especies que presentan un cuerpo intercentriolar reducido son los Proteocephalidea *Nomimoscolex* sp. (Sène *et al.*, 1997) y *Proteocephalus torulosus* (Brunanska *et al.*, en prensa) y el Lecanicephalidea *Tetragonocephalum* sp. (Justine, 2001). Los Tetrabothriidea todavía conservan el patrón espermiogénético II pero carecen de cuerpo intercentriolar y, sobre todo, muestran ya el carácter apomorfo de los microtúbulos corticales espiralados en el espermatozoide.

En la presente Memoria se constata que, tanto las raíces estriadas, como la rotación flagelar se manifiestan como caracteres variables, tal y como acontece con el cuerpo intercentriolar (presente, reducido y ausente). Cabría, en este sentido, considerar tres condiciones posibles con respecto a las raíces estriadas: “presencia de raíces estriadas típicas”, “presencia de raíces estriadas reducidas” y “ausencia de raíces estriadas”. Asimismo, debería recodificarse el carácter de “rotación flagelar” presente en los tipos de espermiogénesis I y II como “rotación flagelar completa o rotación flagelar $\geq 90^\circ$ ” y considerar otras dos condiciones: la “rotación flagelar incompleta o rotación flagelar $< 90^\circ$ ” y la “ausencia de rotación flagelar”.

En referencia al carácter “presencia de uno o dos axonemas en la zona de diferenciación” (Justine, 1998a, 2001), pensamos que no puede ser considerado como una sinapomorfia. Según dicho autor, en los Caryophyllidea, Diphyllidea, Tetraphyllidea-Phyllobothriidae y Proteocephalidea existen especies con dos axonemas en la zona de diferenciación (espermiogénesis plesiomorfa) y un solo axonema a nivel de espermatozoide (espermatozoide apomorfo). El segundo axonema de Justine no es más que un centriolo situado en una pequeña prominencia citoplasmática y que aborta sin originar flagelo. Este centriolo se halla en los Caryophyllidea (Swiderski & Mackiewicz, 2002), los Tetraphyllidea-Onchobothriidae (Mokhtar-Maamouri, 1980, 1982), los Tetraphyllidea-Phyllobothriidae (Mahendrasingam *et al.*, 1989; Sène *et al.*, 1999), y algunos Cyclophyllidea como los Dipylidiidae (Ndiaye *et al.*, 2003e) y los Taeniidae (Ndiaye *et al.*, 2003f), entre otros. Por todo ello, creemos que el carácter “presencia de uno o dos axonemas en la zona de diferenciación” debe ser revisado.

El espermatozoide de los Digenea se caracteriza por presentar mitocondria, núcleo, dos axonemas del tipo 9 + ‘1’ típico de los Trepaxonemata y microtúbulos corticales paralelos (Burton, 1972; Jamieson & Daddow, 1982; Justine & Mattei, 1982a, 1982b; Erwin & Halton, 1983; Iomini & Justine, 1997; Miquel *et al.*, 2000a). En las especies estudiadas (*S. palaearticum*, *F. hepatica*, *F. gigantea* y *N. neyrai*) se han detectado ciertas particularidades que son detalladas a continuación.

Una particularidad presente en el espermatozoide de numerosos Digenea es la existencia de una ornamentación externa en la membrana plasmática. Está asumido que esta ornamentación externa de la membrana se origina en las fases finales de la espermiogénesis y que procede de la zona de diferenciación (Justine & Mattei, 1982b). Dichas estructuras se observan en

regiones del espermatozoide relativamente anteriores. Así, en el presente estudio se ha realizado un análisis pormenorizado de su ubicación. Al respecto se han definido dos localizaciones: 1) en la región anterior; se correspondería con la zona del gameto con dos axonemas y anterior a la mitocondria y 2) en la región mitocondrial. Se ha detectado en la región anterior del espermatozoide en *Haematoloechus* sp. (Haematoloechidae) (Justine & Mattei, 1982b), *Gonapodasmius* sp. (Didymozoidae) (Justine & Mattei, 1982a), *Aphalloides coelomicola* (Opisthorchiidae) (Justine, 1995), *Pseudorhipidocotyle elpichtys* (Bucephalidae) (Tang *et al.*, 1998) y, tras la presente Memoria, en *S. palaearticum* (Ndiaye *et al.*, 2002) y *N. neyrai* (Ndiaye *et al.*, 2003d). Por su parte, otros autores describen esta ornamentación externa de la membrana en áreas mitocondriales del gameto: *Neochasmus* sp. (Cryptogonimidae) (Jamieson & Daddow, 1982), *Prosorhynchoides gracilescens* (Bucephalidae) (Erwin & Halton, 1983), *Paragonimus ohirai* (Paragonimidae) (Orido, 1988), *Proctoeces maculatus* (Fellodistomidae) (Justine, 1995), *Postorchigenes gymnesicus* (Lecithodendriidae) (Gracenea *et al.*, 1997), *Echinostoma caproni* (Echinostomatidae) (Iomini & Justine, 1997) y *Opecoeloides furcatus* (Opecoelidae) (Miquel *et al.*, 2000a). Finalmente, y fruto del presente estudio, tanto en *F. hepatica*, como en *F. gigantea* la ornamentación externa de la membrana ocupa áreas anteriores y mitocondriales del espermatozoide (Ndiaye *et al.*, 2003b, 2003c). Así, tras la presente Memoria se puede afirmar que dichas estructuras están presentes en 15 digénidos.

Un carácter descrito en un número reducido de especies es la presencia de los denominados cuerpos espinosos. Este carácter fue observado y descrito por primera vez en el Opecoelidae *Opecoeloides furcatus* por Miquel *et al.* (2000a) como unas prominencias submembranosas, opacas a los electrones y que contienen una estructura vesiculosa en el interior. Estas estructuras están presentes en la zona con ornamentación externa de la membrana y con presencia de mitocondria, observándose en dicha especie con una periodicidad de aproximadamente 1 μm . Tras el presente estudio se incrementa el número de especies que presentan esta estructura con el Notocotylidae *N. neyrai* (Ndiaye *et al.*, 2003d) y los Fasciolidae *F. hepatica* y *F. gigantea* (Ndiaye *et al.*, 2003b, 2003c). Al respecto de estos cuerpos espinosos, Miquel *et al.* (2000a) describen en *O. furcatus* su formación en fases avanzadas de la espermiogénesis, tras la fusión próximo-distal de los dos flagelos con la expansión citoplasmática mediana y tras la migración de la mitocondria. De hecho, se aprecia en zonas de la espermátida donde la mitocondria ya muestra su gran desarrollo y en las que la asimetría del gameto es muy marcada, tal y como se aprecia en el espermatozoide maduro del Opecoelidae. En el presente estudio, las observaciones en *F. hepatica* (Ndiaye *et al.*, 2003b) y *F. gigantea* (Ndiaye *et al.*, 2003c) confirman las observaciones efectuadas en la descripción original de los cuerpos espinosos (Miquel *et al.*, 2000a).

En el presente estudio se ha descrito la formación de la denominada expansión citoplasmática dorso-lateral (“*dorsolateral cytoplasmic expansion*”) en el transcurso de la espermiogénesis

de *Fasciola gigantica* (Ndiaye *et al.*, 2003c). Dicha estructura, en forma de gancho, ha sido también observada en el espermatozoide de *Fasciola hepatica* (Ndiaye *et al.*, 2003b). Con anterioridad una expansión similar tan solo había sido descrita en el espermatozoide de *Echinostoma caproni* (Iomini & Justine, 1997).

El espermatozoide de los cestodos presenta como una de las características más importantes la ausencia de mitocondria, carácter establecido como una sinapomorfía para los Eucestoda (Justine, 1991a). Asimismo, otra característica del espermatozoide de este taxón es la presencia de al menos un cuerpo en cresta de disposición helicoidal en la extremidad anterior del espermatozoide. Este aspecto fue descrito como un carácter sinapomórfico para los Eucestoda por Bâ & Marchand (1995). Además, los cuerpos en cresta marcan siempre la extremidad anterior del gameto masculino (Bâ *et al.*, 1991). Ello condiciona que la zona del espermatozoide con presencia de núcleo constituye la parte posterior del gameto. En la mayoría de Cyclophyllidea el número de cuerpos en cresta varía entre uno y dos excepto en los Cyclophyllidea Anoplocephalidae *Aporina delafondi* (Bâ & Marchand, 1994d) (con cinco cuerpos en cresta) y *Sudarikovina taterae* (Bâ *et al.*, 2000) (con siete) y en los Cyclophyllidea Hymenolepididae *Cladogynia serrata* (= *Retinometra serrata*) (Bâ & Marchand, 1993) (con seis), *Rodentolepis microstoma* (Bâ & Marchand, 1998) (con seis), *Rodentolepis straminea* (= *Hymenolepis straminea*) (Bâ & Marchand, 1996a; Ndiaye, 2002a) (con ocho), *Rodentolepis myoxi* (Ndiaye, 2002a) (con 9), *Hymenolepis sulcata* (Ndiaye, 2002a) (con 9), *Rodentolepis fraterna* (Ndiaye, 2002a) (con 10), *Rodentolepis* sp. (Ndiaye, 2002a) (con 11), *Echinocotyle dolosa* (Bâ *et al.*, 2002) (con 12) y *Rodentolepis nana* (Bâ & Marchand, 1992a) (con 12).

En el caso de los dos Dipylidiidae estudiados (Ndiaye *et al.*, 2003e) se ha apreciado un único cuerpo en cresta, aunque ambas especies muestran diferencias en cuanto al espesor de dicha estructura, siendo el doble en *Joyeuxiella pasqualei* que en *J. echinorhynchoides* (150 nm frente a 75 nm respectivamente). Asimismo, el análisis comparado con el otro Dipylidiidae del que se poseen datos (*Dipylidium caninum* -Miquel & Marchand, 1997) refleja como diferencias más remarcables la longitud del cono apical (mucho más largo en *Joyeuxiella* spp.) y la morfología de la extremidad posterior del espermatozoide (con microtúbulos corticales en *D. caninum* y con singuletes del axonema en *Joyeuxiella* spp.).

La presencia de vaina periaxonemal fue establecida como un carácter sinapomórfico para los Tetrabothriidea y Cyclophyllidea, aunque no está presente en algunos Cyclophyllidea. De este modo, es un carácter observado en el Tetrabothriidea *Tetrabothrius erostris* (Stoitsova *et al.*, 1995) y en numerosos Cyclophyllidea: en los Anoplocephalidae *Inermicapsifer guineensis* e *I. madagascariensis* (Bâ & Marchand, 1994e), *Mathevotaenia herpestis* (Bâ & Marchand, 1994b) y *Stilesia globipunctata* (Bâ & Marchand, 1992b); en los Catenotaeniidae *Catenotaenia pusilla* (Hidalgo *et al.*, 2000) y *Skrjabinotaenia lobata* (Miquel *et al.*, 1997a); en los Davaineidae *Cotugnia polyacantha* (Bâ & Marchand, 1994a) y *Railletina tunetensis*

(Bâ & Marchand, 1994c); en el Dilepididae *Dilepis undula* (Swiderski *et al.*, 2000); tras la presente Memoria en los Dipylidiidae *J. pasqualei* y *J. echinorhynchoides* (Ndiaye *et al.*, 2003e); en los Taeniidae *Echinococcus multilocularis* (Shi *et al.*, 1994), *Taenia hydatigena* (Featherston, 1971) y tras el presente trabajo *T. parva* (Ndiaye *et al.*, 2003f). Al respecto, cabe apuntar que Miquel & Marchand (1997) no la citan, pero la estructura se observa en el Dipylidiidae *Dipylidium caninum*. Además, la estructura señalada como tabiques intracitoplasmáticos transversos en el Taeniidae *Taenia mustelae* (Miquel *et al.*, 2000b) probablemente sea la vaina periaxonemal. Por su parte, Tian *et al.* (1998a) muestran en el género *Taenia* (micrografías no identificadas de *T. solium*, *T. saginata* y *T. pisiformis*) la presencia de esta estructura que rodea al axonema. Es por ello que, tras el presente estudio y después de estas últimas consideraciones, se puede afirmar que la vaina periaxonemal es una estructura característica del espermatozoide de los Cyclophyllidea Dipylidiidae y probablemente también de los Taeniidae.

En el presente estudio se ha observado por primera vez la formación de la vaina periaxonemal en un cestodo, durante los estadios finales de la espermiogénesis de las especies del género *Joyeuxiella* (Ndiaye *et al.*, 2003e). Se aprecia una densificación citoplasmática en la periferia de la espermátida. Este material se transforma en una estructura estriada radialmente. Ello se produce tras la fusión próximo-distal entre el flagelo libre y la expansión citoplasmática y, en esta fase, los microtúbulos corticales todavía muestran una disposición paralela. Con posterioridad, y coincidiendo con la torsión de los microtúbulos periféricos, esta estructura estriada se desplaza hacia el interior de la espermátida hasta rodear el axonema y situarse en una localización muy similar a la que presentará en el espermatozoide maduro, en íntimo contacto con el axonema. Cabe decir que, posteriormente, y probablemente también como consecuencia de la torsión de los microtúbulos corticales, se produce una reducción del espacio citoplasmático entre la vaina periaxonemal y la capa de microtúbulos corticales.

A este nivel, es interesante tener en cuenta la relación existente entre el tipo de espermiogénesis y la presencia o no de vaina periaxonemal. Así, mención a parte de *Tetrabothrius erostris* (Stoitsova *et al.*, 1995) que presenta vaina y ostenta un tipo de espermiogénesis II, en los Cyclophyllidea casi todas las especies que presentan vaina periaxonemal siguen un patrón III de espermiogénesis, mientras que no existe ningún Cyclophyllidea con espermiogénesis de tipo IV que contenga vaina periaxonemal en su espermatozoide. Las únicas excepciones son *Nematotaenia chantalae* (Nematotaeniidae) (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1990) y *Echinococcus granulosus* (Taeniidae) (Morseth, 1969). Así, la coexistencia de estos dos caracteres (patrón III y vaina periaxonemal) se da en *Mathevotaenia herpestis* (Bâ & Marchand, 1994b), *Catenotaenia pusilla* (Hidalgo *et al.*, 2000), *Railletina tunetensis* (Bâ & Marchand, 1994c), *Dipylidium caninum* (Miquel & Marchand, 1997; Miquel *et al.*, 1998a), *Taenia hydatigena* (Featherston, 1971), y tras el

presente estudio en *J. pasqualei* y *J. echinorhynchoides* (Ndiaye *et al.*, 2003e), y *T. parva* (Ndiaye *et al.*, 2003f).

Los resultados inmunocitoquímicos obtenidos con *F. hepatica* en el presente estudio para la α -tubulina, la β -tubulina y la tubulina acetilada son coincidentes con los estudios previos, tanto en lo referente al marcaje de microtúbulos del axonema, como de corticales (Iomini *et al.*, 1995; Mollaret & Justine, 1997; Justine *et al.*, 1998; Raikova *et al.*, 1998; Justine, 1999; Raikova & Justine, 1999; Miquel & Marchand, 2001; González-Moreno, 2002). Por otra parte, el marcaje por primera vez de la tubulina tirosinada ha aportado los mismos resultados, tanto a nivel del axonema, como de los microtúbulos corticales. Finalmente, cabe decir que en ninguno de los estudios previos ni en el presente se obtiene marcaje del elemento central del axonema 9 + '1' de los Platelminos Trepaxonemata.

Conclusiones

Como conclusiones de la presente Memoria podemos considerar las siguientes:

1. Se incrementa el estado de conocimiento de la espermiogénesis y del espermatozoide con el estudio de cuatro digénidos (*Scaphiostomum palaearticum*, *Notocotylus neyrai*, *Fasciola hepatica* y *F. gigantica*) y tres cestodos Cyclophyllidea (*Joyeuxiella pasqualei*, *J. echinorhynchoides* y *Taenia parva*).
2. Los digénidos estudiados presentan todos ellos un proceso de espermiogénesis similar.
3. El espermatozoide de los digénidos presenta una organización ultraestructural bastante constante, con dos axonemas del tipo 9 + '1' típico de los Platelminos Trepaxonemata, mitocondria, núcleo y microtúbulos corticales paralelos. La morfología de las extremidades (principalmente la posterior), las expansiones citoplasmáticas, la ornamentación externa de la membrana, los cuerpos espinosos y el número de mitocondrias se apuntan como los caracteres de mayor interés.
4. Las expansiones citoplasmáticas y la ornamentación externa de la membrana, presentes en algunos digénidos, son caracteres ultraestructurales que se originan a partir de la zona de diferenciación.
5. El proceso de espermiogénesis en las dos especies del género *Joyeuxiella* se corresponde con un tipo III según los patrones postulados por Bâ & Marchand (1995). No obstante, como particularidad, cabe resaltar que ambos Dipylidiidae presentan raíces estriadas bien desarrolladas.

6. El estudio comparado de la ultraestructura del espermatozoide de *Joyeuxiella pasqualei* y *J. echinorhynchoides* muestra como única diferencia el espesor máximo del cuerpo en cresta, que en *J. echinorhynchoides* es el doble que en *J. pasqualei* (150 nm frente a 75 nm).
7. Tras el presente estudio, la existencia de datos espermatólogicos ultraestructurales en dos de los tres géneros de la familia Dipylidiidae permite afirmar que la espermiogénesis en dicha familia se caracteriza por seguir el patrón de tipo III, con la presencia de raíces estriadas como particularidad. A nivel del espermatozoide, la presencia de un solo cuerpo en cresta y de vaina periaxonemal es otra característica de esta familia.
8. La vaina periaxonemal, presente en el espermatozoide de algunos cestodos Cyclophyllidea, se forma antes del final de la espermiogénesis como consecuencia de una condensación de material citoplasmático opaco a los electrones.
9. El análisis de los datos ultraestructurales existentes en la familia Taeniidae permite definir la espermiogénesis de tipo III probablemente como característica de la familia. A nivel del espermatozoide, la presencia de un solo cuerpo en cresta y de vaina periaxonemal es otra característica de esta familia.
10. La presencia de rotación flagelar de unos 45° en diversos Cyclophyllidea obliga a la recodificación del carácter “presencia o ausencia de rotación flagelar” por el de “presencia o ausencia de rotación flagelar completa” o “presencia o ausencia de rotación flagelar de 90°”.
11. En *Fasciola hepatica* se ha observado un inmunomarcaje positivo de la tubulina mediante los distintos anticuerpos ensayados (anti- α -tubulina, anti- β -tubulina, anti-tubulina acetilada y anti-tubulina tirosinada), tanto para los microtúbulos axonemales, como para los corticales. Por el contrario, ninguna de las cuatro anti-tubulinas ensayadas ha marcado el elemento central del axonema 9 + ‘1’ típico de los Trepaxonemata.

1. Introduction

Le travail que nous présentons dans ce mémoire porte sur des études ultrastructurales de la reproduction (spermiogenèse et spermatozoïde) réalisées dans le but d'améliorer la connaissance de la Systématique et de la Phylogénie de Plathelminthes parasites (Trematoda et Cestoda). Le document est divisé en quatre chapitres.

Dans ce chapitre introductif, nous rappellerons brièvement l'intérêt des études ultrastructurales de la spermiogenèse et du spermatozoïde des Plathelminthes parasites (Aspidogastrea, Digenea, Monogenea, Amphilinidea, Gyrocotylidea et Eucestoda) pour la Systématique et la Phylogénie de ces groupes. Nous résumerons également l'état actuel des connaissances sur l'ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde chez les digènes et les cestodes (groupes objets de notre étude) et les études effectuées sur la tubuline, élément constitutif du cytosquelette microtubulaire du gamète mâle. Les objectifs de notre étude seront exposés à la fin de ce chapitre.

Dans le second chapitre, nous ferons une brève description des espèces de Plathelminthes étudiées et des différentes techniques utilisées en microscopie électronique à transmission et à balayage.

Dans le troisième chapitre, nous présenterons comme résultats une compilation des publications que nous avons réalisées et qui sont parues ou à paraître dans des revues internationales de parasitologie. La succession des articles correspond à une approche scientifique qui consiste à exposer d'abord les résultats concernant les digènes puis ceux des cestodes.

Dans le quatrième chapitre, nous présenterons la discussion globale de l'ensemble de nos résultats.

Les conclusions qui en découlent formeront le dernier chapitre.

Toutes les références bibliographiques qui apparaissent dans le texte sont répertoriées à la fin du mémoire.

1.1. Intérêt de l'étude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde des Plathelminthes

Les premières tentatives de classification des Plathelminthes parasites, basées principalement sur des critères morphologiques (Baer, 1927 ; Baer & Euzet, 1961 ; Joyeux & Baer, 1961) ont

beaucoup changé ces dernières années du fait de l'utilisation de nouveaux caractères ultrastructuraux du gamète mâle et des méthodes cladistiques et moléculaires. A priori, les caractères ultrastructuraux du spermatozoïde des Plathelminthes sont indépendants du phénomène de parasitisme et des influences relatives à la spécificité des hôtes (Justine, 1998a). Par ailleurs, la grande variabilité du spermatozoïde explique l'utilisation de ses caractères ultrastructuraux, nombreux et informatifs, pour la phylogénie d'un grand nombre de phyla (Jamieson *et al.*, 1995). Le spermatozoïde des Plathelminthes fût utilisé pour la première fois comme outil phylogénétique par Hendelberg (1969) chez les Turbellariés. Par la suite, la classification générale des Plathelminthes proposée par Ehlers (1984, 1985a, 1985b, 1986), basée sur des caractères morphologiques et ultrastructuraux du spermatozoïde, démontra l'utilité de ces caractères pour la phylogénie de ce groupe. De la même manière, Brooks *et al.* (1985), proposèrent à la même époque une phylogénie restreinte aux taxons parasites, basée sur le travail préliminaire de Brooks (1982) et qui coïncide parfaitement avec la classification générale de Ehlers. Cette classification a été reprise et commentée dans divers articles du même auteur (Brooks, 1989a, 1989b, 1989c ; Brooks & McLennan, 1993). Par la suite, plusieurs auteurs dont Justine (1991a, 1998a, 2001), Bâ & Marchand (1994a, 1995), Hoberg *et al.* (1997) ont utilisé des caractères ultrastructuraux du spermatozoïde pour affiner les relations phylogénétiques dans de grands groupes de Plathelminthes. Ainsi, au moins 15 caractères du gamète mâle des Plathelminthes parasites sont actuellement utilisés comme outils pour l'analyse phylogénétique (Justine, 1998a). Ces caractères sont : a) le nombre d'axonèmes, b) la taille et le nombre des corps en crête (« *crest-like bodies* », « *crested bodies* »), c) la disposition des microtubules corticaux, d) l'absence de mitochondrie, e) la mesure de l'angle formé par l'enroulement des microtubules corticaux, f) le modèle de spermiogenèse, g) la présence ou l'absence de corps intercentriolaire (« *intercentriolar body* »), h) les racines striées (« *striated roots* », « *striated rootlets* »), i) la gaine périaxonémale (« *periaxonemal sheath* »), j) les cloisons protéiques intracytoplasmiques (« *transverse intracytoplasmic walls* », k) les granules opaques aux électrons, l) le cône apical, m) l'ultrastructure de l'extrémité postérieure, n) la disposition du noyau, o) la répartition des microtubules corticaux. Ces méthodes cladistiques et ultrastructurales associées à l'analyse moléculaire basée sur les séquences d'ARN 18S et 28S (Baverstock *et al.*, 1991 ; Rohde *et al.*, 1993, 1994, 1995 ; Carranza *et al.*, 1997 ; Mollaret *et al.*, 1997 ; Littlewood *et al.*, 1998a, 1998b ; Mariaux, 1998) ont permis de démontrer la monophylie des Plathelminthes parasites comprenant les groupes bien connus des Monogenea, Digenea et Eucestoda, mais aussi les petits groupes suivants : Aspidogastrea, Amphilinidea et Gyrocotylidea (Justine, 1998b ; Littlewood *et al.* 1999, 2001 ; Olson *et al.*, 2003).

Ehlers (1984) décrit parmi les Plathelminthes, le taxon Trepaxonemata qui se caractérise par un spermatozoïde à axonème de type 9 + '1'. Le nom Trepaxonemata signifie « axonème torsadé » et fait référence à la structure hélicoïdale, perceptible en coupe longitudinale, de l'élément central de l'axonème (Ehlers, 1984, 1985a, 1985b, 1986). Ce caractère est

extrêmement intéressant, du fait de la présence de la structure universelle 9 + 2 chez les autres Plathelminthes. Il est également important de souligner les éléments suivants :

- 1) les cellules somatiques ciliées présentes chez les Trepaxonemata (épiderme, canaux génitaux, cellules excrétrices) ont un axonème de type 9 + 2. Chez les Trepaxonemata il y a donc apparemment toujours coexistence des types 9 + '1' et 9 + 2 dans le même organisme.
- 2) Les études immunocytochimiques ont démontré chez divers taxons de Trepaxonemata l'absence de tubuline au niveau de l'élément central de l'axonème 9 + '1'. Ainsi, chez les Temnocephalidea (Justine *et al.*, 1998 ; Justine, 1999), les Monogenea (Mollaret & Justine, 1997 ; Justine, 1999), les Digenea (Iomini *et al.*, 1995 ; Iomini & Justine, 1997 ; Justine, 1999 ; González-Moreno, 2002) et les Eucestoda (Miquel & Marchand, 2001) l'élément central de l'axonème ne présente pas de tubuline, ce qui renforce encore le caractère exceptionnel de ce type 9 + '1'.

