



Étude Ultrastructurale de la Spermiogenèse et du Spermatozoïde chez les Cestodes. Apports en Taxonomie et Phylogénie

Adji Mama Marigo

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

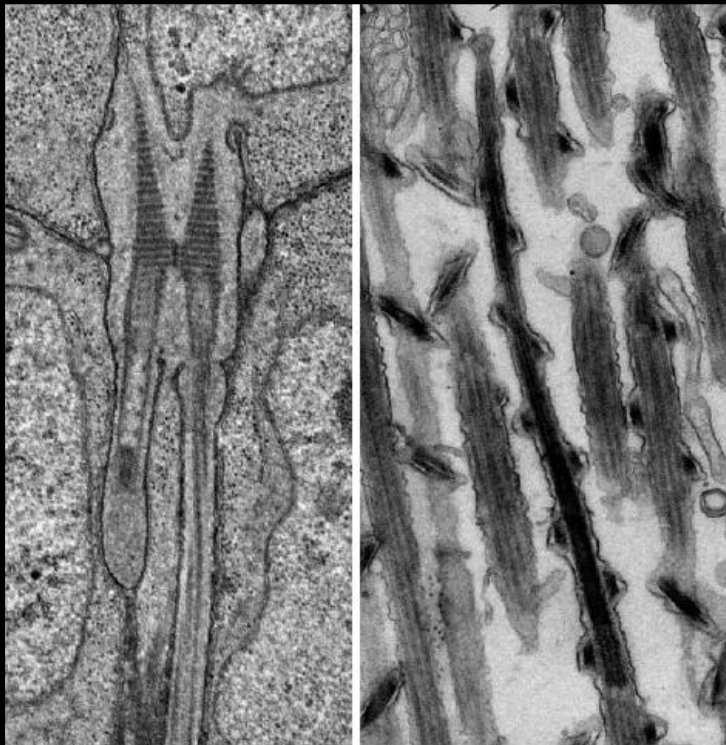
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en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

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



FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I
PARASITOLOGIA SANITÀRIES

**Etude Ultrastructurale de la Spermiogenèse
et du Spermatozoïde chez les Cestodes.
Apports en Taxonomie et Phylogénie**



ADJI MAMA MARIGO
2011



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I PARASITOLOGIA SANITÀRIES

TESIS DOCTORAL

**Etude Ultrastructurale de la Spermio-genèse et
du Spermatozoïde chez les Cestodes.
Apports en Taxonomie et Phylogénie**

MARIGO 2011

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I PARASITOLOGIA SANITÀRIES

PROGRAMA DE DOCTORADO:

Investigación, Desarrollo y Control de Medicamentos

**Etude Ultrastructurale de la Spermiogenèse et
du Spermatozoïde chez les Cestodes.
Apports en Taxonomie et Phylogénie**

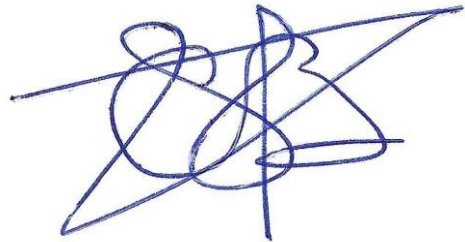
Memoria presentada por: ADJI MAMA MARIGO

Para optar al título de Doctor por la Universidad
de Barcelona

Los Directores:



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



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

La Doctoranda:



Adji Mama Marigo

Marigo 2011

TABLE DES MATIERES

ABSTRACT	5
REMERCIEMENTS	7
RESUMEN	13
CHAPITRE I : INTRODUCTION	43
I.1. Intérêt des études ultrastructurales de la spermiogénèse et du spermatozoïde des Plathelminthes parasites	44
I.2. Etat actuel des connaissances sur la spermiogénèse et le spermatozoïde des Eucestoda	50
I.3. Objectifs	64
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	69
II.1. Caractères morpho-anatomiques et bio-écologiques des espèces étudiées	69
II.1.1. <i>Acanthobothrium crassicolle</i> Weld, 1855	71
II.1.2. <i>Aporhynchus menezesi</i> Noever <i>et al.</i> , 2010	76
II.1.3. <i>Barsonella lafoni</i> de Chambrier <i>et al.</i> , 2009	82
II.1.4. <i>Clestobothrium crassiceps</i> (Rudolphi, 1819)	86
II.1.5. <i>Echinobothrium euterpes</i> (Neifar <i>et al.</i> , 2001)	90
II.1.6. <i>Molluscotaenia crassiscole</i> x (von Linstow, 1890)	95
II.2. Préparation des cestodes pour leur étude ultrastructurale au microscope électronique à transmission	100
II.2.1. Fixation	100
II.2.2. Déshydratation	103
II.2.3. Inclusion	104

II.2.4. Microtomie et ultramicrotomie	107
II.2.5. Contraste des coupes ultrafines	109
II.2.6. Mise en évidence des polysaccharides : technique de Thiéry	110
 CHAPITRE III : RESULTATS	 115
 III.1. Caractères spermatologiques de <i>Acanthobothrium crassicolle</i> Wedl, 1855 (Tetraphyllidea, Onchobothriidae), parasite de la raie commune, <i>Dasyatis pastinaca</i>	 117
III.2. Etude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde du cestode <i>Aporhynchus menezesi</i> (Trypanorhyncha : Aporhynchidae), parasite du sagre commun, <i>Etmopterus spinax</i> (Elasmobranchii : Etmopteridae)	 131
III.3. Etude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde de <i>Barsonella lafoni</i> de Chambrier <i>et al.</i> , 2009 (Cestoda : Proteocephalidea), parasite de <i>Clarias gariepinus</i> (Siluriformes : Clariidae)	 143
III.4. Etude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde du cestode <i>Clestobothrium crassiceps</i> (Rudolphi, 1819) (Bothriocephalidea), parasite du poisson téléostéen <i>Merluccius merluccius</i> (Gadiformes : Merlucciidae)	 159
III.5. Etude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde du cestode <i>Echinobothrium euterpes</i> (Neifar, Tyler & Euzet 2001) Tyler 2006 (Diphyllidea), parasite de la raie guitare, <i>Rhinobatos</i> <i>rhinobatos</i>	 173
III.6. Etude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde du cestode <i>Molluscoetaenia crassiscolex</i> (von Linstow, 1890) (Dilepididae), parasite intestinal de la musaraigne commune, <i>Sorex araneus</i>	 189
 CHAPITRE IV : DISCUSSION	 203
 IV.1. Spermiogenèse	 203
IV.2. Spermatozoïde	211