Selon Ehlers, les Plathelminthes Trepaxonemata regroupent les Polycladida + Neophora (Lecithoepitheliata + Prolecithophora + Seriata (Proseriata + Tricladida) + Rhabdocoela (Typhloplanoida + Doliopharyngiophora (Dalyellioidea + Cercomeria (Temnocephalidea + Neodermata (Udonellidea + Cercomeridea (Trematoda (Aspidobothrea + Digenea) + Cercomeromorphae (Monogenea (Polyopisthocotylera + Monopysthocotylea) + Cestodaria (Gyrocotylidea + Cestoidea (Amphilinidea + Eucestoda (non Cyclophyllidea + Cyclophyllidea)))))))))) [voir les classifications proposées par Justine (1991a, 1997) à partir des propositions de Ehlers et Brooks]. Quant aux Plathelminthes non Trepaxonemata, ils comprennent les Catenulida + Acoelomorpha (Nemertodermatida + Acoela) + Macrostomida (Justine, 1991a, 1997) (voir Figure 1). Pour sa part, Brooks (1989a) aborda la phylogénie des grands groupes de Plathelminthes parasites en utilisant 120 caractères parmi lesquels 88 sont des caractères anatomiques dont 32 sont des caractères ultrastructuraux.

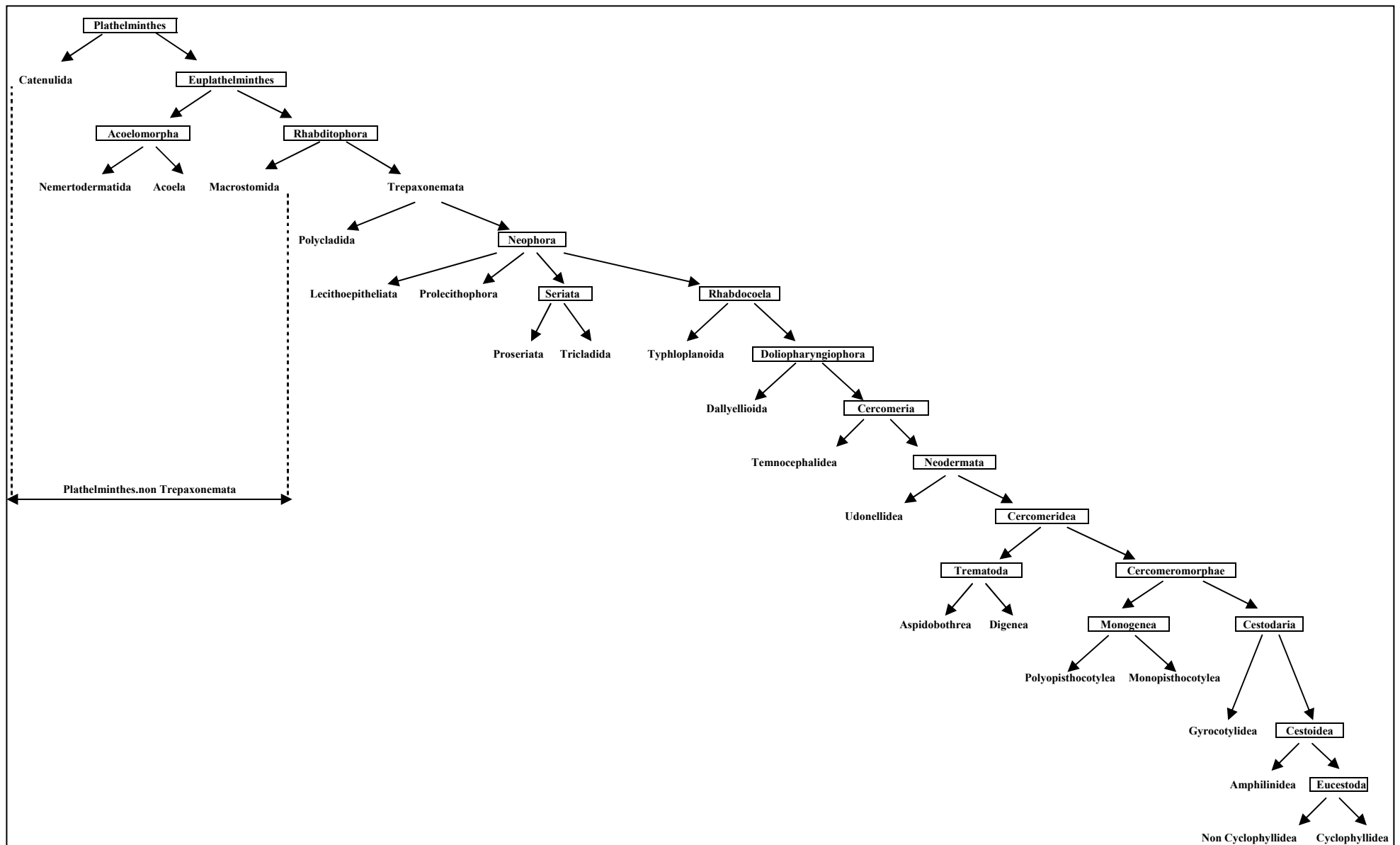


Figure 1. Schéma montrant les principaux groupes de Plathelminthes selon Ehlers (1984, 1985a, 1985b, 1986, 1988), Brooks *et al.* (1985), Ax (1987) et Brooks (1989a, 1989b).

Les caractères ultrastructuraux du spermatozoïde utilisés par Ehlers (1984, 1985a, 1985b, 1986, 1988) et Brooks (1989a, 1989b) dans leurs analyses cladistiques ont été étudiés de façon critique par Justine (1991a). Il analysa les diverses synapomorphies établies sur la base des caractères ultrastructuraux de la spermiogenèse et du spermatozoïde des Plathelminthes, en rejetant certaines, confirmant d'autres et proposant de nouvelles. Les nouvelles synapomorphies proposées ainsi que celles qui ont été confirmées sont les suivantes :

- 1) chez les Cercomeridea (Plathelminthes parasites), les centrioles se trouvent à la base des spermatides en élongation et les flagelles s'incorporent à l'expansion médiane par un processus de fusion dite « proximo-distale » (« *proximo-distal fusion* »)
- 2) chez les monogènes Polyopisthocotylea, présence de microtubules latéraux dans la région principale du spermatozoïde
- 3) chez les monogènes Monopisthocotylea, absence de microtubules dorsaux et ventraux au niveau de la région principale du spermatozoïde
- 4) chez les Neodermata, absence de granules opaques aux électrons
- 5) chez les Temnocephalidea, présence d'une couche de microtubules longitudinaux spiralés
- 6) chez les Eucestoda, absence de mitochondrie
- 7) chez les Cyclophyllidea, torsion des microtubules corticaux

Les caractères 1, 2, 3, et 7 constituent les nouvelles synapomorphies établies par Justine (1991a), tandis que les autres sont des caractères utilisés par Ehlers (1984, 1985a, 1985b, 1986), Justine *et al.* (1987), Brooks (1989a) et Xylander (1989).

Les caractères spermatologiques ultrastructuraux ont également été utilisés dans l'interprétation des relations phylogénétiques des Monogenea par Justine (1991b, 1993). Ces caractères spermatologiques ont été par la suite associés à d'autres caractères morphologiques classiques pour une analyse beaucoup plus ample des Monogenea (Boeger & Kritsky, 1993, 1997, 2001). Dans l'étude de Boeger & Kritsky (2001), 14 des 66 caractères utilisés sont en relation avec les aspects ultrastructuraux de la spermiogenèse et du spermatozoïde.

Au cours des ces dernières années, la multiplication des études ultrastructurales chez les Plathelminthes, particulièrement chez les trématodes et les cestodes, a permis de mettre en évidence l'utilité des caractères spermatologiques (spermiogenèse et spermatozoïde) pour la taxonomie et la phylogénie de ce groupe (*e. g.* Euzet *et al.*, 1981 ; Justine & Mattei, 1985 ; Justine *et al.*, 1993 ; Swiderski, 1986a, 1986b, 1986c ; Justine, 1991a, 1991c, 1991d, 1995, 1997, 1998a, 1998b, 1999, 2001 ; Bâ & Marchand, 1994a, 1995 ; Watson & Rhode, 1995 ; Hoberg *et al.*, 1997 ; Miquel *et al.*, 1999 ; Raikova *et al.*, 2001 ; Xylander, 2001).

En se basant uniquement sur l'anatomie du complexe génital, l'embryologie et le déroulement du cycle évolutif, Euzet (1974) proposa une évolution diphyllétique des cestodes suivant deux lignées évolutives distinctes :

- une branche (A) qui regroupe les Tetrarhynchidea, les Haplobothriidea et les Pseudophyllidea
- et une branche (B) qui comprend Tetracyllidea, Proteocephalidea, Cyclophyllidea, Diphyllidea et Tetrabothriidea.

Cette classification fût reprise et affinée par Euzet *et al.* (1981) grâce à l'apport de nouveaux caractères ultrastructuraux du spermatozoïde. Ainsi, ces auteurs émirent deux hypothèses:

1. l'existence dès le départ de deux rameaux dans le groupe (B) dont l'un comprend les Tetracyllidea-Onchobothriidae de Sélaciens et les Proteocephalidea de Poissons et Reptiles qui ont un spermatozoïde à deux axonèmes. Sur l'autre se placent les Tetracyllidea-Phyllobothriidae de Sélaciens et les Cyclophyllidea de Vertébrés terrestres qui ont un spermatozoïde à un axonème. Selon ces auteurs, les Diphyllidea de Sélaciens seraient dans ce rameau sans que l'on puisse leur assigner une place précise.
2. ou bien l'existence d'un groupe (B) où l'on place les cestodes qui ont un spermatozoïde à deux axonèmes (Tetracyllidea-Onchobothriidae et Proteocephalidea) et à partir desquels seraient sortis, à diverses périodes, les rameaux avec des espèces qui ont un spermatozoïde à un axonème (Diphyllidea, Tetracyllidea-Phyllobothriidae et Cyclophyllidea).

Pour ces auteurs, seule la position systématique des Haplobothriidea fût problématique du fait de l'absence d'études ultrastructurales du spermatozoïde dans ce groupe. Ils considèrent que la présence d'un seul axonème est un caractère apomorphe et la présence de deux axonèmes un caractère plésiomorphe.

Cinq ans après, Swiderski (1986a) établit trois types fondamentaux de spermiogénèse chez les cestodes en se basant principalement sur deux critères :

- le nombre de flagelles issus de la zone de différenciation
- l'existence ou non d'une fusion complète entre le ou les flagelles et l'expansion cytoplasmique médiane.

Ainsi, les trois types de spermiogénèse proposés par Swiderski (1986a) et repris récemment dans Swiderski & Mackiewicz (2002) sont le type Pseudophyllidea, illustré par l'auteur avec le cas de l'Onchobothriidae *Acanthobothrium benedeni* (= *A. filicolle benedeni*), le type Caryophyllidea, illustré par la spermiogénèse de *Glaridacris catostomi* et le type Cyclophyllidea, illustré par l'exemple de *Rodentolepis microstoma* (= *Hymenolepis microstoma*).

Plus tard, grâce à une base de données plus ample sur la spermatologie des Plathelminthes, en particulier chez les Cyclophyllidea, Bâ & Marchand (1995) proposèrent quatre types de spermiogenèse chez les Eucestoda (types I à IV). Ce modèle est basé sur trois critères :

- le nombre de flagelles qui se développent à partir de la zone de différenciation
- la présence ou non de rotation flagellaire
- la présence ou non de fusion proximo-distale

De plus, Bâ & Marchand (1995), après une étude comparée de la spermiogenèse et/ou du spermatozoïde de 43 espèces de cestodes considèrent que :

- la rotation flagellaire et la fusion proximo-distale sont des caractères plésiomorphes des Eucestoda
- l'absence de rotation flagellaire est une synapomorphie pour les Cyclophyllidea
- la présence de corps en crête au niveau de la partie antérieure du spermatozoïde est une synapomorphie du spermatozoïde chez les Eucestoda
- l'absence de mitochondrie est une synapomorphie pour les Eucestoda.

La révision des caractères ultrastructuraux du spermatozoïde des cestodes effectuée par Justine (1998a) est sans doute l'un des travaux les plus importants sur le sujet. Par la suite, il y a eu les travaux de Hoberg *et al.* (1997) et Mariaux (1998) suite au « 2nd International Workshop for Tapeworm Systematics » tenu à l'Université de Nebraska, Lincoln, du 2 au 6 octobre 1996. Dans ce travail, Justine (1998a) aborde l'intérêt phylogénétique des caractères ultrastructuraux de la spermiogenèse et du spermatozoïde chez les Eucestoda, en analysant toutes les études existantes et en insistant sur les particularités de chaque ordre, tout en valorisant les différents caractères spermatologiques qui méritent d'être approfondis chez les eucestodes.

Considérant les caractères : présence de mitochondrie, de corps en crête, de corps intercentriolaire, de racines striées, de microtubules corticaux, de gaine periaxonémale, de rotation flagellaire, de un ou deux axonèmes dans la zone de différenciation et au niveau du spermatozoïde, la disposition des microtubules corticaux et fusion proximo-distale, il est possible de définir 10 synapomorphies (Justine, 1998a). Certaines d'entre elles étant déjà définies par des études antérieures (*e. g.* Justine, 1991a ; Bâ & Marchand, 1995).

Hoberg *et al.* (1997) ont analysé les relations phylogénétiques des eucestodes en associant les caractères morphologiques classiques aux caractères ultrastructuraux du spermatozoïde. Ainsi, des 49 caractères utilisés, neuf sont des caractères spermatologiques ultrastructuraux :

- 1) présence ou absence de mitochondrie au niveau du spermatozoïde
- 2) présence ou absence de corps en crête à l'avant du spermatozoïde
- 3) spermatozoïde avec microtubules corticaux hélicoïdaux ou parallèles à l'axe du spermatozoïde

- 4) type de spermiogenèse (I à IV)
- 5) présence ou absence dans le spermatozoïde d'une gaine périaxonémale
- 6) nombre d'axonèmes présents dans le spermatozoïde
- 7) présence ou absence de racines striées associées aux centrioles
- 8) présence ou absence de corps intercentriolaire
- 9) type d'organisation des microtubules corticaux

Enfin, tout récemment, des techniques immunocytochimiques ont été utilisées pour détecter les tubulines, composantes du cytosquelette microtubulaire des spermatozoïdes chez les Acoela, les Temnocephalidea, les Monogenea, les Digenea et les Eucestoda (*e. g.* Iomini *et al.*, 1995, 1997, 1998 ; Iomini & Justine, 1997 ; Mollaret & Justine, 1997 ; Raikova *et al.*, 1997, 1998 ; Iomini, 1998 ; Justine *et al.*, 1998 ; Justine, 1999 ; Raikova & Justine, 1999 ; Miquel & Marchand, 2001 ; González-Moreno, 2002).

1.2. État actuel des connaissances sur l'ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde des digènes et des cestodes

Actuellement, il existe plus de 250 études ultrastructurales sur la gamétogenèse des Plathelminthes parasites. La majeure partie de ces études porte sur le groupe des Eucestoda et en particulier sur l'ordre des Cyclophyllidea.

Ci-dessous, nous présentons une liste de l'ensemble des espèces de digènes et cestodes ayant fait l'objet d'une étude de leur spermiogenèse et/ou de leur spermatozoïde. Dans cette liste, nous associons les espèces que nous avons étudiées dans le cadre du présent travail (surlignées en gris).

Pour la classification systématique, nous nous sommes basés, pour le cas des digènes, sur les travaux de Skrjabin (1964), Yamaguti (1971), Schell (1985) et Gibson *et al.* (2001). Pour les cestodes, nous avons utilisé les traités de Schmidt (1986) et de Khalil *et al.* (1994).

Tableau I : Liste des espèces de digènes et de cestodes ayant fait l'objet d'une étude de leur spermio-genèse et/ou de leur spermatozoïde. Les espèces que nous avons étudiées au cours du présent travail sont surlignées en gris.

DIGÈNES	RÉFÉRENCES
Superfamille BRACHYLAIMOIDEA Joyeux et Foley, 1930	
Famille Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930	
Sous-famille Brachylaiminae Joyeux et Foley, 1930	
Genre <i>Postharmostomum</i> Witenberg, 1923	
<i>Postharmostomum gallinum</i> Witenberg, 1923	Liu <i>et al.</i> (1993) Chen & Lu (1994)
Genre <i>Brachylaima</i> Dujardin 1843	
<i>Brachylaima aequans</i> (Looss, 1899) (= <i>Brachylaemus aequans</i>)	Zdarska <i>et al.</i> (1991)
<i>Brachylaima mascomai</i> Gracenea et González-Moreno, 2002 (= <i>Brachylaima</i> sp.)	Ferrer <i>et al.</i> (2000) Gracenea <i>et al.</i> (2000) González-Moreno (2002)
Sous-famille Ityogoniminae Yamaguti, 1958	
Genre <i>Scaphiostomum</i> Braun, 1901	
<i>Scaphiostomum palaearticum</i> Mas-Coma, Esteban et Valero, 1986	Ndiaye <i>et al.</i> (2002)
Superfamille BUCEPHALOIDEA Poche, 1907	
Famille Bucephalidae Poche, 1907	
Sous-famille Bucephalinae Poche, 1907	
Genre <i>Prosorhynchoides</i> Dollfus, 1929	
<i>Prosorhynchoides gracilescens</i> (Rudolphi, 1819) (= <i>Bucephaloides gracilescens</i>)	Erwin & Halton (1983)
Genre <i>Pseudorhipidocotyle</i> Wang et Pan, 1964	
<i>Pseudorhipidocotyle elpichthys</i> Long et Lee, 1964	Tang <i>et al.</i> (1998)
Superfamille DICROCOELIOIDEA Faust, 1929	
Famille Dicrocoeliidae Odhner, 1910	
Sous-famille Dicrocoeliinae Looss, 1899	
Genre <i>Corrigia</i> Strom, 1940	
<i>Corrigia vitta</i> (Dujardin, 1845)	Robinson & Halton (1982)
Genre <i>Dicrocoelium</i> Dujardin, 1845	
<i>Dicrocoelium chinensis</i>	Tang (1996) Tang & Li (1996)
<i>Dicrocoelium dendriticum</i> (Rudolphi, 1819)	Morseth (1969) Cifrián <i>et al.</i> (1993)
Genre <i>Eurytrema</i> Looss, 1907	
<i>Eurytrema pancreaticum</i> (Janson, 1889)	Fujino <i>et al.</i> (1977)
Superfamille DIPLOSTOMOIDEA Poirier, 1886	
Famille Diplostomidae Poirier, 1886	
Sous-famille Alariinae Hall et Wigdor, 1918	
Genre <i>Pharyngostomoides</i> Harkema, 1942	
<i>Pharyngostomoides procyonis</i> Harkema, 1942	Grant <i>et al.</i> (1976)
Genre <i>Fibricola</i> Dubois, 1932	
<i>Fibricola seoulensis</i>	Sohn & Lee (1993)
Genre <i>Alaria</i> Schrank, 1788	
<i>Alaria arisaemoides</i> Augustine et Uribe, 1927	Hershenov <i>et al.</i> (1966)

- Alaria mustelae* Bosma, 1931
Famille Strigeidae Railliet, 1919
 Sous-famille Strigeinae Railliet, 1919
 Genre *Apatemon* Szidat, 1928
Apatemon graciliformis Szidat, 1928
 Hershenov *et al.* (1966)
 Justine (1985, 1995)
- Superfamille ECHINOSTOMATOIDEA Faust, 1929**
Famille Echinostomatidae Poche, 1926
 Sous-famille Echinostomatinae (Looss, 1899)
 Genre *Echinostoma* Rudolphi, 1809
Echinostoma caproni Richard, 1964
 Iomini & Justine (1997)
 Iomini (1998)
 Iomini *et al.* (1998)
 Justine *et al.* (1998)
 Justine (1999)
 Iomini *et al.* (1995)
 Justine (1985, 1995)
- Echinostoma liei*
Echinostoma togoensis Jourdane et Kulo, 1978
 Genre *Hypoderaeum* Dietz, 1909
Hypoderaeum conoideum (Bloch, 1782)
 Chen *et al.* (1996)
- Superfamille FASCIOLOIDEA Faust, 1929**
Famille Fasciolidae Railliet, 1895
 Genre *Fasciola* Linnaeus, 1758
Fasciola hepatica Linnaeus, 1758
 Gresson & Perry (1961)
 Stitt & Fairweather (1990, 1992)
 Stitt *et al.* (1991)
Fasciola gigantica Cobbold, 1856
 Ndiaye *et al.* (2003a, 2003b)
 Ndiaye *et al.* (2001, 2003c)
Fasciola sp.
 Gong *et al.* (1992)
- Superfamille GYMNOPHALLOIDEA Odhner, 1905**
Famille Fellodistomidae Nicoll, 1909
 Sous-famille Fellodistominae Nicoll, 1909
 Genre *Proctoeces* Odhner, 1911
Proctoeces maculatus (Looss, 1901)
 Justine (1985, 1995)
- Famille Gymnophallidae Morozov, 1955**
 Genre *Meiogymnophallus* Ching, 1965
Meiogymnophallus minutus (Cobbold, 1859)
 Davies (1975)
- Superfamille GORGODEROIDEA Odening, 1960**
Famille Gorgoderidae (Looss, 1899)
 Sous-famille Gorgoderinae Looss, 1899
 Genre *Gorgodera* Looss, 1899
Gorgodera amplicava Looss, 1899
Gorgodera sp.
 Hershenov *et al.* (1966)
 Iomini *et al.* (1995)
 Iomini (1998)
- Superfamille HAPLOPOROIDEA Mehra, 1961**
Famille Haploporidae Nicoll, 1914
 Sous-famille Haploporinae Dollfus, 1927
 Genre *Saccocoelioides* Szidat, 1954
Saccocoelioides godoyi Kohn et Froes, 1986
 Baptista-Farias *et al.* (2001)
- Superfamille HEMIUROIDEA Looss, 1899**
Famille Didymozoidae Poche, 1907
 Sous-famille Gonapodasmiinae Ishii, 1935
 Genre *Gonapodasmius* Ishii, 1935

<i>Gonopodasmius</i> sp. aff. <i>tomex</i> (Linton, 1907) (= <i>Gonopodasmius</i> sp.)	Justine (1981, 1983) Justine & Mattei (1982a, 1984a)
Sous-famille Didymozoinae (Ishii, 1935)	
Genre <i>Didymocystis</i> Ariola, 1902	
<i>Didymocystis wedli</i> Ariola, 1902	Pamplona-Basilio <i>et al.</i> (2001)
Genre <i>Didymozoon</i> Taschenberg, 1878	
<i>Didymozoon</i> sp.	Justine & Mattei (1983, 1984b)
Famille Sclerodistomidae Odhner, 1927	
Sous-famille Prosochiinae Yamaguti, 1934	
Genre <i>Prosochis</i> Yamaguti, 1934	
<i>Prosochis ghanensis</i> Fischthal et Thomas, 1972	Justine (1995)
Superfamille MICROPHALLOIDEA Morozov, 1955	
Famille Allassogonoporidae Odening, 1964	
Sous-famille Allassogonoporinae Skarbilovich, 1943	
Genre <i>Allassogonoporus</i> Olivier, 1938	
<i>Allassogonoporus amphoraeformis</i> (Mödlinger, 1930)	Podvyznaya (1996)
Famille Microphallidae (Ward, 1901)	
Sous-famille Microphallinae Ward, 1901	
Genre <i>Microphallus</i> Ward, 1901	
<i>Microphallus primas</i> (Jägerskiöld, 1908)	Castilho <i>et al.</i> (1986) Castilho & Barandela (1990) Davies (1975)
<i>Microphallus similis</i> (Jägerskiöld, 1900)	
Sous-famille Gynaecotylinae Guschanskaia, 1952	
Genre <i>Gynaecotyla</i> Yamaguti, 1939	
<i>Gynaecotyla adunca</i> (Linton, 1905) (= <i>Gynaecotyle adunca</i>)	Coil (1990)
Sous-famille Maritreminae (Nicoll, 1909)	
Genre <i>Maritrema</i> Nicoll, 1907	
<i>Maritrema linguilla</i> Jägerskiöld, 1908	Hendow & James (1988)
Famille Lecithodendriidae (Lühe, 1901) Odhner, 1910	
Sous-famille Ganeoninae Yamaguti, 1958	
Genre <i>Ganeo</i> Klein, 1905	
<i>Ganeo tigrinus</i> Mehra et Negi, 1928 (= <i>Ganeo tigrinum</i>)	Sharma & Rai (1995)
Sous-famille Prosthodendriinae Yamaguti, 1958	
Genre <i>Postorchigenes</i> Tubangui, 1928	
<i>Postorchigenes gymnesicus</i> Mas-Coma, Bargues et Esteban, 1981	Gracenea <i>et al.</i> (1997)
Sous-famille Pycnoporinae Yamaguti, 1958	
Genre <i>Pycnopus</i> Looss, 1899	
<i>Pycnopus magnopus</i>	Liu <i>et al.</i> (1993)
Superfamille NOTOCOTYLOIDEA La Rue, 1957	
Famille Notocotylidae La Rue, 1957	
Sous-famille Notocotylinae Kossack, 1911	
Genre <i>Notocotylus</i> Diesing, 1839	
<i>Notocotylus neyrai</i> González Castro, 1945	Ndiaye (2002a) Ndiaye <i>et al.</i> (2003d)
Genre <i>Quinqueserialis</i> (Skvortsov, 1935)	
<i>Quinqueserialis quinqueserialis</i> (Barker et Laughlin, 1911)	Wittrock (1976)
Superfamille OPECOELOIDEA Cable, 1956	
Famille Opecoelidae Ozaki, 1925	
Genre <i>Opecoeloides</i> Odhner, 1928	
<i>Opecoeloides furcatus</i> Odhner, 1928	Miquel & Marchand (2000a) Miquel <i>et al.</i> (2000a)

- Genre *Podocotyle* (Dujardin, 1845)
Podocotyle Gibson (1971)
- Superfamille OPISTHORCHIOIDEA Faust, 1929**
Famille Opisthorchiidae Braun, 1901
 Sous-famille Aphallinae Yamaguti, 1958
 Genre *Aphalloides* Dollfus, Chabaud et Golvan, 1957
Aphalloides coelomicola Dollfus, Chabaud et Golvan, 1957 Justine (1995)
 1957
 Sous-famille Opisthorchiinae Looss, 1899
 Genre *Clonorchis* Looss, 1907
Clonorchis sinensis (Cobbold, 1875) Jeong *et al.* (1976)
 Jeong & Rim (1984)
 Mehlhorn (1988)
 Huang *et al.* (1998, 1999)
- Sous-famille *Metorchiiinae* Lühe, 1909
 Genre *Metorchis* Looss, 1899
Metorchis orientalis Tanabe, 1920 (= *Metorchus orientalis*) Liu & Pan (1990)
- Famille Heterophyidae Odhner, 1914**
 Sous-famille Cryptocotylineae Lühe, 1909
 Genre *Cryptocotyle* Lühe, 1899
Cryptocotyle lingua (Creplin, 1825) Rees (1979)
- Sous-famille Metagoniminae Ciurea, 1924
 Genre *Metagonimus* Katsurada, 1913
Metagonimus yokogawai (Katsurada, 1912) Ahn *et al.* (1991)
- Famille Cryptogonimidae (Ward, 1917)**
 Sous-famille *Neochasminae* Van Cleave et Mueller, 1932
 Genre *Neochasmus* Van Cleave et Mueller, 1932
Neochasmus sp. Jamieson & Daddow (1982)
 Daddow & Jamieson (1983)
- Superfamille PARAMPHISTOMOIDEA (Stiles et Goldberger, 1910)**
Famille Gastrothylacidae Stiles et Goldberger, 1910
 Sous-famille Gastrothylacinae Stiles et Goldberger, 1910
 Genre *Fischoederius* Stiles et Goldberger, 1910
Fischoederius elongatus (Poirier, 1883) Liu *et al.* (1993)
- Famille Paramphistomidae Fischoeder, 1901**
 Sous-famille Paramphistominae Fischoeder, 1901
 Genre *Cotylophoron* Stiles et Goldberger, 1910
Cotylophoron cotylophorum (Fischoeder, 1901) Hershenov *et al.* (1966)
 (= *Cotylophorum cotylophorum*)
 Sous-famille Orthocoeliinae Price et McIntosh, 1953
 Genre *Orthocoelium* (Stiles et Goldberger, 1910)
Orthocoelium scoliocoelium (Fischoeder, 1904) Li & Wang (1997)
 (= *Ceylonocotyle scoliocoelium*)
- Superfamille PLAGIORCHIOIDEA Dollfus, 1930**
Famille Haematoloechidae Odening, 1964
 Genre *Haematoloechus* Looss, 1899
Haematoloechus medioplexus Stafford, 1902
Haematoloechus sp. Burton (1967, 1968, 1972)
 Burton & Silveira (1971)
 Shapiro *et al.* (1961)
 Justine & Mattei (1982b)
 Justine (1983, 1995)
 Iomini *et al.* (1995)

- Famille Mesocoeliidae Dollfus, 1933**
 Genre *Mesocoelium* Odhner, 1911
Mesocoelium monas (Rudolphi, 1819)
- Iomini (1998)
 Iomini *et al.* (1997)
 Iomini (1998)
- Superfamille SCHISTOSOMATOIDEA Stiles et Hassall, 1898**
Famille Schistosomatidae Stiles et Hassall, 1898
 Sous-famille Schistosomatinae Stiles et Hassall, 1898
 Genre *Schistosoma* Weinland, 1858
Schistosoma bovis (Sonsino, 1876)
- Schistosoma curassoni* (Brumpt, 1931)
Schistosoma intercalatum Fisher, 1934
Schistosoma japonicum Katsurada, 1904
- Schistosoma mansoni* Sambon, 1907
- Schistosoma margrebowieri* (Le Roux, 1933)
- Schistosoma mattheei* Veglia et Le Roux, 1929
Schistosoma rhodhaini Brumpt, 1931
Schistosoma spp.
- Sous-famille Bilharziellinae Price, 1929
 Genre *Trichobilharzia* Skrjabin et Zakharow, 1920
Trichobilharzia regenti Horak, Kolarova et Dvorak, 1998
- Famille Sanguinicolidae von Graff, 1907**
 Genre *Aporocotyle* Odhner, 1900
Aporocotyle simplex Odhner, 1900
Aporocotyle spinosicanalis Williams, 1958
- Famille Spirorchidae Stunkard, 1921**
 Genre *Spirorchis* MacCallum, 1919
Spirorchis sp.
- Justine (1980)
 Justine *et al.* (1993)
 Justine *et al.* (1993)
 Justine *et al.* (1993)
 Justine & Mattei (1981)
 Enriquez *et al.* (1989)
 Yang *et al.* (1998)
 Kitajima *et al.* (1976)
 Otubanjo (1980, 1981a, 1981b)
 Justine & Mattei (1981)
 Irie *et al.* (1983)
 Mehlhorn (1988)
 Justine *et al.* (1993)
 Justine & Mattei (1981)
 Awad & Probert (1989)
 Justine *et al.* (1993)
 Swiderski & Tsinonis (1986)
 Justine *et al.* (1993)
 Justine (1982, 1991c)
 Erasmus (1987)
 Jetton & Bogitsh (1987)
 Combes (1991)
- Justine (2001)
- Thulin (1981, 1982)
 Justine (1985, 1995)
- Justine (1985, 1995)
- Superfamille TROGLOTREMATOIDEA Faust, 1929**
Famille Paragonimidae Dollfus, 1939
 Genre *Paragonimus* Braun, 1899
Paragonimus miyazakii Kamo, Nishida, Hatsushika et Tomimura, 1961
Paragonimus ohirai Miyazaki, 1939
- Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878)
- Paragonimus* sp.
- Famille Collyriclidae Ward, 1917**
- Sato *et al.* (1967)
 Fujino *et al.* (1977)
 Orido (1988)
 Hirai & Tada (1991)
 Fujino & Ishii (1982)
 Zhao & Huang (1989)
 Mehlhorn (1988)

Genre *Collyricloides* Vaucher, 1969
Collyricloides massanae Vaucher, 1969

Justine (1985)

CESTODES

RÉFÉRENCES

Ordre GYROCOTYLIDEA Poche, 1926

Famille Gyrocotylidae Benham, 1901

Genre *Gyrocotyle* Diesing, 1850

Gyrocotyle parvispinosa van der Land et Dienske,
1968

Xylander (1986, 1989)

Gyrocotyle urna Grube et Wagener, 1852

Xylander (1986, 1989)

Ordre AMPHILINIDEA Poche, 1922

Famille Amphilinidae Claus, 1879

Genre *Amphilina* Wagener, 1858

Amphilina foliacea (Rudolphi, 1819)

Xylander (1986)

Amphilina japonica (Goto et Ishii, 1936)

Bazitov *et al.* (1979)

Famille Schizochoceridae Poche, 1922

Sous-famille Austramphilininae Johnston, 1931

Genre *Austramphilina* Johnston, 1931

Austramphilina elongata Johnston, 1931

Rohde & Watson (1986a, 1986b)
Rohde (1994)

Ordre CARYOPHYLLIDEA van Beneden in Carus, 1863

Famille Caryophyllaeidae Leuckart, 1878

Genre *Glaridacris* Cooper, 1920

Glaridacris catostomi Cooper, 1920

Euzet *et al.* (1981)
Swiderski (1986a, 2001)
Swiderski & Mackiewicz (1976,
2002)

Genre *Monobothrium* Diesing, 1863

Monobothrium wagneri Nybelin, 1922

Mehlhorn (1988)

Ordre SPATHEBOTRHIIDEA Wardle et McLeod, 1952

Famille Acrobothriidae Olsson, 1872

Genre *Bothrimonus* Duvernoy, 1842

Bothrimonus sturionis Duvernoy, 1842

MacKinnon & Burt (1984)

Ordre PSEUDOPHYLLIDEA Carus, 1863

Famille Bothriocephalidae Blanchard, 1849

Genre *Bothriocephalus* Rudolphi, 1808

Bothriocephalus clavibothrium Ariola, 1901

Swiderski & Mokhtar-Maamouri
(1980)
Euzet *et al.* (1981)

Famille Triaenophoridae Lönnberg, 1889

Genre *Eubothrium* Nybelin, 1920

Eubothrium crassum (Bloch, 1779)

Brunanska *et al.* (2001, 2002)

Famille Diphyllbothriidae Lühe, 1910

Genre *Duthiersia* Perrier, 1873

Duthiersia fimbriata (Diesing, 1850)

Justine (1986)

Genre *Diphyllbothrium* Cobbold, 1858

Diphyllbothrium latum (Linnaeus, 1758)

Bonsdorff & Telkkä (1965)

Ordre HAPLOBOTHRIDEA Joyeux et Baer, 1961

Famille Haplobothriidae Cooper, 1917

Genre *Haplobothrium* Cooper, 1914

Haplobothrium globuliforme Cooper, 1914

MacKinnon *et al.* (1983)

MacKinnon & Burt (1985)

Ordre DIPHYLLIDEA van Beneden in Carus, 1863

Famille Echinobothriidae Perrier, 1897

Genre *Echinobothrium* van Beneden, 1849

Echinobothrium affine Diesing, 1863

Euzet *et al.* (1981)

Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui (1984)

Azzouz-Draoui (1985)

Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri (1986/88)

Azzouz-Draoui (1985)

Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui (1984)

Azzouz-Draoui (1985)

Euzet *et al.* (1981)

Azzouz-Draoui (1985)

Echinobothrium brachysoma Pintner, 1889

Echinobothrium harfordi Mac Vicar, 1976

Echinobothrium typus van Beneden, 1849

Ordre TRYPANORHYNCHA Diesing, 1863

Super-famille Poecilacanthoidea Dollfus, 1942

Famille Lacistorhynchidae Guiart, 1927

Genre *Lacistorhynchus* Pintner, 1913

Lacistorhynchus tenuis (van Beneden, 1858)

Euzet *et al.* (1981)

Swiderski (1976a, 1994)

Ordre TETRAPHYLLIDEA Carus, 1863

Famille Onchobothriidae Braun, 1900

Genre *Onchobothrium* De Blainville, 1828

Onchobothrium uncinatum (Rudolphi, 1819)

Mokhtar-Maamouri & Swiderski (1975)

Genre *Acanthobothrium* van Beneden, 1849

Acanthobothrium benedeni Loennberg, 1889

(=*Acanthobothrium filicolle benedenii*)

Mokhtar-Maamouri & Swiderski (1975)

Euzet *et al.* (1981)

Swiderski (1986a)

Mokhtar-Maamouri (1976, 1980, 1982)

Acanthobothrium filicolle (Zschokke, 1887)

(=*Acanthobothrium filicolle filicolle*)

Famille Phyllobothriidae Braun, 1900

Sous-famille Echeneibothriinae de Beauchamp, 1905

Genre *Pseudoanthobothrium* Baer, 1956

Pseudoanthobothrium hanseni Baer, 1956

(=*Pseudanthobothrium hanseni*)

MacKinnon & Burt (1984)

Genre *Echeneibothrium* van Beneden, 1850

Echeneibothrium beauchampi Euzet, 1959

Mokhtar-Maamouri & Swiderski (1976)

Euzet *et al.* (1981)

Genre *Phyllobothrium* van Beneden, 1850

Phyllobothrium gracile Wedl, 1855

Mokhtar-Maamouri (1976, 1979)

Euzet *et al.* (1981)

Sène *et al.* (1998, 1999)

Phyllobothrium lactuca van Beneden, 1850

Sous-famille Triloculariinae Yamaguti, 1959

Genre *Trilocularia* Olsson, 1867

- Trilocularia acanthiaevulgaris* Olsson, 1867
Mahendrasingam *et al.* (1989)
- Ordre LECANICEPHALIDEA Wardle et McLeod, 1952**
Famille Tetranocephalidae Yamaguti, 1959
Genre *Tetranocephalum* Shipley et Hornell, 1905
Tetranocephalum sp. Justine (2001)
- Ordre PROTEOCEPHALIDEA Mola, 1928**
Famille Proteocephalidae La Rue, 1911
Sous-famille Proteocephalinae Mola, 1929
Genre *Proteocephalus* Weinland, 1858
Proteocephalus longicollis (Zeder, 1800)

Proteocephalus pollanicola Gresson, 1952
Proteocephalus torulosus (Batsch, 1786)

Sous-famille Gangesiinae Mola, 1929
Genre *Gangesia* Woodland, 1924
Gangesia parasiluri Yamaguti, 1934
Sous-famille Sandonellinae Khalil, 1960
Genre *Sandonella* Khalil, 1960
Sandonella sandoni (Lynsdale, 1960)
Famille Monticelliidae La Rue, 1911
Sous-famille Zygobothriinae Woodland, 1933
Genre *Nomimoscolex* Woodland, 1934
Nomimoscolex sp. Swiderski & Eklun-Natey (1978)
Euzet *et al.* (1981)
Swiderski (1985, 1996)
Gresson (1962)
Brunanska *et al.* (2003a, 2003b, 2003c)

Korneva & Davydov (2001)

Bâ & Marchand (1994f)
- Ordre NIPPOTAENIIDEA Yamaguti, 1939**
Famille Nippotaeniidae Yamaguti, 1939
Genre *Amurotaenia* Akhmerov, 1941
Amurotaenia decidua Hine, 1977
Sène *et al.* (1997)

Weekes (1987)
- Ordre TETRABOTHRIIDEA Baer, 1954**
Famille Tetrabothriidae Linton, 1891
Genre *Tetrabothrius* Rudolphi, 1819
Tetrabothrius erostris Loennberg, 1896
Stoitsova *et al.* (1995)
- Ordre CYCLOPHYLLIDEA van Beneden in Braun, 1900**
Famille Mesocestoididae Fuhrmann, 1907
Sous-famille Mesocestoidinae Lühe, 1894
Genre *Mesocestoides* Vaillant, 1863
Mesocestoides lineatus (Goeze, 1782)
Mesocestoides litteratus (Batsch, 1786)

Conn (2001)
Feliu *et al.* (1999)
Hidalgo (1999)
Hidalgo *et al.* (1999)
Miquel *et al.* (1999)
Miquel & Marchand (2000b, 2001)
- Famille Anoplocephalidae Cholodkovsky, 1902**
Sous-famille Anoplocephalinae Blanchard, 1891
Genre *Anoplocephaloides* Baer, 1923
Anoplocephaloides dentata (Galli-Valerio, 1905)

Genre *Aporina* Fuhrmann, 1902
Aporina delafondi (Railliet, 1892)
Genre *Sudarikovina* Spasskii, 1951
Sudarikovina taterae Hunkeler, 1972
Miquel & Marchand (1998a)
Miquel *et al.* (1998b, 2001)

Bâ & Marchand (1994d)

Bâ *et al.* (2000)

- Genre *Paranoplocephala* Lühe, 1910
Paranoplocephala omphalodes (Hermann, 1783) Miquel & Marchand (1998b)
Miquel *et al.* (2001)
- Genre *Monoecocestus* Beddard, 1914
Monoecocestus americanus (Stiles, 1895) MacKinnon & Burt (1984)
- Genre *Moniezia* Blanchard, 1891
Moniezia benedeni (Moniez, 1879) Bâ & Marchand (1992c)
Moniezia expansa (Rudolphi, 1810) Swiderski (1968)
Bâ & Marchand (1992c)
- Sous-famille Linstowiinae Fuhrmann, 1907
Genre *Oochoristica* Lühe, 1898
Oochoristica agamae Baylis, 1919 Swiderski & Subilia (1985)
- Genre *Mathevotaenia* Akhumyan, 1946
Mathevotaenia herpestis (Kofend, 1917) Bâ & Marchand (1994b, 1996b)
- Sous-famille Thysanosomatinae Skryabin, 1933
Genre *Avitellina* Gough, 1911
Avitellina centripunctata (Rivolta, 1874) Bâ & Marchand (1994a, 1994g)
- Genre *Stilesia* Railliet, 1893
Stilesia globipunctata (Rivolta, 1874) Bâ & Marchand (1992b)
- Genre *Thysaniezia* Skryabin, 1926
Thysaniezia ovilla (Rivolta, 1878) Bâ *et al.* (1991)
- Sous-famille Inermicapsiferinae López-Neyra, 1943
Genre *Inermicapsifer* Janicki, 1910
Inermicapsifer guineensis (Graham, 1908) Bâ & Marchand (1994a, 1994e)
Bâ *et al.* (1996)
Swiderski (1970)
Swiderski (1984a, 1984b)
Bâ & Marchand (1994a, 1994e)
- Inermicapsifer madagascariensis* (Davaine, 1870)
- Famille Catenotaeniidae Spasskii, 1950**
Sous-famille Catenotaeniinae Spasskii, 1949
Genre *Catenotaenia* Janicki, 1904
Catenotaenia pusilla (Goeze, 1782) Swiderski (1970)
Hidalgo (1999)
Torres *et al.* (1999)
Hidalgo *et al.* (2000)
- Sous-famille Skrjabinotaeniinae Genov et Tenora, 1979
Genre *Skrjabinotaenia* Akhumyan, 1946
Skrjabinotaenia lobata (Baer, 1925) Miquel *et al.* (1997a)
Torres *et al.* (1999)
- Famille Nematotaeniidae Lühe, 1910**
Genre *Cylindrotaenia* Jewell, 1916
Cylindrotaenia hickmani (Jones, 1985) Jones (1989, 1994b)
- Genre *Nematotaenia* Lühe, 1899
Nematotaenia chantalae Dollfus, 1957 Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui (1990)
- Famille Davaineidae Braun, 1900**
Sous-famille Davaineinae Braun, 1900
Genre *Raillietina* Fuhrmann, 1920
Raillietina carneostrobilata Vasilev, 1967 Polyakova-Krusteva & Vassilev (1973)
Bâ & Marchand (1994a, 1994c)
- Raillietina tunetensis* Joyeux et Houdemer, 1928 Bâ & Marchand (1994a, 1994c)
- Genre *Cotugnia* Diamare, 1893
Cotugnia polyacantha Fuhrmann, 1909 Bâ & Marchand (1994a)
- Famille Dilepididae Railliet et Henry, 1909**
Genre *Dilepis* Weinland, 1858
Dilepis undula (Schrank, 1788) Swiderski *et al.* (2000)

Genre <i>Molluscotaenia</i> Spasskii et Andreiko, 1971 <i>Molluscotaenia crassiscolex</i> (von Linstow, 1890)	Swiderski & Tkach (1996b)
Famille Dipylidiidae Stiles, 1896	
Genre <i>Dipylidium</i> Leuckart, 1863 <i>Dipylidium caninum</i> (Linnaeus, 1758)	Miquel & Marchand (1997) Miquel <i>et al.</i> (1997b, 1998a, 1998b)
Genre <i>Joyeuxiella</i> Fuhrmann, 1935	
<i>Joyeuxiella echinorhyncoides</i> (Sonsino, 1899)	Agostini <i>et al.</i> (2003) Ndiaye <i>et al.</i> (2003e)
<i>Joyeuxiella pasqualei</i> (Diamare, 1893)	Ndiaye <i>et al.</i> (2003e)
Famille Hymenolepididae (Ariola, 1899)	
Sous-famille Hymenolepidinae Perrier, 1897	
Genre <i>Monorcholepis</i> Oshmarin, 1961 <i>Monorcholepis dujardini</i> (Krabbe, 1869)	Swiderski & Tkach (1996a)
Genre <i>Diorchis</i> Clerc, 1903 <i>Diorchis parvogenitalis</i> Mathevossian, 1946	Chomicz & Swiderski (1992b)
Genre <i>Hymenolepis</i> Weinland, 1858 <i>Hymenolepis diminuta</i> (Rudolphi, 1819)	Rosario (1964) Lumsden (1965) Sun (1972) Swiderski (1976b) Kelsoe <i>et al.</i> (1977) Robinson & Bogitsh (1978) Coil (1991) Ndiaye (2002a)
<i>Hymenolepis sulcata</i> (von Linstow, 1879)	
Genre <i>Cladogynia</i> Baer, 1938 <i>Cladogynia guberiana</i> (Czaplinski, 1965) (= <i>Retinometra guberiana</i>)	Swiderski & Chomicz (1994)
<i>Cladogynia serrata</i> (Fuhrmann, 1906) (= <i>Retinometra serrata</i>)	Bâ & Marchand (1993)
Genre <i>Echinocotyle</i> Blanchard, 1891 <i>Echinocotyle dolosa</i> Joyeux et Baer, 1928	Bâ <i>et al.</i> (2002)
Genre <i>Dicranotaenia</i> Railliet, 1892 <i>Dicranotaenia coronula</i> (Dujardin, 1845)	Chomicz & Swiderski (1992a)
Genre <i>Rodentolepis</i> Spasskii, 1954 <i>Rodentolepis fraterna</i> (Stiles, 1906) <i>Rodentolepis microstoma</i> (Dujardin, 1845) (= <i>Hymenolepis microstoma</i> , <i>Vampirolepis microstoma</i>)	Ndiaye (2002a) Swiderski (1970, 1986a) Euzet <i>et al.</i> (1981) Bâ & Marchand (1998) Ndiaye (2002a)
<i>Rodentolepis myoxi</i> (Rudolphi, 1819) <i>Rodentolepis nana</i> (Siebold, 1852) (= <i>Hymenolepis nana</i>)	Rosario (1964) Mehlhorn (1988) Abouzakham <i>et al.</i> (1990) Bâ & Marchand (1992a) Bâ & Marchand (1996a) Ndiaye (2002a) Ndiaye (2002a)
<i>Rodentolepis straminea</i> (Goeze, 1782) (= <i>Hymenolepis straminea</i>) <i>Rodentolepis</i> sp.	
Famille Taeniidae Ludwig, 1886	
Sous-famille Taeniinae Stiles, 1896	
Genre <i>Taenia</i> Linnaeus, 1758 <i>Taenia hydatigena</i> Pallas, 1766 <i>Taenia mustelae</i> Gmelin, 1790	Featherston (1971) Hidalgo (1999) Miquel <i>et al.</i> (2000b, 2000c)
<i>Taenia parva</i> Baer, 1926	Ndiaye (2002b) Ndiaye <i>et al.</i> (2003f)
<i>Taenia pisiformis</i> (Bloch, 1780) <i>Taenia saginata</i> (Goeze, 1782)	Tian <i>et al.</i> (1998a, 1998b) Tian <i>et al.</i> (1998a, 1998b)

Taenia solium Linnaeus, 1758
Sous-famille Echinococcinae Abuladze, 1960
Genre *Echinococcus* Rudolphi, 1801
Echinococcus granulosus (Batsch, 1786)
Echinococcus multilocularis Leuckart, 1863

Tian *et al.* (1998a, 1998b)

Morseth (1969)
Barret & Smyth (1983)
Shi *et al.* (1994)

1.3. La tubuline : élément essentiel du cytosquelette des spermatozoïdes

Le spermatozoïde des Plathelminthes, en plus de son intérêt en tant que cellule très spécialisée et de marqueur de la phylogenèse, est un modèle pour l'étude des systèmes microtubulaires stables.

Les microtubules sont des organites cellulaires dont la découverte est entièrement due à la microscopie électronique. Ce sont des formations cylindriques creuses d'environ 25 nm de diamètre et de longueur très variable allant de quelques nanomètres à plusieurs centimètres. Les microtubules constituent une part importante du cytosquelette intervenant dans de nombreuses fonctions cellulaires. C'est ainsi qu'ils participent à la mobilité générale de la cellule, à celle de ses cils ou flagelles, à la différenciation morphologique, à la division cellulaire, au maintien de la forme des cellules et aux différents transports intracellulaires.

La tubuline, protéine composée de deux sous unités α et β , est la principale composante des microtubules (Dustin, 1984 ; Maillet, 1985 ; Ludueña, 1993 ; Hyams & Lloyd, 1994). Les molécules de tubuline α et β sont disposées autour de l'axe du microtubule pour former des protofilaments polarisés et parallèles. Ils constituent la paroi du microtubule. Dans beaucoup de cellules eucaryotes, les tubulines α et β existent sous différentes isoformes. Cette diversité est déterminée non seulement par la présence de différents isotopes de α et β codés par de petites familles multigéniques, mais également par des modifications post-traductionnelles du produit génique primaire. Ces deux phénomènes ont comme conséquence directe d'augmenter la diversité biochimique des microtubules et donc de générer des sous-populations microtubulaires hétérogènes. La tubuline est une protéine très ancienne dont l'apparition remonterait à celle des cellules eucaryotes il y a 1,5 milliard d'années (Burns & Surrige, 1994). Une origine si ancienne pourrait avoir comme conséquence que la tubuline provenant d'organismes différents présente des taux de divergence importants. Cela est vrai pour la portion C-terminale de la molécule. Cette région est également très variable si on compare les différentes isoformes de tubuline à l'intérieur du même organisme. C'est la partie la plus acide de la molécule, à laquelle la plupart des protéines associées se lient. En revanche, la partie N-terminale est remarquablement conservée (Little & Seehaus, 1988 ; Burns, 1991). La conservation de la molécule de tubuline permet, en particulier, d'utiliser des anticorps

produits contre la tubuline d'une espèce pour reconnaître la tubuline d'autres espèces (Adoutte *et al.*, 1985). D'où son intérêt pour les études phylogéniques.