CHAPITRE V : CONCLUSIONS	239
BIBLIOGRAPHIE	245

ABSTRACT

The present Thesis constitutes a contribution to the knowledge of ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of cestodes. New spermatological data concerning species belonging to six orders of Eucestoda are presented. These species are *Acanthobothrium crassicolle* Wedl, 1855 (Tetraphyllidea), *Aporhynchus menezesi* Noever *et al.*, 2010 (Trypanorhyncha), *Barsonella lafoni* de Chambrier *et al.*, 2009 (Proteocephalidea), *Clestobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819) (Bothriocephalidea), *Echinobothrium euterpes* (Neifar *et al.*, 2001) (Diphyllidea) and *Molluscoctenia crassiscolex* (von Linstow, 1890) (Cyclophyllidea). The obtained results on spermiogenesis and the spermatozoon are compared with the available data on the remaining eucestodes, particularly with the orders discussed in the present study. Moreover, the usefulness of different spermatological characters for Taxonomy, Systematics and Phylogeny is discussed.

The spermatological study of *Clestobothrium crassiceps* constitutes the first work on this genus, being the eleventh species studied within the recently created Bothriocephalidea. Results are compared particularly with the remaining representatives of the order, but also with the Diphyllbothriidea, the other order erected from the former Pseudophyllidea. Concerning spermiogenesis, the most interesting features of *C. crassiceps* are the type II pattern of spermiogenesis and the reduced intercentriolar body. Remarkably, the type II spermatozoon presents a ring of cortical microtubules, which probably constitutes an autapomorphy for the Bothriocephalidea.

The ultrastructural study of *Echinobothrium euterpes* shows the formation of two unequal flagella. In advanced stages of spermiogenesis, after the proximodistal fusion, the shortest axoneme disappears and a spermatozoon of only one axoneme is formed. Spermiogenesis corresponds to type I and the spermatozoon corresponds to type IV. Other interesting characters of Diphyllidea are the strong reduction or absence of cortical microtubules and the presence of dense masses associated to the centrioles in the zone of differentiation. The latter character could be a synapomorphy for the species of this order.

Aporhynchus menezesi follows a type I spermiogenesis and exhibits a type I spermatozoon. The study produced the first data on the superfamily Gymnorhynchoidea. The absence of crested bodies and the presence of an arc-like row of cortical microtubules in the mature spermatozoon are confirmed in the Trypanorhyncha.

The study of *Acanthobothrium crassicolle* is the third on this genus and confirms the type I spermiogenesis and the type II spermatozoon. This type of spermatozoon is confirmed as the most important difference between onchobothriids and phyllobothriids. The presence of an arc-like row of cortical microtubules is also confirmed. Contrarily, heterogeneity in intercentriolar bodies was observed in the Tetracystidae-Onchobothriidae.

Barsonella lafoni is the seventh species of the order in which the sperm ultrastructure has been studied. It shows the pattern I both for spermiogenesis and the spermatozoon. These results are congruent with the remaining analysed species, except for *Sandonella sandoni*. A reduced intercentriolar body and an arc-like row of cortical microtubules are generally present in all the studied proteocephalideans. A particularity of *B. lafoni* is the description for the first time of an electron-dense material in the differentiation zone during the initial stages of spermiogenesis. To date, this character had been considered typical of basal orders of Eucestoda.

Finally, *Molluscotaenia crassiscolex* follows a type IV spermiogenesis and its spermatozoon is ultrastructurally arranged as a type VI. These two patterns are coincident with the available studies on dilepidids. The most interesting feature present in the spermatozoon is the particular morphology of the single crested body, partially detached in the central areas. Results are compared with the Dilepididae *s.l.*

KEY WORDS: Ultrastructure, Spermiogenesis, Spermatozoon, Taxonomy, Systematics, Phylogeny, Platyhelminthes, Eucestoda, Bothriocephalidea, Cyclophyllidea, Diphyllidea, Proteocephalidea, Tetracystidae, Trypanorhyncha, *Acanthobothrium crassicolle*, *Aporhynchus menezesi*, *Barsonella lafoni*, *Clestobothrium crassiceps*, *Echinobothrium euterpes*, *Molluscotaenia crassiscolex*.

Remerciements

Trois ans... C'est le temps qu'il m'aura fallu pour en arriver là. Trois années... Certains diront que ce ne fut que trois ans ! Qu'est-ce que trois ans dans toute une vie ?

Mais la thèse est presque une vie en soit. C'est en tout cas une tranche de vie où tout bouge, tout change. C'est aussi une période où on mûrit, on grandit, on devient plus sage.

C'est trois dernières années furent marquées d'évènements majeurs. Qu'ils furent heureux ou malheureux chacun d'entre vous y a participé ou assisté. Au cours de ces trois ans, j'ai expérimenté toute la gamme des sentiments possibles. De l'espoir, il y en a eu souvent, du désespoir aussi parfois. Même si l'enthousiasme fut de mise, il y a eu malgré tout des moments de découragement et de doute. Il y a eu également des moments d'exaltation, de passion, de tristesse et de joie. Néanmoins, le sentiment qui aura le plus dominé tout de même tout au long de ces trois ans, aura été le bonheur; le bonheur d'avoir partagé ces trois années avec vous. Trois années d'une vie... trois années de Ma vie !

Lorsque vient le temps des remerciements une multitude de noms se bousculent dans ma tête. Il faut dire, et vous l'aurez compris, que de

nombreuses personnes, projets et aussi la « Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) del Ministerio de Asuntos exteriores y de Cooperación de España » ont contribué à son élaboration et à son aboutissement. C'est pour cela que je tiens à les remercier tous car sans eux, ce travail n'aurait jamais abouti.