1.4. Objectifs de l'étude

Suite à l'analyse des données actuelles sur l'ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde, nous avons adopté une stratégie de travail qui s'explique par le choix de notre matériel d'étude. Ainsi, nous avons essayé d'apporter, dans la mesure du possible, d'une part des informations nouvelles chez des groupes où les données sont absentes ou très peu nombreuses (Notocotylidae, Fasciolidae) et d'autre part, d'apporter des données complémentaires chez des groupes où des études existent déjà (Brachylaimidae, Taeniidae, Dipylidiidae). Notre but est de disposer, pour la phylogénie, de davantage de précisions sur les caractères ultrastructuraux de la spermiogenèse et du spermatozoïde.

Chez les digènes, la possibilité de disposer d'échantillons des deux espèces du genre *Fasciola* (*F. hepatica* et *F. gigantica*) nous a particulièrement intéressé. Pour ces espèces, non seulement il était possible d'effectuer une étude comparative de l'ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde, mais également d'étudier le spermatozoïde de *F. hepatica* récolté chez un hôte exceptionnel, le rat noir *Rattus rattus*. Ce rat est un réservoir naturel du parasite en Corse. Les spécimens de *F. hepatica* que nous avons étudiés ont été capturés sur la côte occidentale de la Corse, à l'embouchure du Fango. Mas-Coma *et al.* (1988) ont montré que les rongeurs *Rattus rattus* et *Mus musculus* sont en Corse des hôtes définitifs pour *F. hepatica*. Depuis, des missions périodiques de captures de rongeurs sont organisées dans cette région. Les rats capturés sont gardés à l'animalerie du Centre d'Écologie Terrestre du Mas de la Serre (Laboratoire Arago de Banyuls-sur-Mer, Université de Paris VI). Ceci a permis de garder vivants des rongeurs parasités jusqu'au moment de la réalisation des études. Ainsi, nous avons pu disposer des spermatozoïdes vivants de *F. hepatica* d'une part pour les études aux microscopes électroniques à balayage et à transmission et d'autre part pour les études immunocytochimiques de la tubuline.

L'étude de *Scaphiostomum palaearticum*, parasite endémique des îles Baléares, nous paraît important, en raison de la rareté de données sur l'ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde dans la famille des Brachylaimidae. Pour cette famille, des études détaillées existent seulement pour le genre *Brachylaima*, de la sous-famille des Brachylaiminae. Avec le présent travail, nous pensons contribuer à une meilleure connaissance de ce groupe en étudiant un deuxième genre : *Scaphiostomum*, de la sous-famille des Ityogoniminae.

Pour *Notocotylus neyrai*, notre étude est la première effectuée pour la famille des Notocotylidae.

Chez les cestodes, nous nous sommes proposé d'étudier les genres : *Joyeuxiella* (Cyclophyllidea, Dipylidiidae) et *Taenia* (Cyclophyllidea, Taeniidae). La famille des Dipylidiidae comprend seulement trois genres : *Dipylidium*, *Diplopylidium* et *Joyeuxiella*. Pour le moment, des données existent seulement pour le genre *Dipylidium*. Ainsi, la possibilité d'étudier deux des trois espèces du genre *Joyeuxiella* (*J. echinorhyncoides* et *J. pasqualei*) permettra aussi une meilleure connaissance de l'ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde pour cette famille. Par ailleurs, il nous a semblé utile de disposer de davantage de données pour cette famille, surtout pour la détermination de son modèle spermiogénétique. La situation est pratiquement identique au niveau de la famille des Taeniidae où de rares études portent seulement sur le spermatozoïde de *Taenia hydatigena*, *T. mustelae*, *Echinococcus granulosus* et *E. multilocularis*.

Ainsi, les objectifs que nous nous sommes fixés en réalisant ce travail sont les suivants:

- contribuer à la connaissance de la gamétogenèse de différents Plathelminthes (trématodes et cestodes) par la description de l'ultrastructure de leur spermiogenèse et de leur spermatozoïde,
- établir le modèle général de la spermiogenèse et l'ultrastructure du spermatozoïde pour les familles des Fasciolidae, Dipylidiidae et Taeniidae,
- analyser l'intérêt taxonomique et phylogénique de divers caractères ultrastructuraux du gamète mâle chez les Plathelminthes parasites, en particulier pour les groupes objets de notre étude,
- localiser et déterminer la nature de la tubuline et ses diverses modifications post-traductionnelles au niveau du cytosquelette du spermatozoïde de *Fasciola hepatica*.

2. Matériel et Méthodes

Dans ce chapitre, nous présentons une description des Plathelminthes objets de notre étude ainsi que les différentes techniques utilisées pour l'étude de la spermatogenèse de ces parasites en microscopie électronique.

2. 1. Matériel d'études

Pour notre matériel d'étude, nous présentons les différentes espèces de Plathelminthes parasites étudiées, mais faisons abstraction de l'étude détaillée des mammifères hôtes. Ainsi, pour chacune des espèces de parasites étudiées, nous présentons quelques aspects liés à la systématique, la morphologie, la biogéographie et le cycle biologique. Nous avons également déterminé l'hôte, le microhabitat (ou localisation) des parasites dans leurs hôtes et le lieu de capture (ou localité) pour chaque espèce hôte.

2. 1. 1. Trématodes étudiées

2. 1. 1. 1. *Scaphiostomum palaearticum* Mas-Coma, Esteban et Valero, 1986

Hôte : *Mus spretus* (Rodentia, Muridae)

Localisation dans l'hôte : canaux pancréatiques

Provenance géographique : Petra, île de Majorque (Espagne)

Systématique

Embranchement Plathelminthes

Classe Trematoda Rudolphi, 1808

Sous-classe Digenea van Beneden, 1858

Ordre Strigeida (La Rue, 1926)

Superfamille Brachylaimoidea Joyeux et Foley, 1930

Famille Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930

Sous-famille Ityogoniminae Yamaguti, 1958

Genre *Scaphiostomum* Braun, 1901

Scaphiostomum palaearticum Mas-Coma, Esteban et Valero 1986

Selon Mas-Coma & Gállego (1975), la famille des Brachylaimidae Joyeux et Foley, 1930 comprend trois sous-familles : Brachylaiminae Joyeux et Foley, 1930, Ityogoniminae Yamaguti, 1958 et Panopistinae Yamaguti, 1958. Dans la sous-famille des Brachylaiminae,

seuls deux genres sont reconnus : *Brachylaima* Dujardin, 1843 et *Scaphiostomum* Braun, 1901. Cependant, de récents travaux de Gibson *et al.* (2001) placent le genre *Scaphiostomum* dans la sous-famille des Ityogoniminae.

Dans le genre *Scaphiostomum*, quatre espèces sont actuellement connues : *S. illatabile* Braun, 1901 récoltée chez des oiseaux sud américains, *S. pancreaticum* McIntosh, 1934 et *S. microti* (Kruidemier et Gallicchio, 1959), toutes deux récoltées chez des rongeurs nord américains et *S. palaearticum* Mas-Coma, Esteban et Valero, 1986 trouvé chez des rongeurs des îles Baléares (Espagne) (Mas-Coma *et al.*, 1986). Pour ces auteurs, *Scaphiostomum* sp. récoltée par Lim chez des rongeurs de la Malaisie serait une espèce nouvelle.

Morphologie

Scaphiostomum palaearticum est caractérisée par un pléomorphisme très évident (Figure 2 A- C). Chez certains individus, le corps se présente sous forme d'un long cylindre avec des bords plus ou moins parallèles et qui se rétrécit légèrement près de ses deux extrémités arrondies. Chez d'autres, il est long, avec une largeur maximum au niveau de la région post-acétabulaire, généralement située au niveau de l'extrémité antérieure des champs vitellins, et se rétrécit progressivement vers l'extrémité postérieure. La longueur du corps est comprise entre 4 683 et 13 034 μm (moyenne 8 385 μm) et sa largeur entre 531 et 1 269 μm (moyenne 836 μm). Le tégument est lisse. La bouche, en position ventrale sub-terminale, est ovale ou circulaire. L'acetabulum, circulaire, est en position médiane, proche de l'extrémité antérieure du corps. Il est toujours plus petit que la bouche. Le pharynx est bien développé. L'œsophage est pratiquement inexistant, donnant immédiatement la bifurcation intestinale. Les deux caeca intestinaux, légèrement sinueux, s'étendent plus ou moins parallèlement à la paroi du corps et se terminent dans le champ post-testiculaire, proche de l'extrémité postérieure du corps. Le pore génital, ventral, s'ouvre aux environs de la région moyenne du premier testicule. Les testicules sont situés dans la région terminale du corps (Figure 2 A-C et F). Ils ont une forme subsphérique à plus ou moins ovale. Le premier testicule, antérieur à l'ovaire, est plus petit que le second. Le deuxième, post-ovarien, est situé sur le même axe que les autres gonades. De chaque testicule part un canal efférent. Les deux canaux efférents se réunissent par la suite pour donner un canal déférent relativement long, enroulé et dilaté. Ce canal déférent passe par une petite vésicule séminale externe avant d'atteindre la poche du cirre. L'ovaire, de forme ovale à subsphérique, se trouve entre les deux testicules, mais plus proche du premier (Figure 2 D). Le système excréteur est de type « stenostoma » comme chez les autres espèces de la famille Brachylaimidae. Le pore excréteur est en position terminale (Mas-Coma *et al.*, 1986).

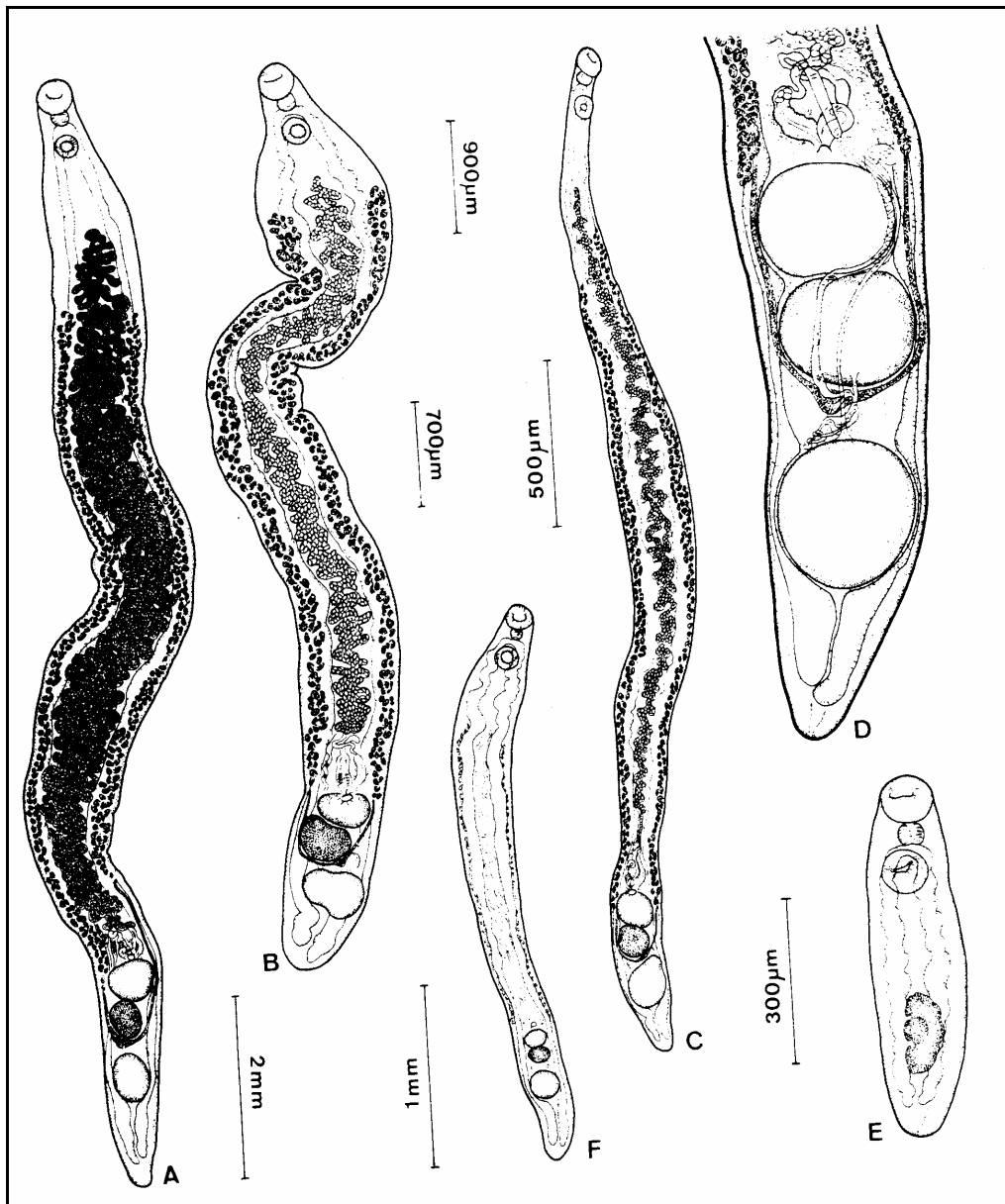


Figure 2 : *Scaphiostomum palaearticum* : (A) spécimen adulte extrait de *Apodemus sylvaticus*, en vue ventrale ; (B, C) spécimens adultes extraits de *Mus spretus*, en vue ventrale ; (D) région postérieure montrant le système reproducteur, en vue dorsale ; (E) petit spécimen immature rencontré chez *M. spretus* ne montrant pas de différenciation de structures sexuelles, en vue ventrale ; (F) jeune spécimen non gravide rencontré chez *M. spretus* et montrant des structures sexuelles différenciées, en vue ventrale. Barres – A : 2 mm ; B : 1 mm ; C : 900 µm ; D : 500 µm ; E : 300 µm ; F : 700 µm. Extrait de Mas-Coma *et al.* (1986).

Biogéographie

A l'état actuel des connaissances, il existe très peu de données concernant la répartition biogéographique de *S. palaearticum*. Pour le moment, sa présence est signalée seulement dans la région méditerranéenne, précisément au niveau des îles Baléares (Majorque et Minorque, Espagne) où il parasite les rongeurs Muridae *Apodemus sylvaticus* et *Mus spretus*

(Esteban, 1983 ; Mas-Coma *et al.*, 1986, 1987a). Il s'agit du matériel qui a servi à sa description originelle. Ainsi, *S. palaearticum* semble être un cas d'endémisme des îles Baléares.

Cycle biologique

Selon Esteban (1983), *S. palaearticum* est un parasite trihétéroxène. Dans son cycle biologique, des gastéropodes pulmonés jouent le rôle de premier et second hôtes intermédiaires, comme c'est le cas chez les autres espèces du même genre dont les cycles biologiques sont connus : *S. microti* (Bristol & Canaris, 1973, 1977 ; Redetzke & Canaris, 1977 ; Mayberry *et al.*, 1981) et *S. pancreaticum* (Jensen, 1972).

2. 1. 1. 2. *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 et *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856

Hôtes :

- *Fasciola hepatica* : *Bos taurus* (Artiodactyla, Bovidae) et *Rattus rattus* (Rodentia, Muridae)
- *Fasciola gigantica* : *Bos indicus* (Artiodactyla, Bovidae)

Localisation dans l'hôte : Foie

Provenance géographique :

- *Fasciola hepatica* : *Bos taurus* : Cerdagne (Catalogne, Espagne)
Rattus rattus : Embouchure du Fango (Corse, France) (Figures 6 et 7)
- *Fasciola gigantica* : *Bos indicus* : Abattoir de Dakar (SERAS), Sénégal.

Systematique

Embranchement Plathelminthes
Classe Trematoda Rudolphi, 1808
Sous-classe Digenea van Beneden, 1858
Ordre Echinostomatida Faust, 1929
Superfamille Fascioloidea Faust, 1929
Famille Fasciolidae Railliet, 1895
Sous-famille Fasciolinae Stiles et Hassall, 1898
Genre *Fasciola* Linnaeus, 1758
Fasciola hepatica Linnaeus, 1758
Fasciola gigantica Cobbold, 1856

Les espèces du genre *Fasciola* Linnaeus, 1758, parasites du système hépatobiliaire de mammifères herbivores, se distinguent des autres trématodes par la morphologie de leur extrémité apicale en forme de cône, par la taille et par la disposition de leurs glandes vitellogènes sur les côtés dorsal et ventral. L'espèce type : *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 se distingue par ses écailles cuticulaires qui sont libres sur plusieurs parties du corps. Les surfaces dorsale et ventrale de la région postérieure du corps sont dépourvues d'écailles. Sa taille varie entre 2 et 3 cm. Quant à l'espèce *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856, elle se distingue par son corps de forme allongée, non sphérique et par la présence d'écailles de plus grande taille. La longueur des individus adultes varie entre 6 et 12 cm (Skrjabin, 1964 ; Yamaguti, 1971 ; Schell, 1985).

Morphologie

Les espèces du genre *Fasciola*, communément appelées grandes douves du foie (Figure 3), sont parmi les plus grands trématodes connus. Les exemplaires les plus grands peuvent atteindre plus de 10 cm de long. *Fasciola hepatica* et *F. gigantica* sont les agents responsables de la fasciolose ou distomatose hépatobiliaire, maladie présente respectivement au niveau des régions tempérées et tropicales. Ce sont des parasites du foie et de la vésicule biliaire du bétail, de grands mammifères herbivores et de l'Homme.

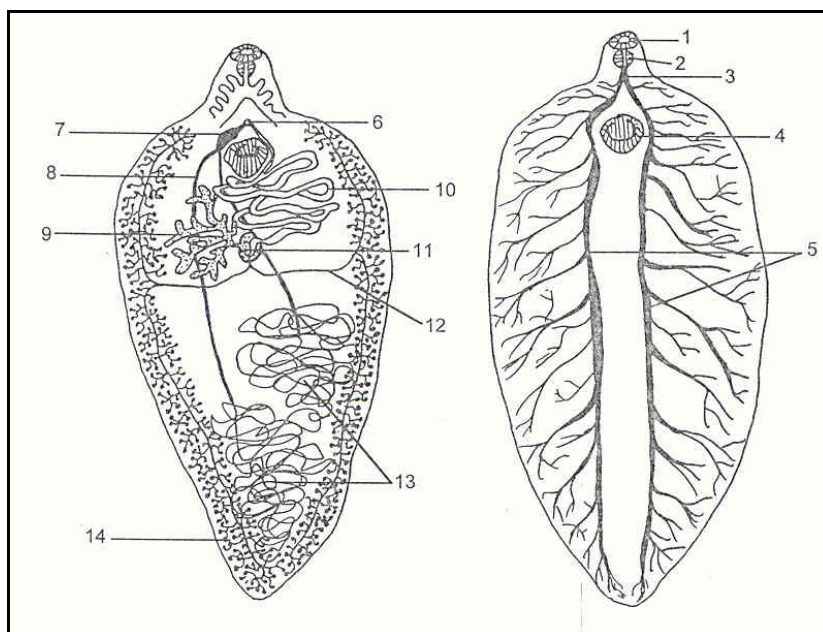


Figure 3 : Organisation générale d'un adulte de *Fasciola* spp. 1 : ventouse buccale, 2 : pharynx, 3 : œsophage, 4 : acetabulum, 5 : caeca intestinaux, 6 : pore génital, 7 : poche du cirre, 8 : canal déférent, 9 : ovaire, 10 : utérus, 11 : ootype, 12 : vitelloducte, 13 : testicules, 14 : glandes vitellogènes. Extrait de Dalton (1999).

Leur tégument est recouvert de petites écailles. Les ventouses (la ventouse buccale et l'acetabulum) sont proches l'une de l'autre et l'extrémité antérieure se présente souvent comme une extension conique. Les caeca intestinaux s'étendent jusqu'à l'extrémité postérieure du corps et présentent plusieurs ramifications (Figure 3). Le pore génital est situé juste en avant de l'acetabulum. Les adultes matures se caractérisent par une forte présence de glandes vitellogènes qui occupent une bonne partie du corps : elles sont disposées sur les bords latéraux du corps du trématode et s'étendent jusque dans la région postérieure. Ces glandes sont dispersées et drainées par des vitelloductes, qui se rejoignent avant d'atteindre l'ootype. L'appareil génital mâle présente deux testicules ramifiés et drainés chacun par un canal déférent qui aboutit dans un organe copulateur musculueux et exertile, le cirre. L'ovaire ramifié, se situe latéralement (à droite) en avant des testicules. L'utérus est situé dans la partie antérieure du corps.

Biogéographie

La fasciolose, infection causée par *F. hepatica* et *F. gigantica*, est signalée dans de nombreuses régions du monde (Europe, Amérique, Asie, Afrique et Océanie) (Figure 4). *Fasciola hepatica* a une distribution cosmopolite. Tandis que *F. gigantica* est limité particulièrement aux tropiques, avec une présence plus marquée en Afrique, au centre et à l'est de l'Europe et sur le continent asiatique. Il est également signalé au sud des Etats-Unis et à Hawaï (Soulsby, 1982 ; Radostits *et al.*, 1994 ; Urquhart *et al.*, 1996). Sur le continent africain, très peu de cas de fasciolose liés à *F. hepatica* sont signalés (Dalton, 1999). Sur ce continent, l'infestation est surtout causée par *F. gigantica*. Dans certaines régions, la prévalence de la maladie chez les ruminants est de l'ordre de 80 à 100 %. Elle affecte particulièrement le bétail et certains grands mammifères herbivores (cheval, buffle, cerf, etc.). Sur le continent africain, Hammond (1972) a signalé l'infestation sur 16 espèces de mammifères sauvages.

Des cas humains sont également rapportés sur l'ensemble des continents et la prévalence ne cesse d'augmenter depuis 1980 (Chen & Mott, 1990 ; Esteban *et al.*, 1998 ; Mas-Coma *et al.*, 1999).

Actuellement, d'importantes données concernant la fasciolose sont disponibles grâce au développement des Systèmes d'Informations Géographiques (SIG) (Malone *et al.*, 1998 ; Fuentes *et al.*, 1999 ; etc.).

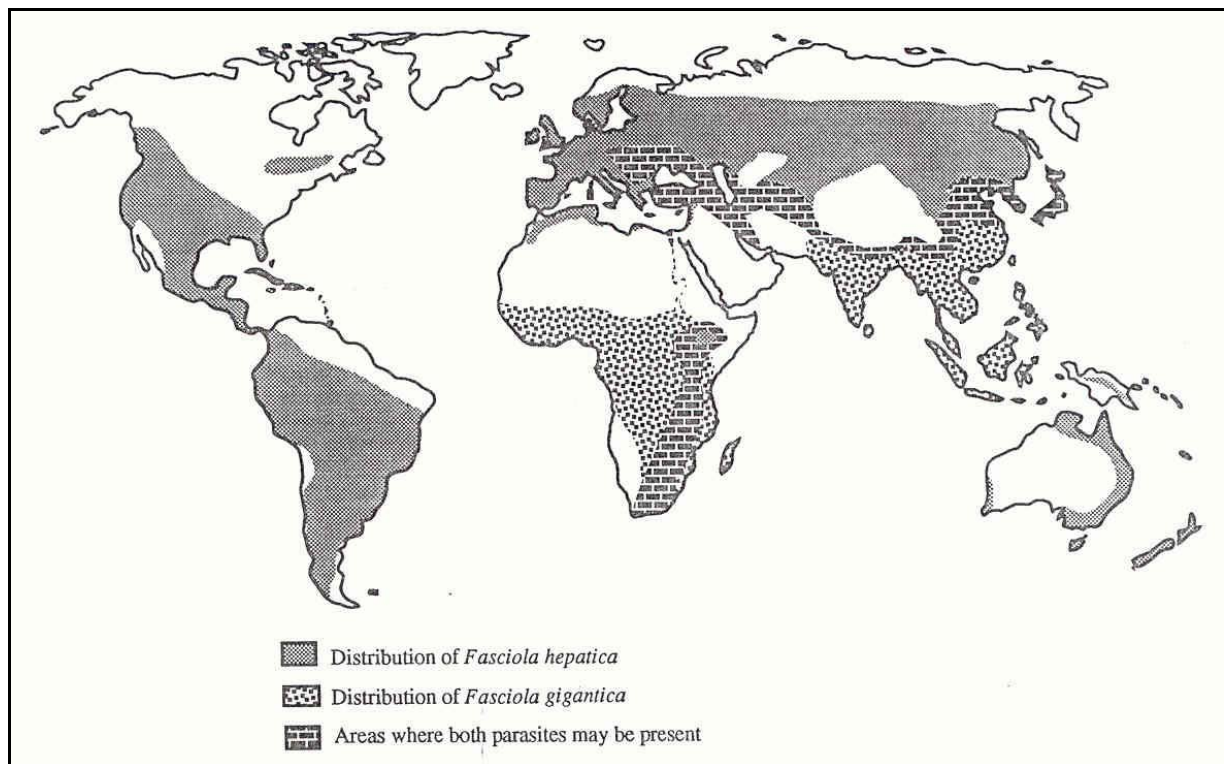


Figure 4 : Distribution géographique de *F. hepatica* et *F. gigantica*. Extrait de Dalton (1999).