En premier lieu, je voudrais exprimer ma profonde gratitude à l'AECID pour m'avoir attribué une bourse de trois années (réfs. 2008-09 no. 0000268801 ; 2009-10, no. 0000448124 et 2010-11, no. 0000538056), ce qui m'a permis d'être à l'abri du besoin et de pouvoir me consacrer uniquement à mon travail.

La présente thèse a également pu être réalisée grâce à plusieurs projets, dont le Projet de Coopération Interuniversitaire (PCI) entre l'Espagne et la Tunisie de l'AECID (réfs. A/2390/05, A/6244/06, A/015863/08 et A/023585/09) qui a permis l'obtention de certaines espèces étudiées, mais aussi, les projets 2009SGR403 de la « Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya » et CGL2009-07759/BOS de la « Secretaría de Estado de Educación, Universidades, Investigación y Desarrollo (SEID) del Ministerio de Educación de España » qui ont financé en partie cette étude.

Un très grand remerciement est aussi attribué aux Docteurs Janine N. Cairra du « Department of Ecology and Evolutionary Biology of the University of Connecticut, Storrs (USA) », Céline Levron de l' « Institute of Parasitology of the Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice (Czech Republic) » et Eulàlia Delgado du « Departament de Ciències Ambientals de la Facultat de Ciències de l'Universitat de Girona (Espanya) » qui ont bien voulu mettre à notre disposition une partie du matériel étudié dans cette thèse.

Egalement, je souhaiterai remercier vivement tous les membres de l'Unité de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Barcelone pour ces trois années passées en leur compagnie. Je me suis sentie avec eux comme au sein de ma propre famille. Il faut dire que durant ces trois dernières années, j'ai passé plus de temps au sein du laboratoire qu'au sein de ma propre famille ! Je les remercie donc pour leur bonne humeur, leur écoute, leur aide et leur soutien.

Parmi ces membres, je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Dr. Jordi Miquel. Il fut plus qu'un encadreur, plus qu'un directeur de thèse. Sa contribution à la réalisation de ce travail a été des plus précieuses. Merci pour l'encadrement sans faille, le soutien, les conseils et surtout, pour les bonnes conditions de travail. Nos discussions et nos excursions me manqueront.

Merci également au Professeur Carlos Felú pour les nombreuses discussions scientifiques qui furent stimulantes et très enrichissantes et pour les nombreuses sorties fort agréables et très instructives.

Merci à Abdoulaye Jacque Sacodou Bakhoum mon compagnon d'infortune pour son soutien et sa confiance quotidienne. Merci pour tout ce que tu m'as apporté, tant du point de vue professionnel que du point de vue personnel ! Les moments partagés ensemble resteront parmi les meilleurs passés au labo.

Merci aux Docteurs Isabel de Montoliu et María Soledad Gómez; ces femmes pour qui j'ai la plus grande admiration et le plus grand respect; pour tout ce qu'elles m'ont apporté, sans même le savoir parfois. Les nombreuses discussions et les divers conseils furent d'un grand apport.

Merci également au Docteur Jordi Torres pour son amabilité et son humilité. Vous restez pour moi un modèle en de nombreux points.

Merci aux Docteurs Alexis Ribas, Juan Matías Segovia, Joan Carles Casanova, Mercedes Gracenea, Cristina Riera, Montserrat Gállego, Olga González-Moreno, Mercedes Villa, Laura Iniesta, Soledad Castillejo et Roser Fisa pour les nombreux échanges, tant instructifs, et les multiples sourires !

Merci également au Docteur Catarina Eira de la « Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem, Estação de Campo de Quiaios (Portugal) » pour sa précieuse aide dans la correction de l'anglais pendant la rédaction de mes différents articles ; tes commentaires et suggestions ont toujours été utiles.

Merci également au Professeur Bernard Marchand, directeur du Laboratoire Parasites et Ecosystèmes Méditerranéens de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Corse (Corte, France) pour avoir accepté de nous héberger pendant notre stage en Corse. Merci également à tous les membres du Laboratoire pour leur sympathie.

Un autre remerciement spécial à tout le personnel de la « Unitat de Microscòpia, Facultat de Medicina, Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB) », particulièrement au Docteur Núria

Cortadellas et à Almudena García pour leur précieuse aide dans la préparation du matériel pour la microscopie électronique. Les instants passés ensemble resteront à jamais gravés dans nos mémoires.

Ensuite je tiens à remercier les membres du Département de Biologie Animale de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et tout particulièrement les professeurs du Département pour m'avoir procuré les bases de ma formation, de ce que je suis aujourd'hui. Ils ont cultivé en moi le goût de la science et de la recherche.

Parmi ces membres, mérite un spécial remerciement le Professeur Cheikh Tidiane Bâ, chef du Laboratoire de « Biologie évolutive, écologie et gestion des écosytèmes » et aussi co-directeur de la présente thèse. Il fut un élément clé dans ma carrière. Il m'a servi de modèle et m'a toujours montré un soutien sans faille surtout dans les moments difficiles. Merci d'avoir accepté de co-diriger ma thèse malgré vos nombreuses charges académiques.

Merci également au Docteur Papa Ibnou Ndiaye, Assistant dans le même Département, pour ses encouragements et ses suggestions. Les moments passés ensemble seront inoubliables et notre amitié m'est des plus précieuses.

Merci également aux Docteurs Aminata Sène, Pape Mbacké Sembène et Ibrahima Ndiaye, pour leurs conseils, leur écoute, leur gentillesse et bien plus encore...

Un remerciement est aussi attribué au Docteur Pilar Foronda, à Mercedes López-González, Angela Fernández, Santi Sánchez, Carlos Miguel Ramírez, Silvia Valent, María Luisa Martínez, Antonia Perera, Esther Negre Perera, Abdou Mawa Ndiaye, Fatoumata Camara, Joséphine Khady Badiane, Mariama Bâ, Fatou Salam Mbengue, Marie Boury, Fatou Sow Coundoul... à toutes les personnes, de toutes les nationalités confondues, avec qui j'ai partagé de bons moments durant mes années de vie étudiante, durant les multiples sorties et durant mon séjour à Barcelone.