Cycle biologique

En l'état actuel des connaissances, *F. hepatica* et *F. gigantica* présentent des cycles de développement très similaires. Des différences apparaissent particulièrement au niveau des hôtes intermédiaires qui sont des gastéropodes dans les deux cas mais d'espèces différentes (généralement *Lymnaea truncatula* pour *F. hepatica* et *L. natalensis* pour *F. gigantica*). Dans ce cycle on peut distinguer six phases (Figure 5) :

- (i) Le cycle commence par l'élimination dans le milieu extérieur des œufs fécondés mais non embryonnés du parasite avec les excréments de l'hôte définitif vers par le biais des excréments. Ces œufs sont pondus dans la vésicule biliaire ou les canaux hépatiques de l'hôte. Ils présentent un opercule.
- (ii) Développement embryonnaire des œufs dans le milieu extérieur pour donner les miracidia ciliés. Cette phase peut durer deux à trois semaines.
- (iii) Miracidium libre dans l'eau pendant quelques heures à la recherche d'un hôte intermédiaire. Le miracidium peut rester en vie libre dans l'eau pendant 24 heures.
- (iv) Développement et multiplication du miracidium dans l'hôte intermédiaire.
- (v) Production de cercaires qui quittent généralement l'hôte intermédiaire la nuit pour se fixer sur les plantes aquatiques.
- (vi) Infestation de l'hôte définitif par ingestion de métacercaires contenues dans l'eau ou fixées sur les plantes aquatiques sous forme de douves juvéniles enkystées. Les

métacercaires poursuivent leur développement dans l'organisme de l'hôte définitif pour donner les adultes (Wilford Olsen, 1974 ; Dalton, 1999).

Dans le cas de *F. hepatica*, les micromammifères *Rattus rattus* et *Mus musculus* (Rodentia : Muridae) ont été signalés comme hôtes définitifs jouant ainsi un rôle important de réservoir de la fasciolose au niveau de l'île de Corse (France) (Mas-Coma *et al.*, 1987b, 1988, 1999 ; Pascual *et al.*, 1990 ; Valero *et al.*, 1996).

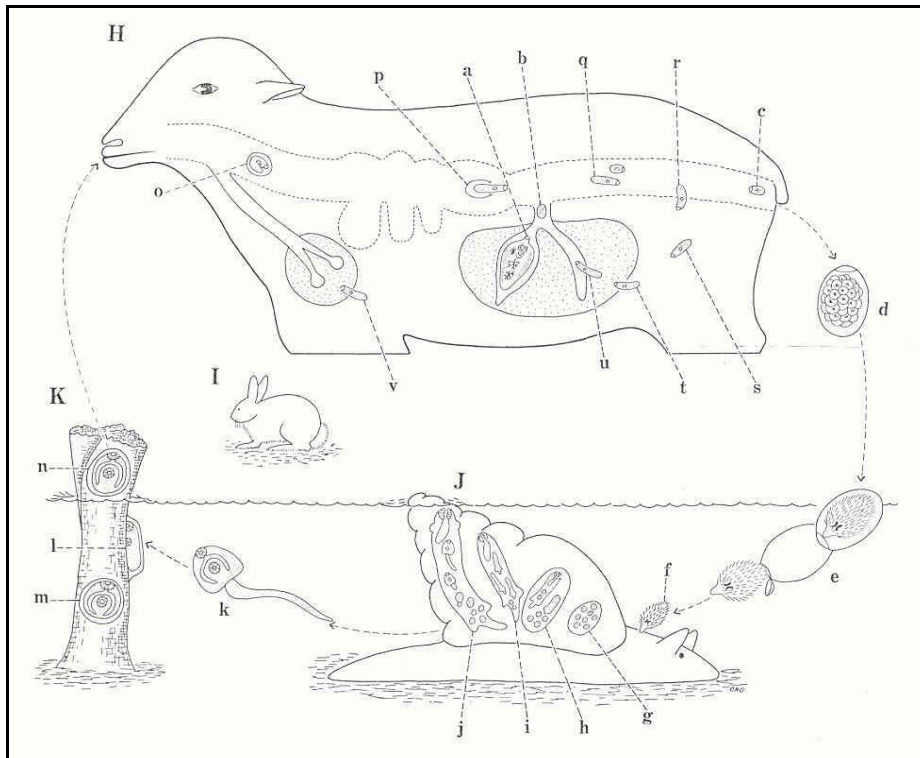


Figure 5 : Cycle biologique de *Fasciola* spp. H : hôte définitif, I : Lièvre, réservoir du parasite dans certains cas, J : Gastéropode, hôte intermédiaire, K : métacercaire au niveau de la végétation. a : individu adulte dans les canaux hépatobiliaires de l'hôte définitif, b : œuf pondu dans la vésicule biliaire ou les canaux hépatiques de l'hôte, c : œuf dans l'intestin, d : œuf évacué dans le milieu extérieur avec les fèces, e : développement de l'œuf dans l'eau et libération d'un miracidium cilié, f : pénétration du miracidium dans le gastéropode, g : transformation du miracidium en sporocyste, h : sporocyste mature contenant la rédie fille i : production d'une première génération de rédies, j : seconde génération de rédies, k : cercaire libre dans l'eau, l : vue latérale de la cercaire enkystée sur une plante aquatique, m : vue dorsale d'une métacercaire immergée, n : métacercaire vers la partie supérieure de la plante et située hors de l'eau, o : infestation de l'hôte définitif par ingestion des métacercaires soit en buvant soit en mangeant la plante aquatique, p, q, r, s, t, u : jeunes individus de *Fasciola*. Extrait de Wilford Olsen (1974).



Figure 6 : Embouchure du Fango (Galéria, Corse).

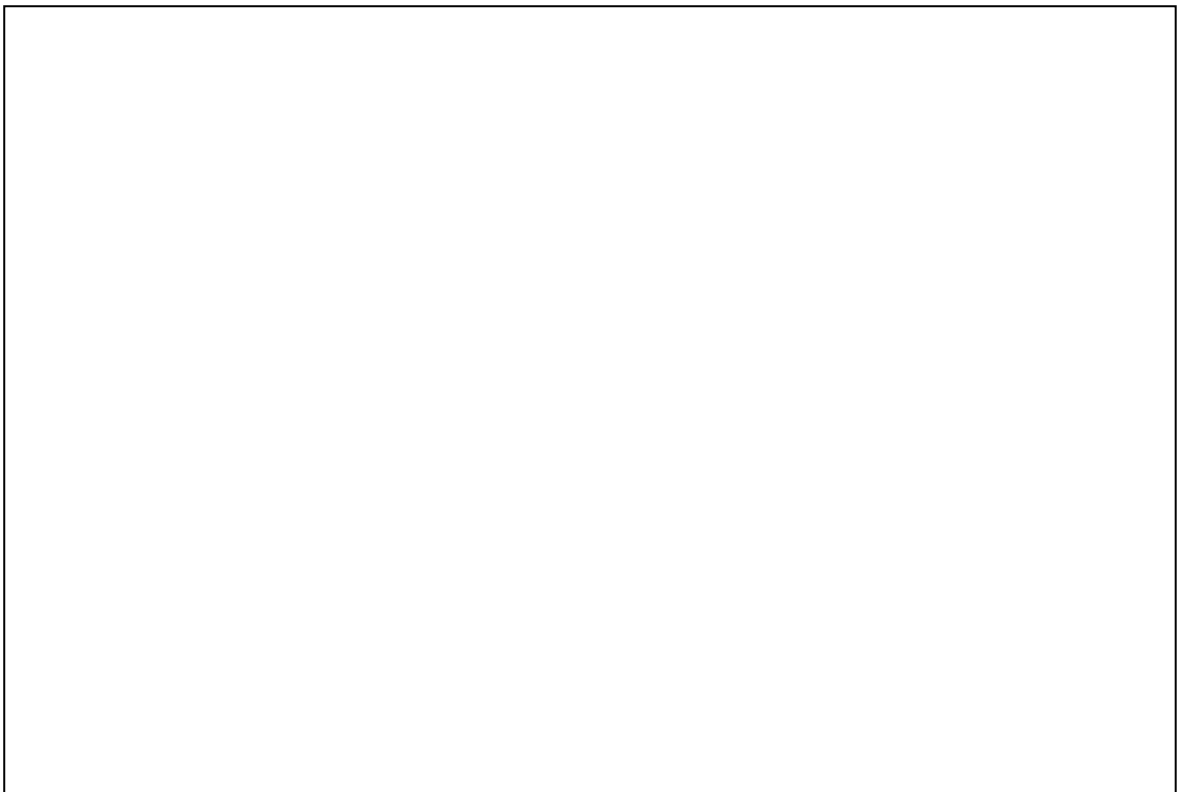


Figure 7 : Embouchure du Fango (Galéria, Corse).

2. 1. 1. 3. *Notocotylus neyrai* González Castro, 1945

Hôte : *Microtus agrestis* (Rodentia, Arvicolidae)

Localisation dans l'hôte : intestin, cæcum

Provenance géographique : Val d'Arties (Lerida, Espagne)

Systematique

Embranchement Plathelminthes

Classe Trematoda Rudolphi, 1808

Sous-classe Digenea van Beneden, 1858

Ordre Echinostomatida La Rue, 1957

Superfamille Notocotyloidea La Rue, 1957

Famille Notocotylidae (Lühe, 1909)

Sous-famille Notocotylinæ Kossack, 1911

Genre *Notocotylus* Diesing, 1839

Notocotylus neyrai González Castro, 1945

Après la description originale de *Notocotylus neyrai* González Castro, 1945, il y a eu une grande confusion concernant la systématique de ce digène. Plusieurs auteurs, en particulier Dubois (1951), Odenning (1964, 1966), Odenning & Bockhardt (1965) et Yamaguti (1971, 1975), considéraient cette espèce comme étant synonyme de *Notocotylus noyeri* (Joyeux, 1922). Ce problème fût résolu par le travail de Simón-Vicente *et al.* (1985a). González Castro (1945) décrit les principales différences entre *N. neyrai* et *N. noyeri* comme étant les suivantes :

- dimensions du corps et de la ventouse orale (plus grandes chez *N. neyrai*)
- l'extrémité antérieure du corps (plus étroite chez *N. noyeri*)
- les papilles ventrales (normalement moins nombreuses chez *N. neyrai*, 13 ou 14)
- l'œsophage (plus long chez *N. neyrai*)
- le pore génital (plus antérieur chez *N. neyrai*)
- de deux à quatre anses utérines enroulées au niveau de la poche du cirre chez *N. neyrai*
- le cirre (plus court et très armé chez *N. neyrai*)
- les testicules (plus grands, allongés, avec des lobules plus marqués chez *N. neyrai*)
- le vagin (plus court, étroit et entouré d'un collier glandulaire chez *N. neyrai*)

Simón-Vicente *et al.* (1985a) ont révisé divers synonymes de *N. neyrai*. Ils ont effectué une révision complète de la morphologie de ce digène. Ce qui a permis de résoudre le problème de sa position systématique.

Simón-Vicente *et al.* (1985a) considèrent dans le genre *Notocotylus* seulement trois espèces valables, toutes parasites de rongeurs en Europe : *N. noyeri* Joyeux, 1922 ; *N. neyrai* González Castro, 1945 et *N. gonzalezi* Simón-Vicente, Mas-Coma, López-Román, Tenora et Gállego, 1985. Après l'analyse des critères différentiels des trois espèces, signalés par González Castro (1945), Simón-Vicente *et al.* (1985a) considèrent que seuls quatre caractères pour lesquels il ne se produit pas de superposition sont valables :

a) Le cirre et la poche du cirre :

La poche du cirre est plus longue chez *N. neyrai*. Il existe de légères différences de longueur au niveau de la partie évaginée du cirre. Toutefois, les plus évidentes sont les différences morphologiques : le cirre de *N. noyeri* est lisse et inerme, tandis que celui de *N. neyrai* est armé.

b) Le metraterme :

Chez *N. noyeri* il est large, long et rectiligne. Tandis que chez *N. neyrai*, il est court et a une forme d'entonnoir.

c) Les enroulements de l'utérus au niveau de la poche du cirre :

Chez *N. noyeri*, du fait de la longueur importante du metraterme, on observe un enroulement seulement au niveau de la poche du cirre. Chez *N. neyrai*, dont le metraterme est court, on observe latéralement beaucoup plus d'enroulements le long de la poche du cirre.

d) Les glandes metratermiques qui s'enroulent totalement le long du metraterme sont beaucoup plus étendues chez *N. noyeri* que chez *N. neyrai*.

Morphologie

Notocotylus neyrai (Figure 8 A-F) est un parasite du cæcum des micromammifères. Il a une forme ovale (Figure 8 A et C) et un corps lisse présentant habituellement trois rangées de ventouses musculeuses (entre 13 et 15) sur sa face ventrale. Il est dépourvu d'acetabulum et de pharynx et présente deux long caeca digestifs. Sa taille varie généralement entre 2,8-3,85 mm de long et 1-1,8 mm de large.

La poche du cirre (Figure 8 B, D-F), allongée, est située dans la moitié antérieure du corps. Le pore génital est situé sur le côté ventral de l'œsophage. Le vagin et la poche du cirre confluent en un court atrium génital à paroi musculaire fine et recouverte sur sa surface interne par des cellules épithéliales allongées. Les testicules, opposés, sont proches de l'extrémité postérieure du corps (Figure 8 A et C). Leurs bords externes, fortement lobulés, présentent cinq à huit lobes. Leur longueur maximum oscille entre 500 et 800 µm, et la largeur entre 300 et 400 µm. L'ovaire, situé entre les deux testicules, est aussi fortement lobulé (Figure 8 A et C). Son diamètre maximum est compris entre 300 et 400 µm. Le follicule vitellin est concentré sur les côtés, habituellement sur la partie antérieure des testicules. L'appareil excréteur, situé derrière l'œsophage, est difficile à observer. Cependant, une vésicule excrétrice qui apparaît de forme

triangulaire en coupe s'observe parfaitement derrière l'ovaire, à une distance d'environ 80 μm (González Castro, 1945).

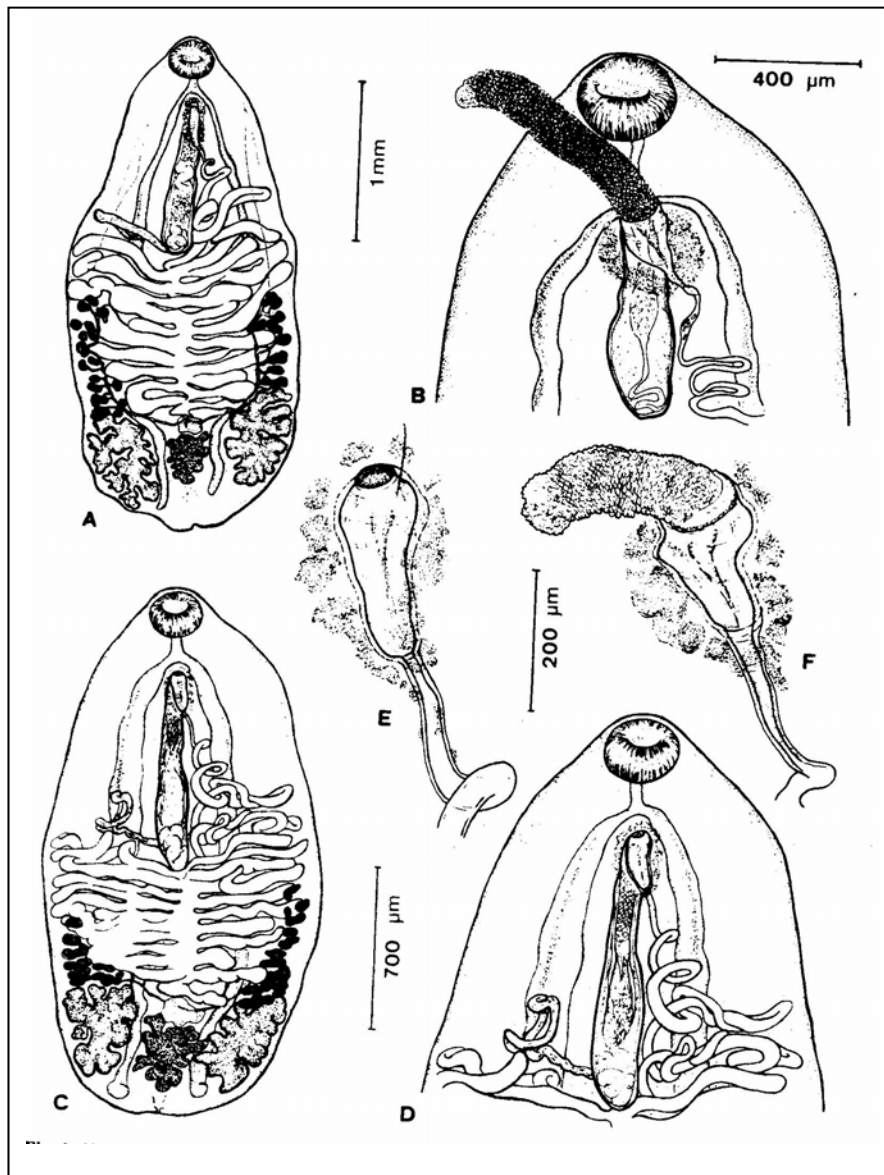


Figure 8 : *Notocotylus neyrai* González Castro, 1945: A, C) vues ventrales de deux spécimens; B, D) parties antérieures de deux spécimens en vue ventrale; E) détail de la partie terminale de l'utérus montrant le vagin et les glandes vaginales; F) même détail montrant le cirre en partie évaginé. A, C: barre = 1 mm; B: 400 μm ; D: 700 μm ; E, F: 200 μm . Extrait de Simón-Vicente *et al.* (1985a).

Biogéographie

L'aire de répartition de *N. neyrai* s'étend sur tout le continent européen. Le parasite a été récolté en Espagne, France, ex Tchécoslovaquie, Bulgarie, Allemagne et Russie. Les hôtes définitifs chez qui la présence de ce parasite a été signalée sont des rongeurs aquatiques ou

capturés en biotope proche d'un milieu aquatique : *Arvicola sapidus*, *A. terrestris*, *Microtus agrestis*, *M. arvalis*, *M. cabreræ*, *Apodemus sylvaticus*, et *Pitymys lusitanicus* (Feliu *et al.*, 1986).

La première citation de cet helminthe fût celle de González Castro (1945) qui le découvrit chez *Arvicola sapidus* à Grenade (Espagne). Plus tard, Simón-Vicente (1976, 1979) travailla sur des individus de *N. neyrai* de Salamanque (Espagne).

Simón-Vicente *et al.* (1985a) effectuèrent une étude comparée de *Notocotylus* spp. à partir de matériel de *Arvicola sapidus* de différentes localités espagnoles et de Jeseniky (ex Tchécoslovaquie), et de *Apodemus sylvaticus* et *Microtus cabreræ* de différents biotopes d'Espagne. Par la suite, Torres *et al.* (1985) étudièrent et démontrèrent la présence de *N. neyrai* au niveau de nombreuses provinces espagnoles. Ces derniers auteurs précisèrent les données de Simón-Vicente *et al.* (1985a) et conclurent aussi que la distribution du parasite s'étend sur toute la Péninsule ibérique.

Cycle biologique

Le cycle biologique (Figure 9) de *N. neyrai*, comme celui de toutes les espèces du genre *Notocotylus*, est indirect. Son hôte intermédiaire est un mollusque gastéropode d'eau douce (Yamaguti, 1975).

En Espagne, le cycle a été décrit par Simón-Vicente *et al.* (1985b). Selon ces auteurs, l'hôte intermédiaire est *Lymnaea truncatula* (Müller, 1774) (Gasteropoda, Lymnaeidae), chez qui les cercaires de *N. neyrai* ont été découvertes au niveau de deux biotopes de la province de Salamanque (Espagne) et l'adulte chez *Arvicola sapidus* et *Apodemus sylvaticus*. Les œufs sont éliminés par l'hôte définitif avec les excréments. Ils sont ensuite ingérés par un mollusque aquatique qui intervient comme hôte intermédiaire. Le miracidium se développe chez cet hôte intermédiaire pour donner deux générations de sporocystes (Yamaguti, 1975). Les sporocystes fils donnent à leur tour deux générations de rédies dans lesquelles se développent les cercaires. Finalement, les cercaires, de type « monostoma » sortent du mollusque et mènent une vie libre de courte durée dans le milieu aquatique. Ensuite, elles s'enkystent dans la végétation pour donner les métacercaires qui infesteront les hôtes définitifs lorsque ces derniers ingéreront les végétaux sur lesquels elles sont fixées.

Cependant, Simón-Vicente *et al.* (1985b) signalent dans leur étude n'avoir détecté ni sporocyste, ni rédie au cours du cycle biologique de *N. neyrai*.

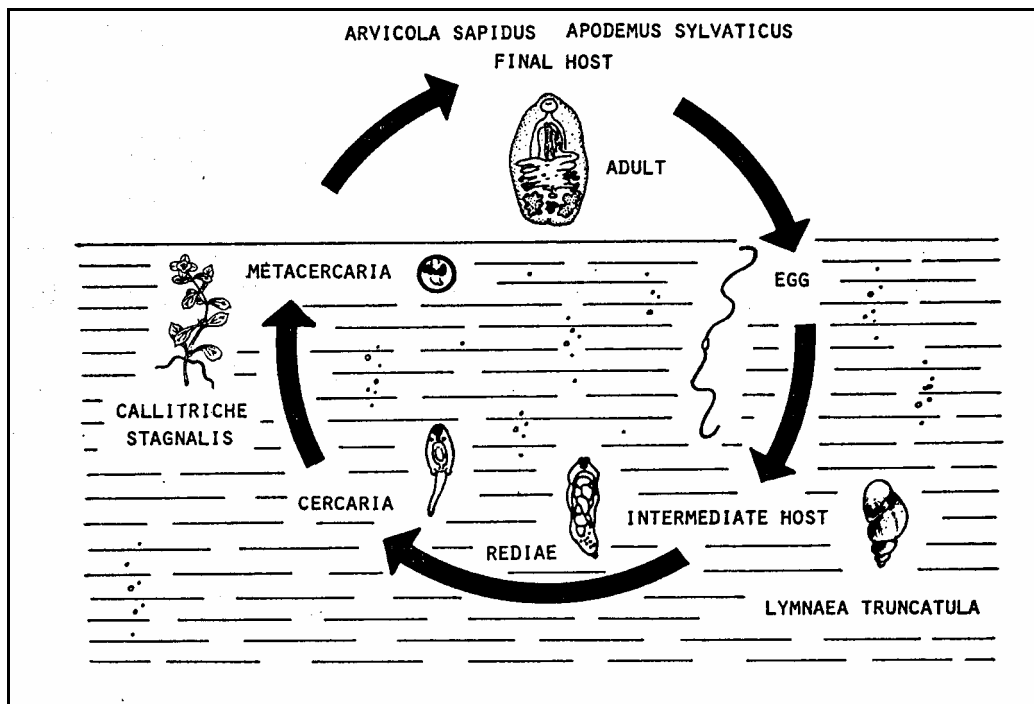


Figure 9 : Cycle biologique de *Notocotylus neyrai* González Castro, 1945 : représentation schématique du modèle rencontré à Salamanque (Espagne). Extrait de Simón-Vicente *et al.* (1985b).

2. 1. 2. Cestodes étudiées

2. 1. 2. 1. *Joyeuxiella pasqualei* (Diamare, 1893) et *Joyeuxiella echinorhynchoides* (Sonsino, 1889)

Hôtes :

- *Joyeuxiella pasqualei* : *Felis lybica* (Carnivora, Felidae)
- *Joyeuxiella echinorhynchoides* : *Vulpes vulpes* (Carnivora, Canidae)

Localisation dans l'hôte : intestin grêle

Provenance géographique :

- *Joyeuxiella pasqualei* : Thiès (Sénégal)
- *Joyeuxiella echinorhynchoides* : Corte (Corse, France)

Systematique

Embranchement Plathelminthes

Super-classe Cercomeromorphae Bychowsky, 1937

Classe Cestoda Rudolphi, 1808

Sous-classe Eucestoda Southwell, 1930

Ordre Cyclophyllidea van Beneden *in* Braun, 1900

Famille Dipylidiidae Stiles, 1896

Genre *Joyeuxiella* Fuhrmann, 1935

Joyeuxiella pasqualei (Diamare, 1893)

Joyeuxiella echinorhynchoides (Sonsino, 1889)

La famille des Dipylidiidae comprend trois genres : *Dipylidium* Leuckart, 1863 ; *Diplopylidium* Beddard, 1913 et *Joyeuxiella* Fuhrmann, 1935. Les espèces du genre *Joyeuxiella* se distinguent particulièrement par la morphologie de leurs scolex qui présentent chaque fois un rostre armé d'épines (Jones, 1994a).