Je ne saurais terminer sans pour autant remercier M. Xavier Mattei, Professeur émérite à l'Université de Corse (Corte, France) et Docteur Céline Levron de l' « Institute of Parasitology of the Biology Centre of the Czech Academy of Sciences (České Budějovice, Czech Republic) » pour avoir accepté de présenter un rapport sur cette thèse, indispensable à l'obtention de la Mention de Docteur Européen.

Merci aussi aux correcteurs anonymes de Acta Parasitologica, Acta Zoologica (Stockholm), Folia Parasitologica, Parasitology Research et Zoologischer Anzeiger pour leurs commentaires et suggestions qui nous ont permis d'améliorer les publications présentées dans cette thèse. Merci également aux nombreux chercheurs (Zdzisław P. Świdorski, Céline Levron, Aneta Yoneva, Jean-Lou Justine, Bernard Marchand, Yann Quilichini, Magdalena Bruňanská...) qui nous ont fourni des documents ou articles qui, dans certains cas, n'étaient pas encore publiés.

Merci aux membres du jury, les Docteurs Zdzisław P. Świdorski du « W. Stefański Institute of Parasitology of the Polish Academy of Sciences (Warsaw, Poland) », Carlos Feliu et Jordi Torres du Département de Microbiologie et Parasitologie Sanitaires de l'Université de Barcelone pour avoir accepté de juger mon modeste travail.

Merci à tous les membres de ma famille pour leur soutien sans faille. Merci à tous, oncles, tantes, cousins, cousines, neveux, nièces et grand parents. Merci à mes frères et sœurs pour tout ce qu'ils m'ont apporté.

Merci à mon père pour son soutien et sa confiance en moi et pour tout ce qu'il m'a apporté ; vous êtes pour moi un repère en de nombreux points.

Enfin merci à toi, Maman, pour ton amour sans faille, tes conseils, ta confiance, ton soutien... Tout ceci est aussi le résultat de ton travail...

Un remerciement spécial à mon époux pour avoir eu confiance en moi, pour les merveilleux moments passés ensemble et les instants magiques partagés. Merci pour ton sourire et pour avoir éclairé ma vie d'un doux rayon de bonheur. Continue de me faire rêver...

*A toutes les personnes qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui, je dis **un grand merci !***

**ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LA ESPERMIOGENESIS
Y DEL ESPERMATOZOIDE EN LOS CESTODOS.
APORTACIONES EN TAXONOMIA Y FILOGENIA**

Palabras clave: ultraestructura, espermiogénesis, espermatozoide, Taxonomía, Sistemática, Filogenia, Platelminos, Eucestoda, Bothriocephalidea, Cyclophyllidea, Diphyllidea, Proteocephalidea, Tetrephyllidea, Trypanorhyncha, *Acanthobothrium crassicolle*, *Aporhynchus menezesi*, *Barsonella lafoni*, *Clestobothrium crassiceps*, *Echinobothrium euterpes*, *Molluscotaenia crassiscolex*

RESUMEN

Introducción

El estudio ultraestructural de la espermiogénesis y del espermatozoide en los platelmintos en general y en los cestodos en particular ha aportado desde su inicio unos resultados de gran utilidad en la interpretación de las relaciones filogenéticas en estos grupos (Euzet *et al.*, 1981; Ehlers, 1984; Świdorski, 1986a; Justine, 1991a, 1995, 1998a, 2001; Bâ & Marchand, 1995; Levron *et al.*, 2010).

Prueba de ello, en los últimos años se ha promulgado, dentro de la comunidad científica, la necesidad de integrar la morfología clásica con los estudios moleculares y los ultraestructurales, no sólo los espermatológicos, para llegar a una mejor comprensión de las relaciones filogenéticas en los platelmintos. Así, estudios como los de Hoberg *et al.* (1997, 2001) o Olson *et al.* (2001) son pioneros en esta materia.

En los cestodos existen cuatro patrones espermiogénéticos distintos, descritos por Bâ & Marchand (1995) en función del número de flagelos-axonemas formados (uno o dos), de la presencia o ausencia de rotación flagelar y de la presencia o ausencia de fusión próximo-distal.

En cuanto al espermatozoide, existen siete tipos distintos según el reciente escrito de Levron *et al.* (2010). Dichos tipos han sido postulados en base al número de axonemas (uno o dos), al patrón paralelo o espiralado de los microtúbulos corticales y

del núcleo, y a la presencia o ausencia de cuerpos en cresta helicoidales, de vaina periaxonemal y de paredes intracitoplasmáticas.

En el ámbito de la presente tesis doctoral, cabe apuntar que el estado actual de conocimiento respecto a la ultraestructura de la espermiogénesis y/o del espermatozoide en los cestodos se refiere a más de 100 especies y, aunque es relativamente amplio en ciertos órdenes y familias, en otros la escasez de datos es evidente. Así, el orden más estudiado es el Cyclophyllidea, con más de 50 especies pertenecientes a 12 familias. Por contra, en el resto de órdenes los datos son escasos y en algunos casos plantean interrogantes que futuros estudios deberían resolver.

Objetivos del estudio

En el presente estudio se estudian seis especies de cestodos de seis órdenes distintos. Se trata de *Acanthobothrium crassicolle* Wedl, 1855 (Tetraphyllidea), *Aporhynchus menezesi* Noever *et al.*, 2010 (Trypanorhyncha), *Barsonella lafoni* de Chambrier *et al.*, 2009 (Proteocephalidea), *Clestobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819) (Bothriocephalidea), *Echinobothrium euterpes* (Neifar *et al.*, 2001) (Diphyllidea) y *Molluscotaenia crassiscolex* (von Linstow, 1890) (Cyclophyllidea).

El estudio de *Echinobothrium euterpes*, permitirá establecer el patrón general de formación del espermatozoide en el orden Diphyllidea. Los datos existentes en este orden son confusos, particularmente en lo referente al número de axonemas presentes en el espermatozoide. Además, el estudio de esta especie, descrita inicialmente como *Macrobothridium euterpes* por Neifar *et al.* (2001) y transferida posteriormente al género *Echinobothrium* por Tyler (2006), puede aportar datos ultraestructurales complementarios para valorar esta ubicación sistemática.

Acanthobothrium crassicolle, un Tetraphyllidea-Onchobothriidae, es la quinta especie de la familia y la tercera del género en ser estudiada. Ello debería permitir confirmar el modelo espermiogénético y la organización ultraestructural del espermatozoide de los Tetraphyllidea-Onchobothriidae y compararlos con los observados en los Tetraphyllidea-Phyllobothriidae.

El estudio del Trypanorhyncha es muy interesante, ya que *Aporhynchus menezesi* pertenece a la superfamilia Gymnorhynchoidea. Diversos autores han propugnado la parafilia del orden Trypanorhyncha basándose en criterios morfológicos

y moleculares (Olson *et al.*, 2001; Palm, 2004; Palm *et al.*, 2009). No obstante, sólo existen estudios ultraestructurales completos de especies incluidas en uno de los clados, el formado por los Tentacularioidea y los Eutetrarhynchoidea. Nuestro estudio con *A. menezesi* será el primero efectuado con una especie del otro clado, el formado por los Gymnorhynchoidea, los Lacistorhynchoidea y los Otobothrioidea.

La importancia del estudio del Bothriocephalidea *Clestobothrium crassiceps* radica en el hecho que recientemente los “Pseudophyllidea” se han escindido en dos nuevos órdenes, los Bothriocephalidea y los Diphyllbothriidea, en base a resultados moleculares (Kuchta *et al.*, 2008a). Se trata del primer estudio espermatológico ultraestructural en este género y permitirá, no sólo incrementar la base de datos disponibles, sino también determinar el patrón general de los Bothriocephalidea, remarcando las diferencias con los Diphyllbothriidea.

El análisis del Proteocephalidea *Barsonella lafoni* aportará nuevos datos ultraestructurales en un género todavía no estudiado y permitirá analizar el modelo espermatológico propuesto para este orden y establecer particularidades a nivel subordinal.

Finalmente, *Molluscotaenia crassiscolex* pertenece al orden de Eucestoda más estudiado, el Cyclophyllidea. Los estudios sobre la ultraestructura del espermatozoide son numerosos, aunque existe una diversidad en los modelos espermiogénéticos y en la organización ultraestructural del gameto masculino en este orden. Se trata de la cuarta especie de la familia Dilepididae y primera del género en ser estudiada. Dicho estudio permitirá corroborar el esquema espermatológico general de esta familia y establecer las diferencias entre las familias integrantes de los Dilepididae *sensu lato*.

En este marco, los objetivos concretos planteados son los siguientes:

1. Incrementar el estado de conocimiento referente a la ultraestructura de la espermiogénesis y del espermatozoide en los cestodos.
2. Estudiar diversas especies de cestodos pertenecientes a distintos órdenes con el fin de corroborar los distintos patrones espermiogénéticos en los cestodos y resolver ciertas dudas e incongruencias existentes en la actualidad referentes a la ultraestructura de la espermiogénesis y del espermatozoide.

3. Analizar el interés taxonómico y filogenético de diversos caracteres ultraestructurales de la espermiogénesis y del espermatozoide, en particular los presentes en los grupos objeto de estudio.

Material y métodos

Se ha estudiado seis especies de cestodos pertenecientes a seis órdenes distintos. Se trata de:

- *Acanthobothrium crassicolle* Wedl, 1855 (Tetraphyllidea), extraído de la válvula espiral de una raya pastinaca *Dasyatis pastinaca* (Linnaeus, 1758) (Rajiformes, Dasyatidae) capturada en las costas de Sidi Mansour (Túnez).
- *Aporhynchus menezesi* Noever *et al.*, 2010 (Trypanorhyncha), extraído a nivel intestinal de un negrito *Etmopterus spinax* (Linnaeus, 1758) (Elasmobranchii, Etmopteridae) capturado en las costas de la isla de Faial (Archipiélago de las Azores, Portugal).
- *Barsonella lafoni* de Chambrier *et al.*, 2009 (Proteocephalidea), extraído del intestino de un pez gato africano *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Siluriformes, Clariidae) capturado en el lago Tana (Bahir Dar, Etiopía).
- *Clestobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819) (Bothriocephalidea), extraído del intestino de una merluza *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758) (Gadiformes, Merlucciidae) capturada en las costas de Roses (Girona, España).
- *Echinobothrium euterpes* (Neifar *et al.*, 2001) (Diphyllidea), extraído de la válvula espiral de un pez guitarra *Rhinobatos rhinobatos* (Linnaeus, 1758) (Rajiformes, Rhinobatidae) capturado en las costas de Zarzis (Túnez).
- *Molluscotaenia crassiscolex* (von Linstow, 1890) (Cyclophyllidea), extraído del intestino de una musaraña bicolor *Sorex araneus* Linnaeus, 1758 (Soricomorpha, Soricidae) capturada en la Reserva Natural de Py (Pirineos franceses).

Los helmintos vivos aislados tras disección de los hospedadores han sido procesados según la metodología pertinente para los estudios ultraestructurales mediante microscopía electrónica de transmisión. Así, en nuestro estudio se ha utilizado como fijador el glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato sódico 0,1 M a pH 7,4 (fijación de un mínimo de 2 h a 4°C). Tras diversos lavados (3 x 15 min) con el tampón, se realiza una segunda fijación con tetróxido de osmio al 1% en el mismo

tampón cacodilato sódico (1 h a 4°C). Tras los lavados posteriores (3 x 15 min) con el mismo tampón, se procede a la deshidratación del material mediante pasos sucesivos por soluciones de etanol de lipofilia creciente (15 min en etanol de 50°, de 70°, de 80°, de 90°, de 96° y dos pases de 30 min en etanol absoluto) y, finalmente, 1 h en 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 “resina Spurr : óxido de propileno” (1:3, 1:1, 3:1) y finalmente resina pura. Tras la polimerización de los bloques dentro de moldes de caucho-silicona (48-72 h en estufa 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).