Selon Jones (1983), seules trois espèces sont considérées comme valables parmi les 13 décrites dans le genre *Joyeuxiella*. Ils s'agit de *J. pasqualei* (Diamare, 1893), *J. fuhrmanni* (Baer, 1924) et *J. echinorhynchoides* (Sonsino, 1889). Les espèces *J. chyzeri* (Ratz, 1897), *J. pasqualeiformis* (López-Neyra, 1928), *J. rossicum* (Skryabin, 1923), *J. aegyptica* (Meggitt, 1927), *J. fortunatum* (Meggitt, 1927) et *J. guilhoni* Troncy, 1970 sont synonymes de *J. pasqualei* tandis que les espèces *Joyeuxiella* sp. (Kofend, 1917) et *J. paucitestis* Mettrick & Beverley-Burton, 1961 sont synonymes de *J. fuhrmanni*. Finalement, *J. gervaisi* (Setti, 1985) et *J. dongolense* (Beddard, 1913) sont considérées comme étant des espèces *inquirendae*.

Morphologie

Les cestodes du genre *Joyeuxiella*, parasites des carnivores comme tous les Dipylidiidae, se caractérisent par leur rostre qui se présente soit sous forme de cône, soit sous forme de protubérance. Le rostre est armé d'épines. Les proglottis matures présentent deux appareils génitaux complets disposés latéralement. Les pores génitaux s'ouvrent dans la moitié antérieure des proglottis. Les proglottis matures sont pourvus de nombreux testicules disposés sur toute la partie médullaire de l'anneau. Les ovaires sont disposés dans la partie postéro-médiane des anneaux, derrière les poches des cirres. Les proglottis gravides contiennent des capsules ovigères contenant chacune un seul œuf (Jones, 1983, 1994a).

Joyeuxiella pasqualei se caractérise par son rostre conique (Figure 10) présentant 10 à 15 rangées alternes de crochets. Chez cette espèce, la partie interne est plus longue que la partie externe des épines (Figure 10). Leur longueur varie de 12-17 μm vers l'apex à 4-8 μm à la base du rostre. Le strobile peut atteindre une longueur de 365 mm et une largeur comprise entre 0,4-2,0 mm. Il est généralement composé de 47 à 359 segments. Les proglottis matures ont une forme à peu près carrée avec des dimensions variant entre 295-1 900 μm x 290-2 000 μm . Ils comportent chacun 40 à 130 testicules de diamètre compris entre 40-113 μm . Les poches des cirres ne dépassent pas les canaux osmorégulateurs (Figure 10). Les anneaux gravides sont plus larges que longs, 600-900 μm x 300-320 μm . Les capsules ovigères

dépassent clairement les canaux osmorégulateurs (Figure 10). La taille des œufs varie entre 28 et 50 μm . (Jones, 1983).

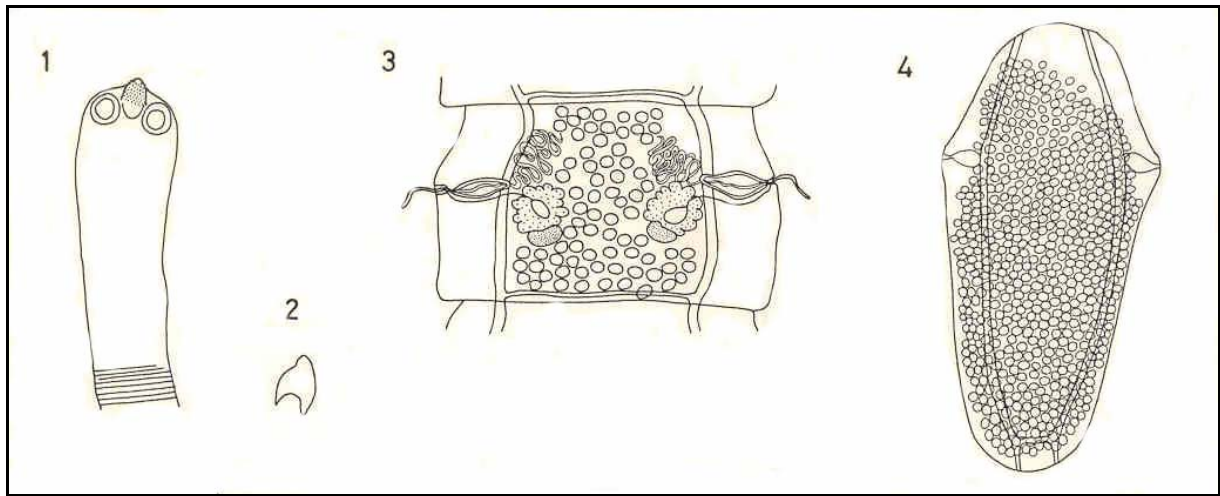


Figure 10 : *Joyeuxiella pasqualei* (Diamare, 1893) 1. Scolex, 2. Crochet du rostre, 3. Proglottis mûr, 4. Proglottis gravide. Extrait de Jones (1983).

Chez *J. echinorhynchoïdes*, le scolex présente un rostre en forme de protubérance (Figure 11) qui comporte 20-30 rangées alternes de crochets qui ont une disposition irrégulière et une lame plus longue que la base (Figure 11). La longueur des crochets varie de 17-26 μm à l'apex à 9-11 μm à la base du rostre. Le strobile, composé de 90 à 283 segments, peut atteindre une longueur de 260 mm et une largeur de 0,5-2,5 mm. Les proglottis matures sont généralement plus longs que larges, 380-694 x 523-1 100 μm . Chaque proglottis présente 25 à 120 testicules de forme ovale et de diamètre compris entre 40 et 85 μm . Les poches des cirres dépassent les canaux osmorégulateurs (Figure 11). Dans les proglottis gravides, les capsules ovigères ne dépassent pas les canaux osmorégulateurs (Figure 11). Le diamètre des œufs varie entre 30 et 45 μm (Jones, 1983).

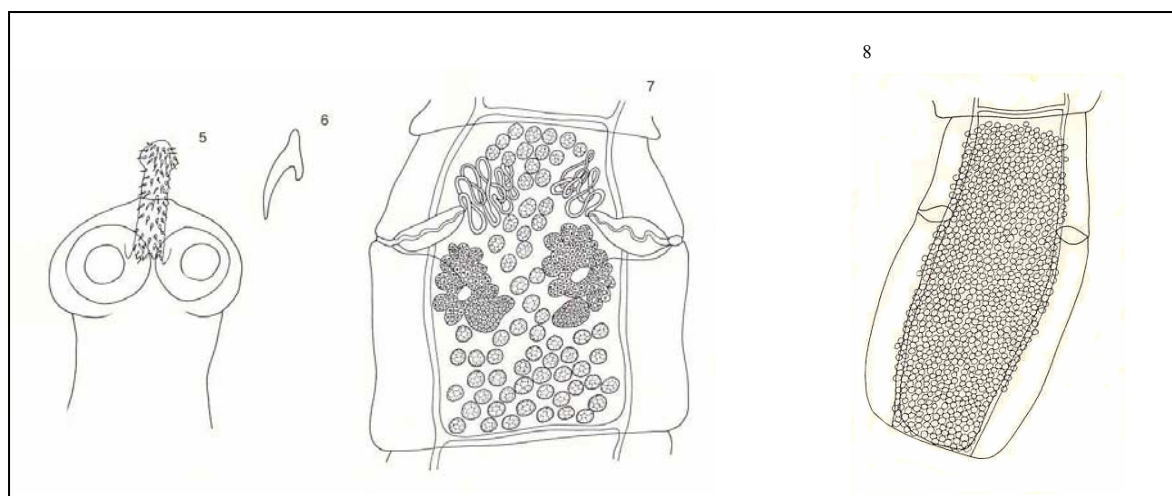


Figure 11 : *Joyeuxiella echinorhynchoïdes* (Sonsino, 1889). 5. Scolex, 6. Crochet, 7. Proglottis mûr, 8. Proglottis gravide. Extrait de Jones (1983).

Biogéographie

Les cestodes du genre *Joyeuxiella* sont parasites de divers carnivores, particulièrement des Canidae, Felidae et Viverridae.

Selon Joyeux & Baer (1936), Jones (1983, 1994a) et Schmidt (1986), *Joyeuxiella pasqualei*, sous ses différentes dénominations, a été signalé chez *Canis familiaris*, *C. lupus*, *C. aureus*, *Felis catus*, *F. caffra*, *F. lybica*, *F. serval*, *F. sylvatica*, *F. sylvestris*, *Zibethailurus serval* et *Genetta rubiginosa*. Ainsi, en raison de la grande variété de ses hôtes, ce parasite présente une large distribution géographique.

Au niveau du continent européen, *J. pasqualei* a été signalé, après la révision de Jones (1983), particulièrement dans la Péninsule ibérique chez les carnivores sauvages comme *Vulpes vulpes*, *Genetta genetta* et *Felis silvestris* (Torres *et al.*, 1989, 1992 ; Navarrete *et al.*, 1990 ; Miquel *et al.*, 1992, 1994a, 1994b ; Carvalho-Varela *et al.*, 1993 ; Casanova, 1993 ; Miquel, 1993 ; Feliu *et al.*, 1996). Dans le reste du continent, les découvertes sont ponctuelles (*e.g.* chez *F. silvestris* en Bulgarie par Jancev & Genov, 1978).

En Asie, il a été signalé par plusieurs auteurs toujours chez le chat (*e.g.* Abdul-Salam & Baker, 1990 ; Dalimi *et al.*, 1996).

Au niveau du continent africain, Jones (1983) étudia du matériel provenant du Kenya (*C. aureus*), Zambie (*F. lybica* et *F. serval*), Nigeria (*F. catus* et *F. serval*), Tchad (*F. serval*), Egypte (*F. catus*, *F. sylvatica* et *F. sylvestris*). En plus, *J. pasqualei* a été signalé plusieurs fois chez le chat (Bernard *et al.*, 1964 en Tunisie ; Gadale *et al.*, 1989 en Somalie ; etc.). Le matériel de *Joyeuxiella* que nous avons utilisé au cours de ce travail, représente la première citation de *J. pasqualei* au Sénégal.

Sa présence accidentelle sur le continent américain a été signalée par Lindquist & Austin (1981) et Blagburn & Todd (1989) chez des chats en provenance d'Asie.

Pour *J. echinorhynchoides*, il existe très peu de données bibliographiques. D'après Jones (1983), cette espèce a été décrite comme parasite de *Felis catus*, *Canis* sp., *Vulpes* sp., *Tatera indica*, *Fennecus zerda*. Sa distribution géographique est pour le moment imprécise. Jusqu'à présent, il a été signalé en Afrique du sud et au Moyen Orient. Il est rencontré accidentellement aux Etats-Unis chez *F. zerda* en provenance d'Asie. Cependant, Jones (1983) ne mentionne pas les études de Simón-Vicente (1975) et de Martínez *et al.* (1978) qui signalent sa présence en Espagne chez *V. vulpes*. Sa présence dans cette région est confirmée par les études de Navarrete *et al.* (1990) et de Segovia *et al.* (1997) qui l'ont trouvé aussi chez

le renard *V. vulpes*. En ce qui concerne le continent européen, en dehors de la Péninsule ibérique, *J. echinorhynchoides* n'a été rencontré chez des carnivores sauvages qu'en Corse (France) chez *V. vulpes* (matériel objet de notre étude en microscopie électronique) (Figure 12). En France, *J. echinorhynchoides* n'a été récolté que chez *F. catus* et *C. familiaris* (Joyeux & Baer, 1936).



Figure 12 : Renard (*Vulpes vulpes*) récolté à Corte.

Cycle biologique

Les espèces du genre *Joyeuxiella* présentent un cycle biologique indirect qui comporte un reptile comme hôte intermédiaire et un carnivore comme hôte définitif (Mimioglu & Sayin, 1963 ; Agrawal & Pande, 1980). Cependant, certains micromammifères peuvent faire partie de ce cycle comme hôtes paraténiques (voir la révision effectuée par Miquel, 1993).

Pour *J. pasqualei*, ont été cités comme hôtes intermédiaires des reptiles des genres *Lacerta*, *Tarentola*, *Natrix*, *Coluber*, *Tropidonotus*, *Zamenis*, *Ailurophis*, *Hemidactylus*, *Varanus*, *Acanthodactylus*, *Trapelus*, *Stellio* et *Mabuya* (Joyeux & Baer, 1936 ; Fitzsimmons, 1961).

Pour le cas de *J. echinorhynchoides*, la larve cysticerque a été décrite chez *Acanthodactylus erythraeus lineomaculatus* et *Uromastix hardwickii* (Gupta, 1970 ; Dollfus, 1975).

2. 1. 2. 2. *Taenia parva* Baer, 1926

Hôte : *Genetta genetta* (Carnivora, Viverridae)

Localisation dans l'hôte : intestin grêle

Provenance géographique : Santa Eulàlia de Ronçana (Barcelone, Espagne)

Systematique

Embranchement Plathelminthes

Super-classe Cercomeromorphae Bychowsky, 1937

Classe Cestoda Rudolphi, 1808

Sous-classe Eucestoda Southwell, 1930

Ordre Cyclophyllidea van Beneden *in* Braun, 1900

Super-famille Taenioidea (Ludwig, 1886)

Famille Taeniidae Ludwig, 1886

Sous-famille Taeniinae Perrier, 1897

Genre *Taenia* Linnaeus, 1758

Taenia parva Baer, 1926

Taenia parva, espèce placée dans le sous-groupe II proposé par Verster (1969), a maintenu le même binôme depuis sa création jusqu'à nos jours. De ce fait, tous les auteurs, à l'exception de Wardle & McLeod (1952) qui le désignèrent sous le nom de *Hydatigera parva*, ont admis cette appellation. En ce sens, il est important de signaler que Abuladze (1964, 1970) était en désaccord avec cette appellation et considérait *H. parva* Wardle et McLeod, 1952 comme étant synonyme de *T. parva*.

Morphologie

Selon la description de Verster (1969) et de Abuladze (1970), *T. parva* (Figure 13 A-D) est un cestode qui atteint au plus 5,5 cm de long. Son strobile est constitué de quelques 80 proglottis plus larges que longs, à l'exception des proglottis gravides terminaux qui sont plus longs que larges. Le scolex mesure entre 683 et 1 001 μm , le rostre de 546 à 655 μm et les ventouses oscillent entre 165 et 237 μm de diamètre. Le scolex est armé, et présente une double couronne alterne de grands et de petits crochets (Figure 13 A et B), formant un total de 38 à 48 crochets. La taille des crochets varie entre 302-370 μm et entre 192-238 μm respectivement pour les grands et les petits. Au niveau des anneaux mûrs (Figure 13 C), il est possible d'observer 500 à 650 testicules ayant des dimensions comprises entre 69-91 x 37-69 μm . Ils sont situés sur une ou deux zones dorsales et s'étendent jusqu'à la marge du proglottis, occupant ainsi l'espace compris entre l'ovaire et la glande vitellogène. La poche du cirre, large et étroite, s'étend jusqu'au centre du proglottis et englobe à son origine le canal déférent.

La poche du cirre mesure entre 352-470 x 78-110 μm au niveau des anneaux mûrs, 375-420 x 69-91 μm au niveau des anneaux prégravidés et 297-357 μm au niveau des anneaux gravidés (Figure 13 D). L'ovaire se présente sous forme de deux lobes de tailles légèrement différentes. Le vagin ne présente pas de sphincter. Dans les proglottis gravidés, l'utérus présente 7 à 12 ramifications latérales. Les œufs sont sphériques et mesurent 25-29 μm de diamètre. L'embryophore mesure 2,2-3,4 μm .

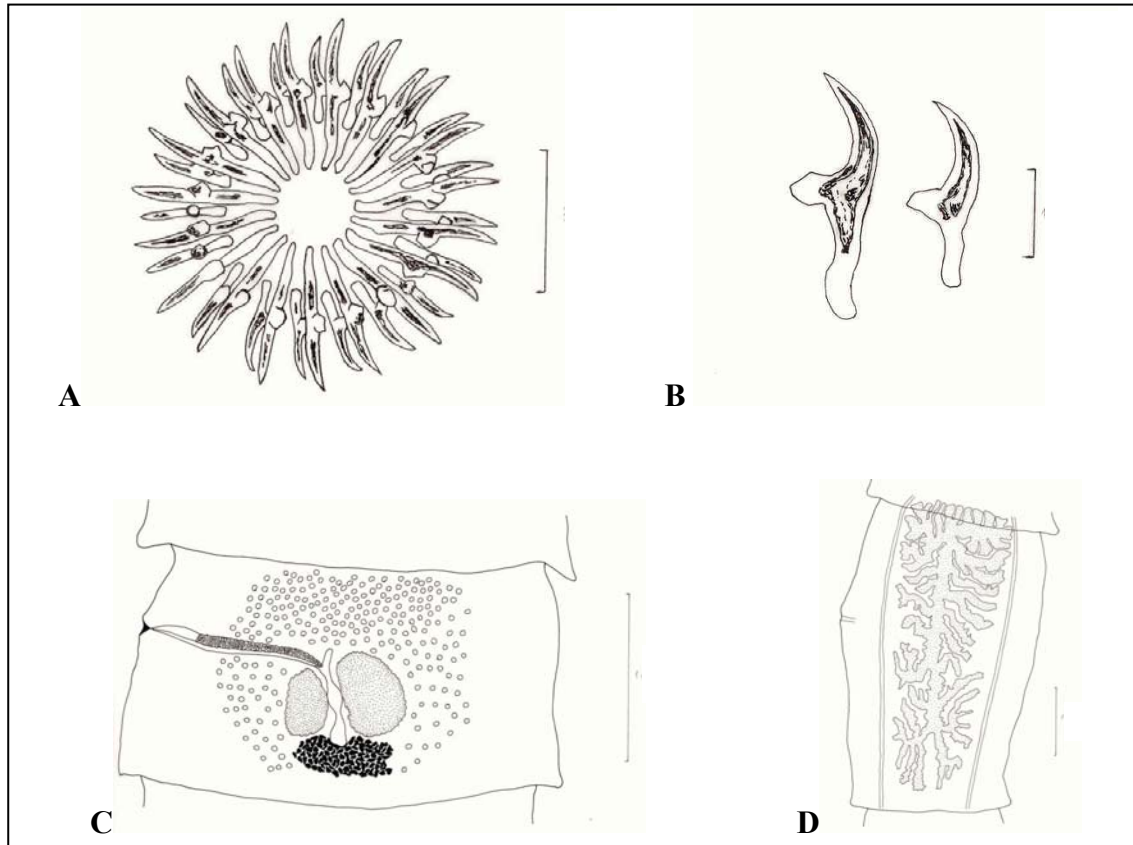


Figure 13 : *Taenia parva*. **A :** disposition des crochets au niveau du rostre, barre = 300 μm ; **B :** morphologie d'un crochet, barre = 100 μm ; **C :** morphologie d'un proglottis mûr, barre = 1000 μm ; **D :** morphologie d'un proglottis gravidé, barre = 1000 μm . Extrait de Miquel (1993).

Biogéographie

Taenia parva est présent dans les régions sud-occidentales de la zone paléarctique et en Afrique, ce qui correspond à la distribution des représentants de la famille des Viverridae, qui sont ses hôtes définitifs. Pour démontrer cela, Bernard (1963) réalisa une révision de toutes les citations connues concernant ce parasite, et conclut que les larves hexacanthés polycéphaliques de la cavité abdominale des Muridés devaient être attribuées à l'espèce *T. parva*, et que ce cestode présentait une distribution clairement localisée au sud-ouest de la France, de la Péninsule ibérique et en Afrique. Ce qui coïncide avec la distribution géographique de son hôte définitif.

Taenia parva a été cité plus souvent à l'état larvaire qu'à l'état adulte. Ce qui est sans doute lié à la prédominance des études sur l'helminthofaune des rongeurs qui peuplent son aire de distribution (Casanova *et al.*, 2000). La première citation espagnole de la phase larvaire de *T. parva* est de Mas-Coma & Feliu (1977) chez *Apodemus sylvaticus*. Depuis, plusieurs travaux ont rapporté la présence de ce *Taenia* chez *A. sylvaticus* (Feliu, 1980 ; Torres, 1988 ; Feliu *et al.*, 1997 ; etc.). Comme le montrent Casanova (1993) et Miquel (1993), il semble que l'unique hôte intermédiaire de *T. parva* décrit au niveau de la Péninsule ibérique jusqu'à maintenant soit *A. sylvaticus*. En dehors de la Péninsule ibérique, il a été constaté la possibilité que d'autres rongeurs des genres *Mus*, *Rattus*, *Arvicanthis* ou *Mastomys*, entre autres, jouent ce rôle (voir Miquel, 1993). Par contre, le ver adulte a été décrit avec un matériel récolté chez *Genetta ludia* par Baer (1926). Auparavant, il a été trouvé chez *Genetta tigrina* en Afrique du sud par Mahon (1954). Sur la Péninsule ibérique, les descriptions, toutes chez *Genetta genetta*, sont nombreuses (Álvarez *et al.*, 1990 ; Miquel *et al.*, 1994a ; Casanova *et al.*, 2000 ; etc.).

Cycle biologique

Comme chez tous les *Taenia*, le cycle biologique de *T. parva* est hétéroxène. C'est donc un cycle indirect présentant comme hôtes intermédiaires des rongeurs européens et africains des genres *Mus*, *Rattus*, *Rhabdomys*, *Praomys*, *Apodemus*, et comme hôtes définitifs, différents carnivores des genres *Herpestes*, *Ictomys*, *Felis* et, généralement, les Viverridés du genre *Genetta* (Abuladze, 1970).

Feliu *et al.* (1981), au cours de leur analyse de la biogéographie des helminthes parasites de *A. sylvaticus* autour de la méditerranée, montrèrent que *T. parva* pénétra dans la Péninsule ibérique depuis l'Afrique, par le biais de son hôte définitif *G. genetta* en profitant du pont quaternaire de Gibraltar. Arrivée en Espagne, le cestode utilisa le mulot comme principal hôte intermédiaire, pour assurer de cette manière son cycle de vie sur le continent européen.

2. 2. Méthodes d'études

Dans ce sous chapitre, nous présentons les méthodes utilisées pour les études aux microscopes électroniques à balayage (MEB) et à transmission (MET).

En ce qui concerne les méthodes de piégeage des micromammifères hôtes, de dissection et d'extraction des Plathelminthes parasites, nous nous référons entre autres aux travaux de Mas-Coma (1976), Feliu (1980) et Torres (1988).

Pour l'identification des trématodes et des cestodes objets de notre étude, nous avons appliqué les techniques helminthologiques habituelles qui vont de la fixation des vers avec diverses solutions fixatrices (comme l'éthanol 70° ou le Bouin) jusqu'à la coloration avec diverses solutions de carmin (carmin chlorhydrique, carmin boracique de Grenacher ou carmin acétique de Semichon). Ces techniques sont décrites en détail dans Langeron (1949) et Casanova (1993). Ainsi, à la fin de la coloration, les parasites sont montés entre lame et lamelle avec du baume du Canada et identifiés en s'appuyant sur la bibliographie déjà existante (González Castro, 1945 ; Verster, 1969 ; Yamaguti, 1971 ; Esteban, 1983 ; Jones, 1983 ; Schell, 1985 ; Simón Vicente *et al.*, 1985a ; Mas-Coma *et al.*, 1986 ; Schmidt, 1986 ; Khalil *et al.* 1994 ; Gibson *et al.*, 2001 ; etc).

2. 2. 1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Nous avons effectué au microscope électronique à balayage des observations de la morphologie générale du spermatozoïde chez *Fasciola hepatica*, parasite de *Rattus rattus* capturé à l'embouchure du Fango (Corse, France). Pour cela, nous avons utilisé des techniques appropriées pour rendre le matériel parfaitement sec et conducteur tout en respectant sa forme et son volume. La méthode du point critique (conditions particulières de température et de pression) est très efficace pour procéder à l'évaporation des fluides sans déformation du matériel. Pour cette raison, nous avons effectué pour notre étude l'évaporation du CO₂ à son point critique. Les différentes phases du traitement du matériel sont exposées ci-dessous.

Fixation

Pour disposer des spermatozoïdes de *F. hepatica*, nous avons extrait le sperme d'un parasite que nous avons dilacéré dans une salière contenant du sérum physiologique (Figures 14 et 15). Ce passage à l'eau physiologique permet de débarrasser les spermatozoïdes de tout mucus. Ainsi, un volume V de la solution contenant les spermatozoïdes est prélevé et mis dans un tube Eppendorf. Un volume égal (V) de la solution fixatrice (solution de glutaraldéhyde à 5 % pour notre étude) est rajouté au tube, de manière à obtenir à la fin une solution de glutaraldéhyde à 2,5 %. Cette solution finale, contenant les spermatozoïdes, est ensuite gardée au froid (4 °C) pendant toute une nuit (ce temps peut être allongé dans certains cas).

Le jour suivant, nous avons procédé à une centrifugation de la solution fixatrice à 2 000 rpm durant 5 minutes à 4 °C afin de maintenir les spermatozoïdes au fond des tubes Eppendorf. Cette étape permet de passer d'une solution à l'autre sans perdre du matériel. Elle est répétée après chaque lavage et après la post-fixation.

Après la fixation, nous avons effectué les premiers lavages avec une solution tampon phosphate (PB) 0,1 M à pH 7,4 dans 3 bains successifs de 10 minutes chacun à 4 °C.

Ensuite, nous avons procédé à une post-fixation qui consiste à passer les spermatozoïdes dans une solution de tétraxide d'osmium (OsO_4) à 1 % en tampon phosphate 0,1 M et renfermant du ferrocyanure de potassium (FeCNK) à 0,8 %. Cette phase ne doit pas durer plus de deux heures à 4 °C. Elle n'est cependant pas indispensable pour le cas de notre matériel. Par ailleurs, il est recommandé de manipuler toujours l'osmium sous une hotte du fait de sa toxicité.