Se ha aplicado la técnica citoquímica de Thiéry (1967) para evidenciar la presencia de glicógeno. 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 tiocarbhidrazida, lavados en soluciones de acético y agua destilada, 30 min en proteinato de plata en oscuridad y, finalmente, lavado con agua destilada.

Resultados

Los resultados del presente estudio se plasman en seis publicaciones de las cuales, a continuación, se expone un resumen con los aspectos más interesantes.

Marigo A.M., Eira C., Bâ C.T. & Miquel J. (2011). Caracteres espermatológicos de *Acanthobothrium crassicolle* Wedl, 1855 (Tetraphyllidea, Onchobothriidae), parásito de *Dasyatis pastinaca*. *Acta Parasitologica*, **56**(2): 191-201.

Palabras clave: *Acanthobothrium crassicolle*, Onchobothriidae, Tetraphyllidea, Cestoda, ultraestructura, espermiogénesis, espermatozoide.

El orden Tetraphyllidea incluye especies que parasitan la válvula espiral de elasmobranquios. Euzet (1994) reconoce ocho familias (Cathetocephalidae, Litobothriidae, Disculicipitidae, Prosobothriidae, Dioecotaeniidae, Onchobothriidae, Phyllobothriidae y Chimaerocestidae), todas ellas monogénicas excepto las

Onchobothriidae y Phyllobothriidae. Según Caira *et al.* (1999), los Tetraphyllidea no son un grupo monofilético y, por su parte, si bien la familia Onchobothriidae se muestra como monofilética, los Phyllobothriidae parecen no serlo. Schmidt & Beveridge (1990) erigieron la familia Cathetocephalidae a nivel de orden y Healy *et al.* (2009) hicieron lo propio con la subfamilia Rhinebothriinae.

Los estudios ultraestructurales espermatológicos previos en los Onchobothriidae hacen referencia a cuatro especies: *Acanthobothrium fillicole var. benedeni*, *A. fillicole var. fillicole*, *Calliobothrium verticillatum* y *Onchobothrium uncinatum* (Mokhtar-Maamouri & Świdorski, 1975; Mokhtar-Maamouri, 1982 y Quilichini *et al.*, 2007). En cuanto a los Phyllobothriidae, hay estudios referentes a cuatro especies: *Phyllobothrium gracile*, *Phyllobothrium lactuca*, *Pseudoanthobothrium hanseni* y *Trilocularia acanthiaevulgaris* (Mokhtar-Maamouri, 1979; MacKinnon & Burt, 1984; Mahendrasingam *et al.*, 1989 y Sène *et al.*, 1999).

El proceso de espermiogénesis en *Acanthobothrium crassicolle* se corresponde al tipo I postulado por Bâ & Marchand (1995). La zona de diferenciación se caracteriza por presentar dos centriolos asociados a raíces estriadas y separados por un cuerpo intercentriolar (formado por una sola banda densa a los electrones). Dicha zona está rodeada por microtúbulos corticales y delimitada en su base por un anillo de membranas arqueadas. Cada centriolo forma un flagelo que crece ortogonalmente a una expansión citoplasmática mediana. Posteriormente, los flagelos sufren la rotación flagelar y finalmente se fusionan próximo-distalmente con la expansión mediana. Antes de esta fusión, los microtúbulos se alargan hacia la expansión citoplasmática mediana y tras la fusión próximo-distal, el núcleo se incorpora hacia la cola de la espermátida. La espermiogénesis finaliza con el estrangulamiento del anillo de membranas arqueadas y la liberación del espermatozoide. Es importante destacar que, en los estadios avanzados de espermiogénesis, después de la fusión próximo-distal y durante la penetración nuclear, se aprecia todavía la presencia de raíces estriadas asociadas a los centriolos.

El espermatozoide de *Acanthobothrium crassicolle* corresponde al tipo II según el esquema propuesto por Levron *et al.* (2010). En él, ultraestructuralmente, se puede distinguir cuatro regiones:

- la región anterior contiene un cono apical rodeado por un único cuerpo en cresta helicoidal, un axonema del patrón 9+‘1’ de los Trepaxonemata (Ehlers, 1984) y un arco de microtúbulos corticales gruesos paralelos al hipotético eje longitudinal del espermatozoide.
- la segunda región presenta ya dos axonemas y unos microtúbulos corticales de tipo fino, inicialmente en arco (zona con un axonema) y posteriormente en dos campos (zona con dos axonemas). En esta región aparece el glicógeno.
- la región nuclear se caracteriza por exhibir dos axonemas, dos campos de microtúbulos corticales, núcleo y gránulos de glicógeno.
- la región posterior exhibe la desorganización del primer axonema, la desaparición de los microtúbulos corticales y del glicógeno y, finalmente, la desaparición del segundo axonema.

Nuestros resultados demuestran una coincidencia con el resto de especies Onchobothriidae estudiadas en el tipo de espermiogénesis (I) y en el tipo de espermatozoide (II) (Mokhtar-Maamouri & Świdorski, 1975; Mokhtar-Maamouri, 1982 y Quilichini *et al.*, 2007). Sin embargo, en *A. crassicolle* se ha descrito un cono apical largo comparado con el descrito en *Calliobothrium verticillatum* (Quilichini *et al.*, 2007). La comparación de los resultados con la otra familia importante del orden, los Phyllobothriidae, sólo permite establecer diferencias claras a nivel del tipo de espermatozoide (IV para esta otra familia). Las divergencias existentes en ciertos aspectos entre los cuatro estudios de Phyllobothriidae (Mokhtar-Maamouri, 1979; MacKinnon & Burt, 1984; Mahendrasingam *et al.*, 1989; Sène *et al.*, 1999), referentes al patrón espermiogénético, al tipo de espermatozoide y a la morfología del extremo posterior, podrían estar relacionadas con el posible carácter no monofilético de los Phyllobothriidae.

Por otra parte, en lo que se refiere al arco de microtúbulos corticales presente en la parte anterior, el espermatozoide de las otras especies de Tetrphyllidea estudiadas también presenta esta estructura. No obstante, desgraciadamente, la calidad de las micrografías no permite valorar si son microtúbulos finos o gruesos (Mokhtar-Maamouri & Świdorski, 1975; Mokhtar-Maamouri, 1979, 1982; MacKinnon & Burt, 1984; Mahendrasingam *et al.*, 1989; Sène *et al.*, 1999 y Quilichini *et al.*, 2007).

Marigo A.M., Caira J., Świdorski Z., Bâ C.T. & Miquel J. (2011). Ultraestructura de la espermiogénesis y del espermatozoide de *Aporhynchus menezesi* (Trypanorhyncha, Aporhynchidae), parásito de *Etmopterus spinax* (Elasmobranchii, Etmopteridae). *Folia Parasitologica*, **58**(1): 69-78.

Palabras clave: *Aporhynchus menezesi*, Cestoda, Trypanorhyncha, Gymnorhynchoidea, Aporhynchidae, ultraestructura, espermiogénesis, espermatozoide.

El orden de los Trypanorhyncha es uno de los órdenes de cestodos más frecuente en el estómago e intestino de peces marinos, principalmente rayas y tiburones. El tratado de Palm (2004) reconoce 254 especies válidas y en los últimos años este número ha crecido hasta 279. Este autor considera cinco superfamilias: Tentacularioidea, Gymnorhynchoidea, Lacistorhynchoidea, Otophthorioidea y Eutetrarhynchoidea. Tanto el propio estudio de Palm (2004) basado en datos morfológicos como el de Palm *et al.* (2009) con datos moleculares muestran al orden Trypanorhyncha como polifilético. Un clado agruparía los Eutetrarhynchoidea y los Tentacularioidea, y otro clado agruparía las superfamilias restantes (Gymnorhynchoidea, Lacistorhynchoidea y Otophthorioidea). Teniendo en cuenta que los estudios previos referentes al espermatozoide sólo son completos en el caso de especies de la superfamilia Eutetrarhynchoidea (*Dollfusiella spinulifera* y *Parachristianella trygonis* -véase Miquel & Świdorski, 2006a; Miquel *et al.*, 2007a), el presente estudio con *Aporhynchus menezesi* (un Gymnorhynchoidea) adquiere gran interés.

La espermiogénesis en *Aporhynchus menezesi* se corresponde al tipo I de Bâ & Marchand (1995), caracterizada por la formación de dos flagelos a partir de los centriolos de la zona de diferenciación, la posterior rotación flagelar y, finalmente, la fusión próximo-distal. Los centriolos están asociados a las respectivas raíces estriadas y poseen un cuerpo intercentriolar formado por cinco bandas densas a los electrones.

El espermatozoide se corresponde con el tipo I postulado por Levron *et al.* (2010). Es una célula filiforme que carece de mitocondria y organizada en cuatro regiones:

- la región anterior presenta un único axonema del tipo 9+1' propio de los Trepanxonemata (Ehlers, 1984) y un arco de siete microtúbulos corticales paralelos de tipo grueso. Carece de cono apical y de cuerpo en cresta.

- la segunda región se caracteriza por la aparición del segundo axonema, los dos campos de microtúbulos corticales finos y rosetas de α -glicógeno.
- la región III es la región nuclear y en ella desaparecen los microtúbulos corticales y el glicógeno, y se desorganiza uno de los axonemas.
- la región posterior presenta sólo uno de los axonemas rodeado por la membrana citoplasmática.

La comparación de estos resultados con las otras especies estudiadas permite ver que el cuerpo intercentriolar presenta cinco bandas, al igual que en *Lacistorhynchus tenuis* (Świdorski, 1994). Por el contrario, *Grillotia erinaceus* presenta un cuerpo intercentriolar con siete bandas (McKerr, 1985). El resto de aspectos ligados a la espermiogénesis son similares, aunque cabe decir que la espermiogénesis de *Dollfusiella spinulifera* y *Parachristianella trygonis* no ha sido estudiada (Miquel & Świdorski, 2006a; Miquel *et al.*, 2007a). En cuanto al espermatozoide, *Dollfusiella spinulifera*, *Parachristianella trygonis* (Eutetrarhynchoidea) y *Aporhynchus menezesi* (Gymnorhynchoidea) presentan el patron I de Levron *et al.* (2010), extremidad anterior con microtúbulos corticales, arco de microtúbulos corticales, puntos de fusión y extremidad posterior con sólo el axonema. Estas especies carecen de cono apical y de cuerpo en cresta helicoidal. La única diferencia evidente es el número de microtúbulos gruesos que forman el arco: 10 en las dos especies de Eutetrarhynchoidea y siete en *Aporhynchus menezesi*.

Teniendo en cuenta la escasez de datos y la falta de estudios de espermiogénesis en los Eutetrarhynchoidea, no parece claro especular al respecto del carácter polifilético del orden, en base a los estudios ultraestructurales del espermatozoide.

Marigo A.M., Levron C., Bâ C.T. & Miquel J. (2011). Estudio ultraestructural de la espermiogénesis y del espermatozoide de *Barsonella lafoni* de Chambrier *et al.*, 2009 (Proteocephalidea), parásito de *Clarias gariepinus* (Siluriformes, Clariidae). *Zoologischer Anzeiger* (en prensa).

Palabras clave: *Barsonella lafoni*, Cestoda, Proteocephalidea, Proteocephalidae, Proteocephalinae, ultraestructura, espermiogénesis, espermatozoide.

El orden de los Proteocephalidea está reconocido como un grupo de cestodos muy interesante desde un punto de vista evolutivo, ya que se considera el más próximo a los Cyclophyllidea (Rego, 1994, 1995). Actualmente están reconocidas como válidas dos familias: los Proteocephalidae con seis subfamilias (Gangesiinae, Sandonellinae, Corallobothriinae, Acanthotaeniinae, Proteocephalinae y Marsypocephalinae) y los Monticelliidae también con seis subfamilias (Monticelliinae, Zygobothriinae, Nupeliinae, Ephedrocephalinae, Peltidocotyliinae y Rudolphiellinae).