Pour éviter la cristallisation du tampon PB, nous avons effectué encore une série de rinçages dans quatre bains successifs de 10 minutes chacun avec de l'eau bidistillée. Le matériel biologique est monté immédiatement après sur des lamelles rondes qui servent de supports. A ce niveau, il est possible, après rinçage, de garder le matériel biologique en solution PB pendant quelques jours. Et l'on procédera au lavage à l'eau bidistillée quand on voudra poursuivre le traitement du matériel.

Adhérence des spermatozoïdes

Pour une bonne fixation des spermatozoïdes sur les porte-objets du microscope, nous avons utilisé de la poly-L-lysine étalée sur une lamelle ronde d'environ 10 mm de diamètre. Cette lamelle est ensuite collée sur le porte-objet du microscope. Une goutte de la solution contenant les spermatozoïdes est ensuite déposée sur la lamelle recouverte de la couche de poly-L-lysine et l'ensemble est maintenu dans de l'eau distillée.

Préparation de la poly-L-lysine (Marchant & Thomas, 1983)

- Une goutte de poly-L-lysine (0,1 %) est déposée sur les lamelles porte-objets (généralement rondes pour la MEB) préalablement bien lavées. Ensuite, les lamelles sont rincées par immersion durant 30 secondes avec de l'eau distillée, et enfin séchées à l'air libre (couvrir pour éviter le dépôt de poussière). Marquer la face contenant la poly-L-lysine.
- Ensuite, une goutte de la suspension à étudier est déposée sur les lamelles porte-objets pendant 10 à 30 minutes. Effectuer ensuite différents lavages doux puis procéder au traitement du matériel (déshydratation et dessiccation) afin de pouvoir l'observer au microscope électronique à balayage.

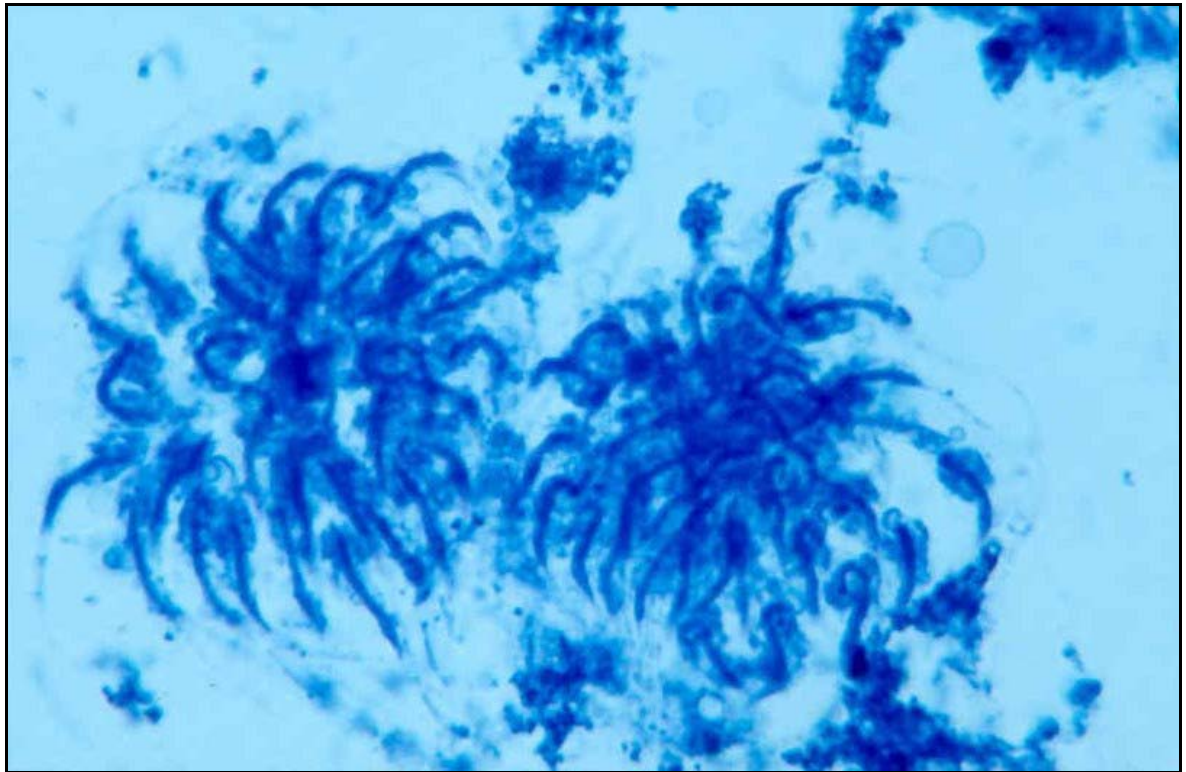


Figure 14 : Image au microscope photonique des spermatides obtenues après la dilacération des testicules de *Fasciola hepatica* récoltée chez *Rattus rattus*.

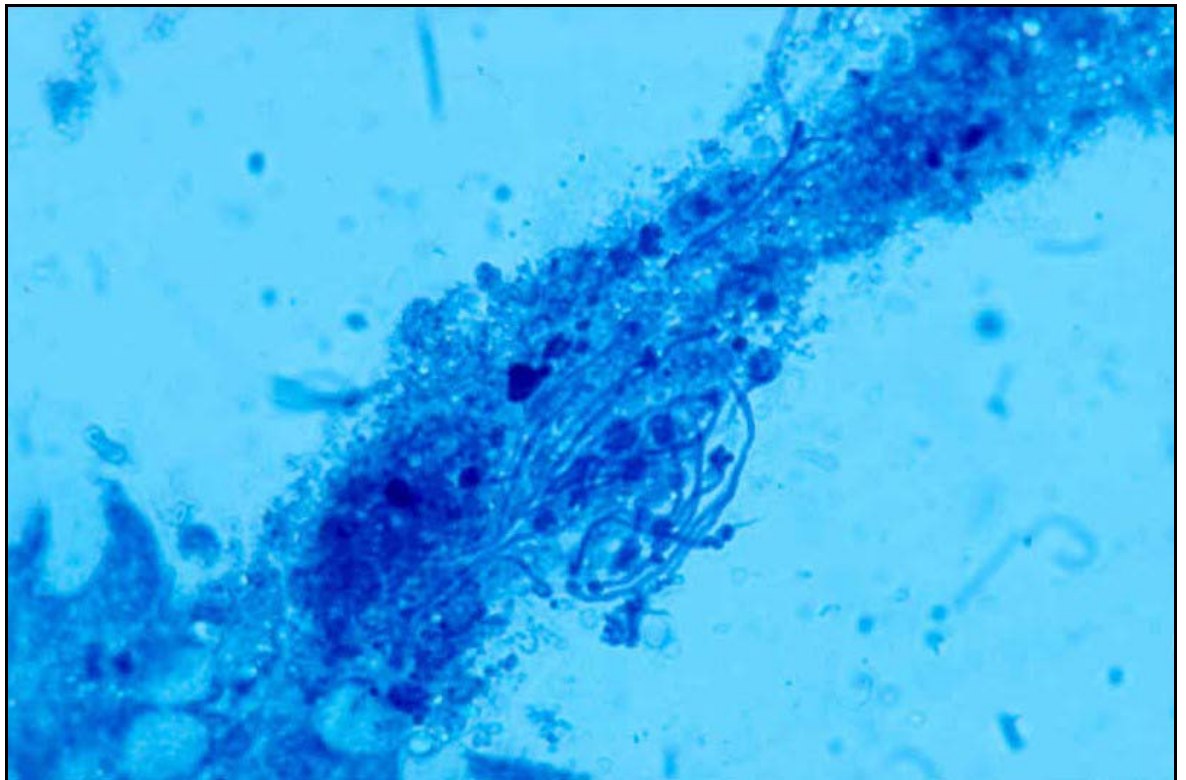


Figure 15 : Image au microscope photonique des spermatozoïdes obtenus après la dilacération du canal déférent de *Fasciola hepatica* récoltée chez *Rattus rattus*.

Déshydratation et point critique

Les spermatozoïdes fixés sur la poly-L-lysine sont ensuite soumis à une déshydratation progressive dans une série croissante d'alcool (éthanol 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 96° et 100°). Pour les études au microscope à balayage, nous n'avons jamais utilisé l'acétone pour la déshydratation afin d'éviter les risques de détérioration de l'appareil du point critique.

Le point critique consiste à faire évaporer toute l'eau contenue dans le matériel biologique sans engendrer de déformations de la structure biologique. Pour cela, la méthode du point critique est la plus utilisée pour les études en MEB. Cette méthode permet la transformation de l'eau du matériel biologique en gaz sans déformation des structures biologiques en le soumettant à son point critique (c'est-à-dire à température et pression critiques). Le point critique de l'eau contenue dans les tissus biologiques étant malheureusement très élevé (T = 374 °C ; P = 3 212 psi / 22MPa) nous avons utilisé un appareil dit « *Critical Point Drying* » Polaron model E 3000 pour y arriver.

Montage et observations au MEB

A la fin du traitement, nous avons monté notre matériel en « *stub* » (support métallique) et nous l'avons recouvert avec de l'or grâce à un « *sputtering* » Jeol model JFC-1100 de 400 Å. Les observations sont effectuées au MEB Leica LC-360 à une accélération de 10 Kv et à une distance d'environ 3 mm.

2. 2. 2. Microscopie électronique à transmission (MET)

2. 2. 2. 1. Étude du matériel biologique en coupes

L'étude ultrastructurale suppose au préalable, un traitement adéquat du matériel biologique afin de pouvoir l'observer dans des conditions ressemblant le plus possible aux conditions « *in vivo* ». Ce traitement comporte plusieurs phases : la fixation, les lavages, la déshydratation, l'infiltration et l'inclusion, l'ultramicrotomie, le contraste des grilles et finalement, les observations au MET. Toutes ces phases sont décrites en détail dans la partie ci-dessous.

Fixation

La fixation consiste à mettre le matériel biologique dans une solution dite fixatrice, qui permet la conservation des structures biologiques correspondant à l'état vivant du matériel biologique. Pour cela, le fixateur agit au niveau moléculaire en bloquant les systèmes

enzymatiques et en stabilisant les structures. D'où la nécessité d'utiliser des fixateurs de pénétration et d'action rapides. Les structures conservées varient selon la nature chimique du fixateur. Ainsi, il est possible de se procurer des images de meilleure qualité en utilisant à la fois plusieurs procédés. En général, parmi les constituants chimiques des cellules on distingue des acides nucléiques, phospholipidiques, protéiques, des hydrates de carbone (polysaccharides) et des acides gras. Et les différents réactifs chimiques qui sont employés dans les solutions fixatrices réagissent d'une manière différente l'un de l'autre. Ainsi, le choix du fixateur doit se faire en fonction de la nature chimique du matériel à étudier. Actuellement, les composants chimiques utilisés sont essentiellement des aldéhydes et le tétroxyde d'osmium. Le premier fixateur qui s'est distingué de par son utilité et son acceptation générale en microscopie électronique fût le tétroxyde d'osmium (Palade, 1952 dans Mercer & Birbeck, 1979). Puis, les aldéhydes en commençant par le formaldéhyde ont été utilisés, car ils étaient bien connus et largement utilisés en microscopie photonique. Aujourd'hui, la pratique la plus habituelle est de procéder à une « préfixation » avec une solution de glutaraldéhyde ou un mélange de glutaraldéhyde avec du paraformaldéhyde, laver ensuite et procéder à une « post-fixation » avec du tétroxyde d'osmium. Les aldéhydes stabilisent en premier lieu les composants protéiques et le tétroxyde d'osmium fixe et colore les composés lipidiques (acides gras insaturés). Selon Sabatini *et al.* (1963) (dans Mercer & Birbeck, 1979), l'aldéhyde le plus utilisé pour les études ultrastructurales est le glutaraldéhyde. Pour notre étude, le fixateur choisi est donc le glutaraldéhyde à 2,5 % dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M ajusté au pH 7,2 selon les proportions ci-dessous :

Glutaraldéhyde à 25 %	1 volume
H ₂ O distillée	4 volumes
Tampon cacodylate de sodium 0,2 M pH 7,2	5 volumes

Cette solution permet alors de préserver les protéines contenues dans notre matériel biologique. Le temps de fixation est de 2 heures à froid (4 °C).

Pour la post-fixation, nous avons utilisé une solution de tétroxyde d'osmium à 1 % avec un tampon cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,2 et qui renferme du ferrocyanure de potassium à 0,8 %, suivant les proportions ci-dessous, pendant 1 heure ou 1 heure et demie à 4 °C.

1 volume de tétroxyde d'osmium à 4 % + 1 volume de H₂O distillée +
 2 volumes du tampon cacodylate de sodium 0,2 M pH 7,2 pour obtenir
 4 volumes de tétroxyde d'osmium à 1 % dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,2

L'osmium stabilise les acides gras insaturés et produit un léger contraste de la préparation.

L'association du fixateur à un tampon à pH à peu près égal à la neutralité (pH = 7) est une pratique quasi universelle au cours des études ultrastructurales. Les fixateurs très acides que

l'on utilise fréquemment en histologie atrophient beaucoup les structures fines puisqu'ils précipitent aussi bien avec les protéines qu'avec les acides nucléiques contenus dans les cellules. Les avantages de l'utilisation d'un tampon furent démontrés par Palade (1952) (dans Mercer & Birbeck, 1979). Du moment que ni les aldéhydes ni le tétr oxyde d'osmium s'ionisent, ils altèrent le pH des tissus en réagissant avec les protéines. Pour éviter cela, Palade (1952) (dans Mercer & Birbeck, 1979) a jugé nécessaire d'utiliser un tampon. Le choix de ce tampon dépend de ce qu'on prétend obtenir comme résultats. Cependant, le tampon cacodylate de sodium est recommandé. Le pH du fixateur n'étant pas aussi critique que celui du milieu qui doit contenir des cellules vivantes, une marge de pH variant entre 6,5 à 8 donnerait probablement les mêmes résultats.

La fixation démarre dès que le fixateur commence à pénétrer dans les cellules. Mais le matériel biologique se désorganise (lyse) très rapidement après son prélèvement. Il faut donc que la durée qui s'écoule entre la récolte du matériel et le début de la fixation soit la plus courte possible. Pour cela, la taille du matériel à fixer est très importante. C'est surtout à ce niveau que surviennent la plupart des problèmes liés à la fixation. Pour la majorité des tissus, il ne peut y avoir une fixation rapide et effective que sur une profondeur de 0,25 mm. Ce qui signifie qu'il faut un volume de tissus inférieur ou égal à 0,5 mm³ pour avoir une fixation uniforme et une inclusion correcte du matériel.

Lavages et déshydratation

Ces deux étapes sont très importantes car les résines époxy utilisées au moment de l'inclusion ne se mélangent pas avec les fixateurs. Par conséquent, il faut utiliser un dissolvant intermédiaire qui soit miscible aussi bien avec le fixateur qu'avec la résine et qui ne réagisse pas avec eux. Comme l'éthanol a été largement utilisé en microscopie photonique, il a également été adopté en microscopie électronique. Cependant, l'éthanol réagit avec le tétr oxyde d'osmium, produisant un léger précipité dans les tissus. Pour éviter cela, bien qu'il soit possible de l'utiliser pour la déshydratation (voir Tableau II), le lavage antérieur à l'aide d'une solution tampon cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,2 doit être parfait. Pour la plupart des cas, nous avons utilisé l'acétone (voir Tableau III), qui ne réagit pas avec le tétr oxyde d'osmium et nécessite seulement un lavage pour extraire les sels du tampon contenu dans le fixateur.

Après chacun des fixateurs utilisés (glutaraldéhyde à 2,5 % et tétr oxyde d'osmium à 1 %), nous avons effectué les lavages avec une solution tampon identique à celui des fixateurs (tampon cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,2) de la manière suivante :

- 3 lavages de 15 minutes après la préfixation au glutaraldéhyde.
- 3 lavages de 15 minutes après la post-fixation au tétr oxyde d'osmium.

Cependant, il est également possible d'effectuer les lavages rapides avec de l'eau bidistillée. Mais, si le temps ne permet pas de procéder à la déshydratation aussitôt après le lavage, il faut nécessairement garder le matériel dans une solution de tampon cacodylate 0,1 M.

Bien que les résines époxy se mélangent avec les alcools, nous avons ajouté une étape à la déshydratation pour faciliter l'inclusion du matériel. Pour cela, le dissolvant idéal est l'oxyde de propylène (Luft, 1961 dans Mercer & Birbeck, 1979), très volatil, mais qui se mélange avec l'eau et dissout parfaitement les résines époxy. D'autre part, il réagit chimiquement avec les résines époxy. Par conséquent, s'il reste des traces dans la résine, elles s'incorporent au milieu d'inclusion. L'addition d'une étape utilisant des quantités égales d'oxyde de propylène et des résines époxy peut donc faciliter l'inclusion d'un matériel problématique comme c'est le cas chez *F. gigantica* et *F. hepatica* qui présentent une grande taille. Cependant, du fait de la volatilité de ce dissolvant, il faut faire très attention à ce que le matériel biologique ne reste pas dans les flacons au moment de les transvaser.

Tableau II : Déshydratation avec de l'éthanol

Agent déshydratant	Temps
Ethanol 50°	15 minutes
Ethanol 70°	15 minutes
Ethanol 80°	15 minutes
Ethanol 90°	15 minutes
Ethanol 96°	15 minutes
Ethanol 100°	2 x 30 minutes
Oxyde de propylène	1 heure

Tableau III : Déshydratation avec acétone

Agent déshydratant	Temps
Acétone 50°	10 minutes
Acétone 70°	2 x 10 minutes
Acétone 80°	3 x 10 minutes
Acétone 90°	3 x 10 minutes
Acétone 96°	3 x 10 minutes
Acétone 100°	3 x 15 minutes

Imprégnation et inclusion

L'imprégnation consiste à substituer totalement l'acétone ou l'oxyde de propylène par la résine selon la solution utilisée pour déshydrater le matériel. Nous l'avons effectuée de la manière indiquée dans le tableau IV.

Tableau IV : Imprégnation

O/N = « *over night* » v = volume dissolvant = acétone ou oxyde de propylène

Résine	Dissolvant	Temps	Température	Agitation
1 v	3 v	2 heures	ambiante	oui
2 v	2 v	2 heures	ambiante	oui
3 v	1 v	2 à 12 heures	ambiante	oui
Résine	0 v	2 heures	ambiante	oui
Résine	0 v	O/N	ambiante	oui

L'inclusion consiste à introduire le matériel biologique dans une résine fluide qui polymérisera jusqu'à devenir solide, de sorte qu'il soit possible de la tailler en coupes semifines et ultrafines. En microscopie électronique à transmission, on peut utiliser divers types de résines dont l'épon (Luft, 1961), l'araldite (Glauert & Glauert, 1958) et le Spurr (Spurr, 1969). Pour notre étude, nous avons utilisé la résine Spurr qui a la composition ci-dessous :

- Monomère
10 grammes de 4-Vinylcyclohexene dioxide ou ERL
- Additif
6 grammes de DER resin 736 ou DER
- Durcisseur
26 grammes de (2-Nonen-1-yl) succinic anhydride ou Nonenyl succinic anhydride ou NSA
- Accélérateur
0,4 grammes de diméthylaminoéthanol ou DMAE ou S-1
- Plastifiant
0,8 grammes de dibutyl phthalate ou DBP

Par ailleurs, la résine Spurr présente les propriétés suivantes :

- insoluble dans l'eau
- ne change pas de volume au cours de la polymérisation
- assure une bonne dureté des coupes
- stable sous le faisceau d'électrons.

La résine Spurr présente également une certaine toxicité. D'où la nécessité de la manipuler sous la hotte.

Nous avons effectué nos inclusions de matériel biologique (d'environ 0,5 mm³) dans des moules d'inclusion à plat. Les blocs sont ensuite numérotés, pour pouvoir identifier le matériel. Pour une bonne polymérisation de la résine, les moules sont finalement gardés à

l'étuve à 60 °C pendant 48 heures. Ainsi, nous obtenons de petits blocs de résine dans lesquels le matériel biologique apparaît noir. Cette coloration est due de l'action de l'osmium.

Pour gagner du temps au moment de la réalisation des coupes semifines et ultrafines, il est important d'effectuer chaque fois une bonne orientation du matériel biologique au cours de l'inclusion. Cette orientation nous permet ensuite de localiser facilement les parties du matériel qui présentent un intérêt pour notre étude.

Ultramicrotomie

Une fois le matériel inclus dans la résine, nous avons taillé les blocs en pyramide avec le pyramitome Reichert TM-60.

Avec l'ultramicrotome Reichert-Jung Ultracut E nous avons réalisé les coupes semifines (d'environ 0,5-1 μm d'épaisseur) à l'aide d'un couteau de verre confectionné au « *Knifemaker* » LKB. Les coupes semifines, déposées sur une lame et collées par la chaleur (à l'aide d'une platine chauffante) sont colorées avec une solution de bleu de méthylène à 0,5 % et de borax (borate de sodium) à 0,5 %. Les coupes sont ensuite observées au microscope photonique pour localiser des zones d'intérêt pour notre étude (testicules, canal déférent) et amoindrir la zone du matériel (encore avec le pyramitome) afin de procéder aux coupes ultrafines (Figures 16-21). Les coupes ultrafines (de l'ordre de 60-90 nm d'épaisseur) sont effectuées à l'ultramicrotome Reichert-Jung Ultracut E, mais avec cette fois-ci un couteau de diamant. Finalement, les coupes sont étirées avec de la vapeur de xylol et recueillies sur des grilles de cuivre de 200 mesh qui dans certains cas (par exemple coupes de matériel contenant des œufs) sont recouvertes d'une membrane de formvar. Ces grilles sont utilisées comme supports des coupes ultrafines pour leur observation au microscope électronique à transmission.

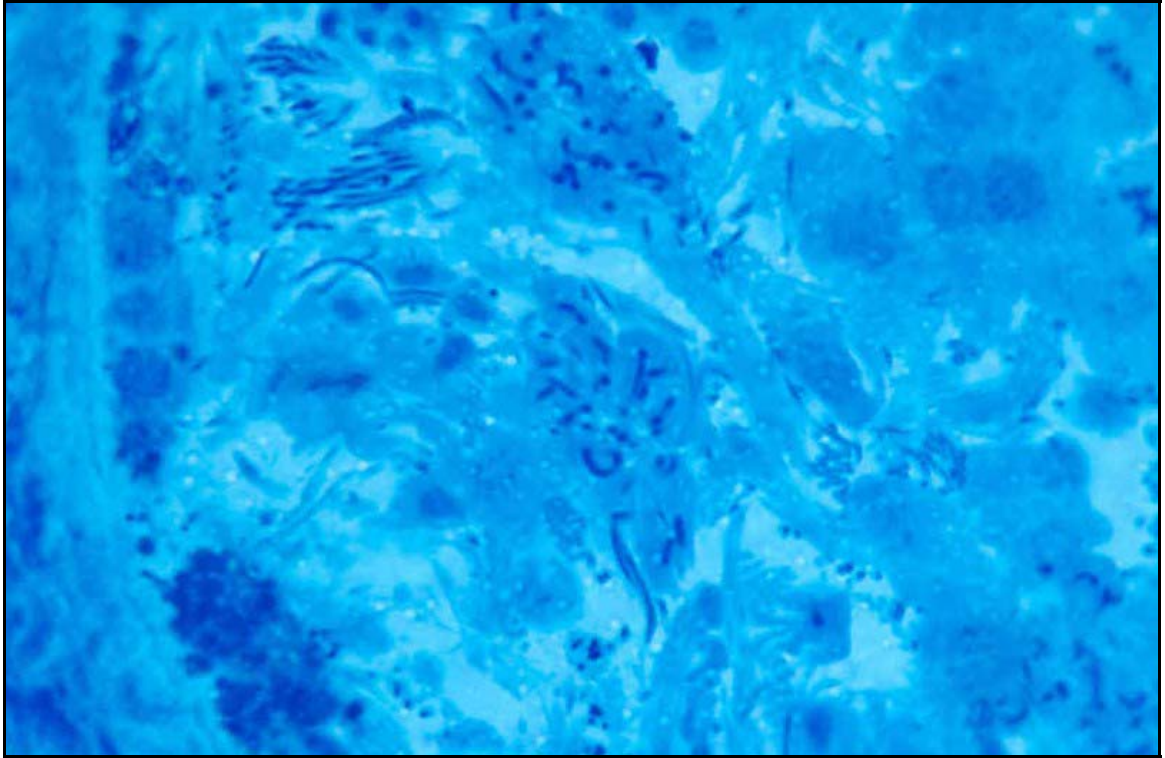


Figure 16 : Image au microscope photonique d'une coupe semifine montrant des spermatides au niveau du testicule de *Fasciola gigantica*.



Figure 17 : Image au microscope photonique d'une coupe semifine montrant des spermatozoïdes dans le canal déférent de *Fasciola hepatica* récoltée chez *Bos taurus*.

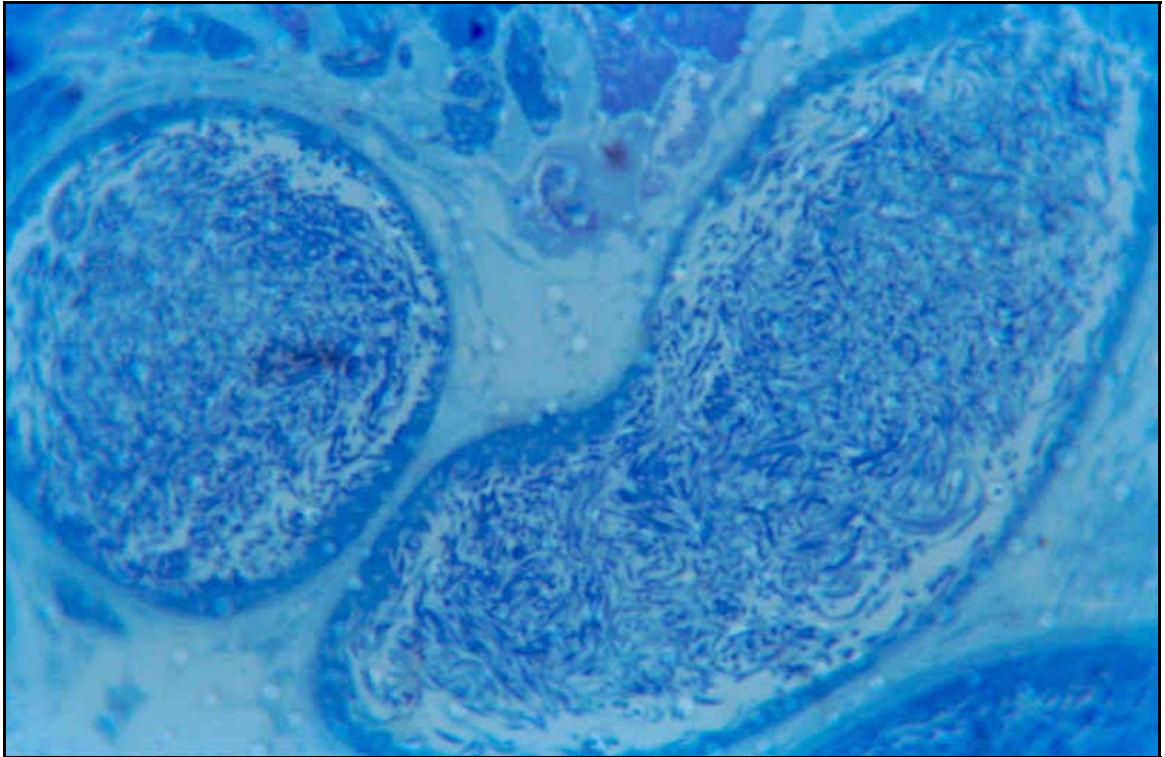


Figure 18 : Image au microscope photonique d'une coupe semifine de *Notocotylus neyrai* au niveau du canal déférent.

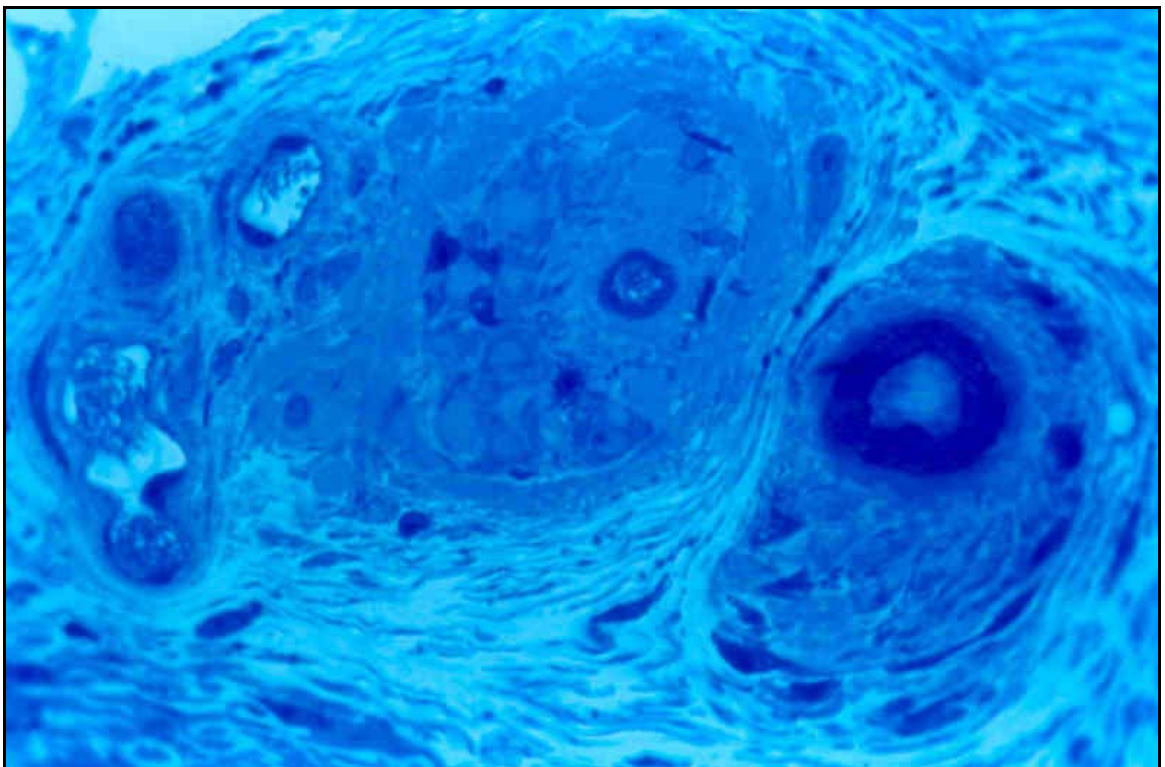


Figure 19 : Image au microscope photonique d'une coupe semifine de *Taenia parva* au niveau de la poche du cirre.

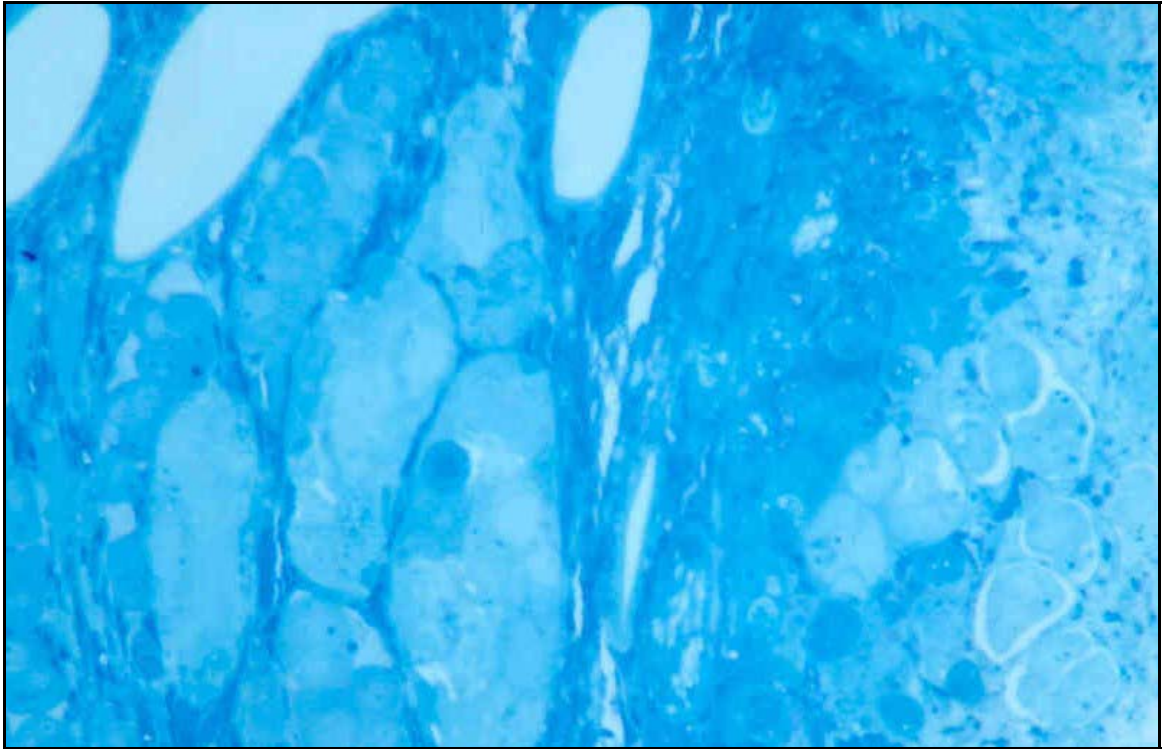


Figure 20 : Image au microscope photonique d'une coupe semifine au niveau des testicules de *Joyeuxiella echinorhynchoides*.

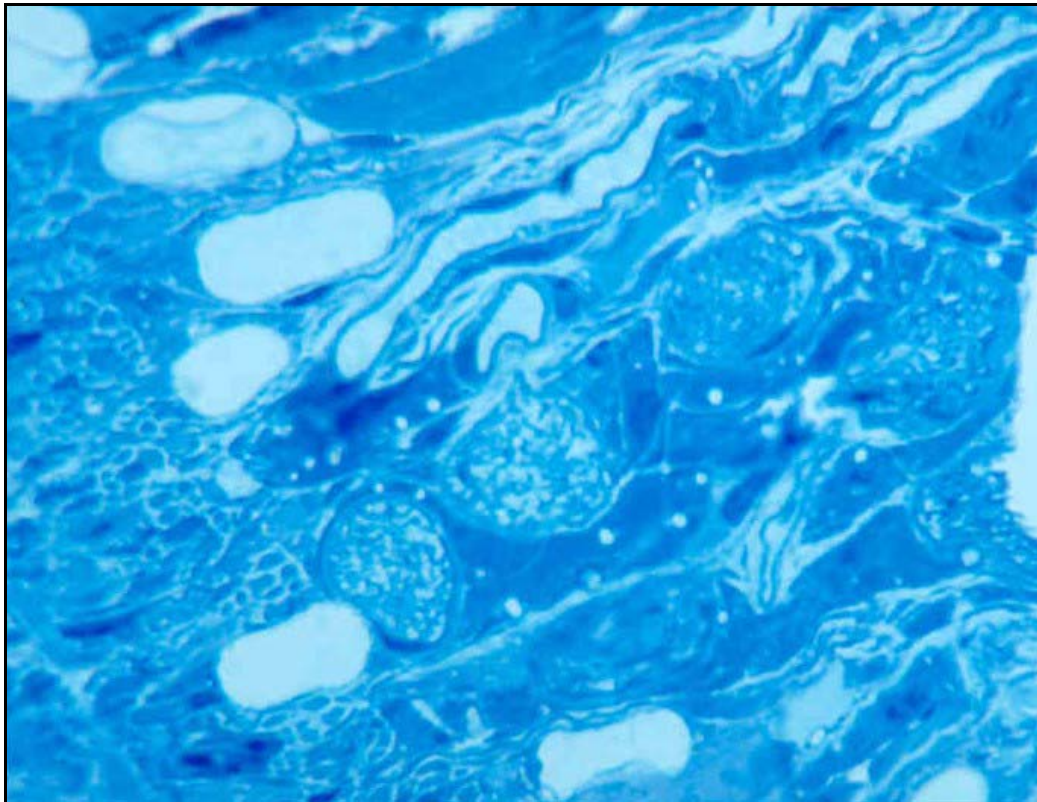


Figure 21 : Image au microscope photonique d'une coupe semifine montrant le canal déférent de *Joyeuxiella pasqualei*.

Contraste des coupes ultrafines et observations au MET

Si on observe directement les coupes ultrafines au MET, on voit que les différentes structures biologiques sont très peu contrastées. C'est pour cette raison qu'il est indispensable de contraster les grilles avec des sels de métaux lourds. Ce qui permet aux différents constituants des cellules d'apparaître avec différents gradients de contraste, en fonction de leur intensité d'imprégnation avec ces sels. Pour notre étude, nous avons utilisé l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb selon la méthode de Reynolds (Reynolds, 1963) :

- 30 minutes sur une goutte d'acétate d'uranyle (solution aqueuse à 2 %) à l'obscurité
- 10 minutes sur une goutte de citrate de plomb.

Cependant, il faut faire très attention à la manipulation de l'acétate d'uranyle qui est une substance toxique et faiblement radioactive. Les solutions d'acétate d'uranyle sont instables à la lumière. Pour cela, leur manipulation doit s'effectuer en gardant au maximum la solution à l'abri de la lumière.

Après avoir contrasté les coupes, nous avons observé les grilles aux MET Hitachi-600 et Hitachi-800 avec une accélération de 75 Kv. Les plaques photographiques ont été exposées pendant une durée de 2 secondes pour Hitachi-600 et entre 4 à 5 secondes pour Hitachi-800. Nous avons réalisé nos observations aux Services Scientifico Techniques de l'Université de Barcelone (Espagne) et au Laboratoire Parasites et Écosystèmes Méditerranéens de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Corse (Corte, France).

2. 2. 2. 2. Étude des spermatozoïdes *in toto* : Technique de « *whole mount* »

L'utilisation de la technique de « *whole mount* » (Friess & Sinowatz, 1984) nous a permis d'effectuer des observations de spermatozoïdes « *in toto* » (dans notre étude de *F. hepatica*) au MET afin d'obtenir des informations sur la morphologie externe du spermatozoïde, mais également quelques informations sur l'intérieur du gamète en raison de sa faible épaisseur et de l'important pouvoir de pénétration des électrons. Pour cela, nous avons extrait le sperme de parasites disséqués extemporanément dans des salières contenant du sérum physiologique. Ce passage à l'eau physiologique permet de débarrasser les spermatozoïdes de tout mucus. Ensuite, le mélange eau physiologique-spermatozoïdes est récupéré dans des tubes Eppendorf puis soumis au traitement ci-dessous.

Fixation

Dans un tube Eppendorf, à un volume V de la solution contenant les spermatozoïdes, nous avons ajouté le même volume V de solution fixatrice (solution de glutaraldéhyde à 5 %), de façon à obtenir à la fin une solution de glutaraldéhyde à 2,5 %. Cette solution, contenant les spermatozoïdes est ensuite gardée au froid (4 °C) pendant toute une nuit (ce temps peut être allongé dans certains cas).

Le jour suivant, nous avons procédé à une centrifugation de la solution fixatrice à 2 000 rpm durant 5 minutes afin de maintenir les spermatozoïdes au fond des tubes. Cette étape nous permet de passer d'une solution à l'autre sans perdre de matériel. Elle est également répétée après chaque lavage et après la post-fixation.

Nous avons ensuite rincé notre matériel avec une solution tampon phosphate (PB) 0,1 M à pH 7,4 dans trois bains successifs de 10 minutes chacun à 4 °C.

Ensuite, nous avons procédé à une seconde fixation du matériel à l'aide d'une solution de tétrahydroxyde d'osmium à 1 % en solution PB 0,1 M et renfermant du ferrocyanure de potassium à 0,8 %. Cette phase, qui n'est pas indispensable pour notre matériel, ne doit pas durer plus de 2 heures à 4 °C.

Avec de l'eau bidistillée, nous avons rincé à nouveau le matériel dans trois ou quatre bains successifs de 10 minutes chacun. Le matériel biologique est généralement monté immédiatement sur les grilles après le rinçage. Cependant, si nécessaire, il est possible après rinçage, de garder le matériel biologique en solution PB pendant quelques jours. Dans ce dernier cas, il faudra procéder à un nouveau rinçage avec de l'eau bidistillée avant de monter le matériel sur les grilles. Pour les derniers lavages, nous avons utilisé de l'eau bidistillée au lieu du PB pour éviter, au cours du séchage, la cristallisation des sels contenus dans le tampon.

Montage et observations au MET

Le montage consiste à mettre une goutte de la solution contenant les spermatozoïdes sur une grille de cuivre de 400 mesh recouverte d'une membrane de formvar. Ces grilles sont ensuite séchées dans une boîte pour éviter tout dépôt de poussière sur le matériel. Au moment du montage du matériel sur les grilles, il est également possible de faire de petites dilutions de la solution contenant les spermatozoïdes.

Les grilles séchées ont été observées au MET Hitachi-800 avec une accélération comprise entre 150 et 200 Kv. Les plaques photographiques ont été exposées pendant une durée comprise entre 4,2 et 4,6 secondes.

2. 2. 3. Cytochimie

La cytochimie est un ensemble de techniques de marquage des composés intra ou extracellulaires, destinées à les rendre visibles en microscopie électronique. Elle permet donc de préciser la localisation de diverses substances, et d'en observer le cheminement cellulaire ou tissulaire. Pour cette étude, nous avons utilisé la technique de Thiéry (Thiéry, 1967) qui permet la mise en évidence des polysaccharides intracellulaires.

Mise en évidence des polysaccharides : Technique de Thiéry

La technique de Thiéry (Thiéry, 1967) permet le marquage du glycogène, des mucopolysaccharides et des glycoprotéines intracellulaires. Pour cette raison, nous l'avons utilisée pour détecter le glycogène contenu dans les spermatozoïdes de *F. gigantea*. Pour cela, nous avons placé des coupes ultrafines (de l'ordre de 60-90 nm d'épaisseur) sur des grilles en or que nous avons ensuite traitées suivant le protocole ci-dessous :

- les grilles sont placées dans une solution d'acide périodique à 10 % pendant 20 à 30 minutes
- 3 lavages successifs de 10 minutes avec de l'eau distillée
- les grilles sont ensuite mises dans une solution de thiocarbohydrazide (TCH) à 0,2 % en acide acétique à 20 % pendant 30 à 45 minutes
- procéder encore à des lavages à l'aide de solutions d'acide acétique puis avec de l'eau distillée suivant l'ordre indiqué dans le tableau V.

Tableau V : lavage du matériel soumis à la technique de Thiéry

Lavages	Durée
acide acétique à 10 %	2 x rapide*
acide acétique à 10 %	2 x 15 minutes
acide acétique à 5 %	1 x 5 minutes
acide acétique à 1 %	1 x 5 minutes
eau distillée	3 x 10 minutes
Lavage goutte à goutte avec de l'eau distillée	1 x rapide*

*moins d'une minute

- les grilles sont ensuite placées dans une solution de protéinate d'argent à 1 % durant 30 minutes et à l'obscurité. La solution de protéinate d'argent à 1 % doit être préparée 20 à 30 minutes avant son utilisation. La poudre de protéinate d'argent est déposée à la surface de l'eau, sans agitation. Il est également nécessaire de garder la solution à l'abri de la lumière.
- bien laver les grilles avec de l'eau distillée (5 x 10 minutes) pour éviter la précipitation de la solution de protéinate d'argent.
- bien sécher les grilles à l'aide d'un papier filtre avant de procéder à leur observation.

2. 2. 4. Immunocytochimie

Pour localiser la tubuline contenue dans le cytosquelette du spermatozoïde de *F. hepatica* nous avons utilisé une technique immunocytochimique dite immunomarquage ultrastructural. C'est une technique qui permet de révéler, à l'échelle de la microscopie électronique, la présence d'antigènes dans les tissus, en précisant leur lieu de synthèse ou d'accumulation. Elle est fondée sur l'aptitude des anticorps à se lier aux antigènes. Pour cette raison, les anticorps doivent être spécifiques et dotés d'une grande affinité aux antigènes recherchés.

Mise en évidence ultrastructurale d'une protéine : la tubuline

Nous présentons ci-dessous le protocole suivi pour l'immunolocalisation des tubulines, depuis la fixation du matériel biologique jusqu'aux observations au MET.

Fixation

Les spermatozoïdes vivants sont fixés pendant 4 à 5 heures à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde à 4 % et de glutaraldéhyde à 0,5 % dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,2. Le paraformaldéhyde est un polymère du formol. Il se dissout dans l'eau légèrement alcaline, à chaud si la solution est concentrée.

Après la fixation, nous avons gardé notre matériel dans une solution intermédiaire de paraformaldéhyde à 4 % qui permet sa conservation, si besoin, pendant plusieurs semaines sans altération des structures biologiques. Ce procédé est intéressant lorsque la fixation du matériel doit être faite sur le terrain où il est impossible de procéder immédiatement après à la déshydratation et à l'inclusion.

Le stockage du matériel dans la solution de paraformaldéhyde à 4 % nécessite de procéder au préalable à deux rinçages à froid (4 °C), de 15 minutes chacun, dans une solution de chlorure

d'ammonium (NH₄Cl) 150 mM dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,4. Ceci permet le blocage des groupements aldéhydes libres.

Lavage et déshydratation

Nous avons déshydraté notre matériel avec de l'éthanol suivant le procédé appelé « *Progressive Lowering of Temperature* » (PLT) indiqué dans le tableau VI ci-dessous. Le matériel est au préalable soumis à deux rinçages de 15 minutes chacun avec un tampon cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,4 à 4 °C.

Tableau VI : déshydratation pour l'immunomarquage

Agent déshydratant	Temps	Température	Agitation
Ethanol 25°	1 x 30 minutes	4 °C	Oui
Ethanol 50°	1 x 60 minutes	- 20 °C	Oui
Ethanol 70°	O/N	- 35 °C	Oui
Ethanol 96°	1 x 60 minutes	- 35 °C	Oui
Ethanol 100°	2 x 60 minutes	- 35 °C	Oui

O/N = « *over night* »

Imprégnation et inclusion

Elle consiste à substituer totalement l'éthanol par la résine Lowicryl K4M qui polymérise jusqu'à - 40 °C suivant la méthodologie indiquée dans le tableau VII.

Tableau VII : Imprégnation et inclusion en Lowicryl

Résine/Dissolvant	Temps	Température	Agitation
1/3	2 heures	- 35 °C	Oui
2/2	2 heures	- 35 °C	Oui
3/1	O/N	- 35 °C	Oui
Lowicryl pur	4 heures	- 35 °C	Oui
Lowicryl pur	O/N	- 35 °C	Oui

O/N = « *over night* »

Le Lowicryl K4M ne polymérise pas au contact de l'oxygène. Pour cette raison, nous avons utilisé des capsules de gélatine pour la réalisation des blocs, afin d'éviter tout contact avec l'oxygène. Ainsi, la polymérisation s'effectue dans les mêmes conditions que l'imprégnation, sous la lumière ultraviolette pendant 24 heures au moins.

Ultramicrotomie

Les blocs de résine sont ensuite taillés en tronc de pyramide avec le pyramitome (Reichert TM-60) et les coupes semifines et ultrafines sont effectuées à l'ultramicrotome (Reichert-Jung Ultracut E) de la même manière que pour les blocs de résine Spurr (voir paragraphe 2.2.2.1.). La seule différence est que pour la résine Lowicryl K4M, il faut éviter de mouiller les blocs en les coupant. Pour cela, nous avons réalisé les coupes semifines à sec et les coupes ultrafines avec une petite quantité d'eau dans la cuve support du couteau de diamant.

Immunomarquage ultrastructural

Cette méthode, basée sur la réaction anticorps-antigène est appliquée sur les grilles contenant les coupes ultrafines. Pour le cas de *F. hepatica*, nous avons utilisé la méthode dite indirecte (ou méthode « sandwich ») qui fait intervenir un anticorps primaire qui va se lier à l'antigène et un anticorps secondaire couplé à un marqueur (or colloïdal). Ainsi, pour détecter l' α -tubuline, la β -tubuline, la tubuline acétylée et la tubuline tyrosinée contenues dans le spermatozoïde de *F. hepatica*, nous avons utilisé les anticorps monoclonaux anti- α -tubuline¹, anti- β -tubuline², anti-tubuline acétylée³ et anti-tubuline tyrosinée⁴ comme anticorps primaires et le *Goat anti-mouse*⁵ couplée à des particules d'or colloïdal de 15 nm (Lamberts & Goldsmith, 1985) comme anticorps secondaire. La méthodologie suivie pour le traitement des grilles est la même pour les différents anticorps :

- Préincubation des grilles contenant les coupes ultrafines avec une solution tampon phosphate saline (PBS) 0,1 M à pH 7,4 contenant 1 % d'albumine sérique de bœuf (BSA) et de la glycine (20 mM) pendant 30 minutes à température ambiante.
- Incubation des grilles avec un anticorps (anti-tubuline) dilué à l'aide de la solution PBS (0,1 M ; pH 7,4) contenant BSA (1 %) et de la glycine. Pour cette étude, nous avons essayé différentes dilutions pour chaque anticorps et un contrôle. Cette phase dure deux heures à température ambiante.
- Lavage (3 x 15 minutes à température ambiante) avec la solution PBS (0,1 M ; pH 7,4) contenant BSA (1 %) et de la glycine (20 mM).
- Incubation : une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué (1/25) à l'aide de la solution PBS (0,1 M ; pH 7,4).
- Lavage (4 x 5 minutes à température ambiante) avec la solution PBS (0,1 M ; pH 7,4).
- Lavage (4 x 5 minutes à température ambiante) avec le mili Q.

¹ Clone NS-1 x Balb/C₅₇ spleen cells, Amersham N-356

² Clone TUB 2.1, mouse ascites fluid, Sigma T-40266

³ Clone 6-11 B-1, mouse ascites fluid, Sigma T-6793

⁴ Clone TUB-1A2, mouse ascites fluid, Sigma T-9028

⁵ Goat anti-mouse, 15 nm gold, British Biocell EM-GAM 15

- Lavage à « *jet wash* » avec le mili Q.
- Sécher les grilles à l'aide d'un papier filtre.

Contraste des coupes ultrafines et observations au MET

Les grilles sont colorées à l'aide d'une solution d'acétate d'uranyle (10 minutes) et une solution de citrate de plomb (3 minutes).

Les observations ont été effectuées au microscope électronique à transmission JEOL 1010 avec une accélération de 80 Kv. Les plaques photographiques ont été exposées pendant une durée de 2 à 2,6 secondes.