El género *Barsonella* y la especie *Barsonella lafoni* han sido recientemente descritos por de Chambrier *et al.* (2009) y están incluidos en la familia Proteocephalidae y en la subfamilia Proteocephalinae. Es un género ampliamente distribuido por Africa parasitando peces gato del género *Clarias*.

Actualmente, existen estudios ultraestructurales espermatológicos en seis especies del orden Proteocephalidea (cinco Proteocephalidae y un Monticelliidae), pertenecientes a cinco subfamilias (Corallobothriinae, Gangesiinae, Proteocephalinae, Sandonellinae y Zygobothriinae) (véase Świdorski & Eklun-Natey, 1978; Świdorski, 1985, 1996; Bâ & Marchand, 1994a; Sène *et al.*, 1997; Bruňanská *et al.*, 2003a,b,c, 2004a,b,c, 2005). Nuestro estudio aporta nuevos datos referentes a un género y a una especie todavía no estudiados.

La espermiogénesis de *Barsonella lafoni* se corresponde al patrón I postulado por Bâ & Marchand (1995). La zona de diferenciación presenta dos centriolos asociados a raíces estriadas y separados por un cuerpo intercentriolar, constituido por una sola banda densa a los electrones. Se ha observado en algunos casos la presencia de dos raíces estriadas asociadas a un mismo centriolo. Otra característica interesante es la presencia de un material denso a los electrones en la zona distal de la zona de diferenciación durante las fases iniciales de la espermiogénesis. Cada centriolo origina un flagelo que crece ortogonalmente a una expansión citoplasmática mediana. Cabe

decir que el crecimiento de los flagelos es asincrónico, al igual que la posterior rotación flagelar. Tras la fusión próximo-distal de los flagelos con la expansión citoplasmática mediana, se produce la migración nuclear. Durante esta fase todavía persisten las raíces estriadas en el cuerpo de la espermátida. Al final de la espermiogénesis, el estrangulamiento del anillo de membranas arqueadas libera el espermatozoide recién formado del citoplasma residual.

El espermatozoide de *Barsonella lafoni* presenta las características ultraestructurales propias del tipo II de Levron *et al.* (2010). En él se pueden distinguir cuatro regiones distintas:

- la región I se caracteriza por la presencia de un cono apical, el primer axonema del patrón 9+1' típico de los Trepaxonemata (Ehlers, 1984), un arco de microtúbulos corticales de tipo grueso y paralelos al hipotético eje longitudinal del espermatozoide, y un cuerpo en cresta helicoidal de un espesor máximo de 90 nm.
- la región II se caracteriza por la aparición del segundo axonema, por la transformación de los microtúbulos corticales gruesos en dos campos de microtúbulos corticales finos y por la aparición de gránulos de glicógeno.
- la región III es la región nuclear. En esta región se produce la desorganización del primer axonema.
- la región IV se caracteriza por exhibir la desorganización del segundo axonema. El extremo posterior del espermatozoide presenta escasos gránulos de glicógeno y microtúbulos corticales.

La comparación de nuestros resultados con los existentes en el orden Proteocephalidea permite comprobar la constancia en el patrón espermiogénético II para todas las especies estudiadas (Świdorski, 1985; Sène *et al.*, 1997; Bruňanská *et al.*, 2003b, 2004c, 2005). En cuanto al espermatozoide, todas las especies, excepto el Sandonellinae *Sandonella sandoni*, presentan un tipo de espermatozoide II (Świdorski & Eklun-Natey, 1978; Świdorski, 1996; Bâ & Marchand, 1994a; Sène *et al.*, 1997; Bruňanská *et al.*, 2003a,c, 2004a,b). Cabe decir que *S. sandoni*, con tipo IV de espermatozoide, carece de estudio espermiogénético. Sería muy interesante comprobar si la espermiogénesis de esta especie también difiere de la de las otras especies, tal y como sucede con el espermatozoide. Finalmente, cabe destacar la detección, por primera vez en los Proteocephalidea, de un material denso a los

electrones en las fases iniciales de la espermiogénesis y la constancia en el carácter “arco de microtúbulos corticales” en el espermatozoide de todas las especies. El primero de estos caracteres, hasta la fecha sólo se había detectado en los Caryophyllidea, Spathebothriidea, Diphyllbothriidea y Bothriocephalidea, siendo postulado como característico de grupos basales de cestodos por Bruňanská & Poddubnaya (2010).

Marigo A.M., Delgado E., Torres J., Bâ C.T. & Miquel J. (2011). Ultraestructura de la espermiogénesis y del espermatozoide de *Clestobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819) (Bothriocephalidea), parásito de *Merluccius merluccius* (Gadiformes, Merlucciidae). *Parasitology Research*, **109** (en prensa).

Palabras clave: *Clestobothrium crassiceps*, Cestoda, Bothriocephalidea, ultraestructura, espermiogénesis, espermatozoide.

El género *Clestobothrium* se engloba dentro del recientemente creado orden Bothriocephalidea (Kuchta *et al.*, 2008a). Dicho orden fue erigido por estos autores a partir de la familia Bothriocephalidae del antiguo orden “Pseudophyllidea”. Los Bothriocephalidea incluyen parásitos intestinales de teleósteos y las especies están repartidas en 46 géneros y cuatro familias (Bothriocephalidae, Echinophallidae, Philobythiidae y Triaenophoridae). El género *Clestobothrium* pertenece a la primera de estas familias junto con otros 13 géneros válidos (Kuchta *et al.*, 2008a,b). Actualmente, el género incluye las tres especies consideradas como válidas por Kuchta *et al.* (2008b) y otras dos especies, recientemente descritas por Gil de Pertierra *et al.* (2011).

Existen 13 especies del orden “Pseudophyllidea” con estudios ultraestructurales de la espermiogénesis y/o del espermatozoide: diez Bothriocephalidea y tres Diphyllbothriidea (véase Świderski & Mokhtar-Maamouri, 1980; Justine, 1986; Bruňanská *et al.*, 2001, 2002, 2010; Levron *et al.*, 2005, 2006a,b,c, 2009, 2011; Bâ *et al.*, 2007; Šípková *et al.*, 2010, 2011).

La espermiogénesis en *Clestobothrium crassiceps* corresponde al patrón I de Bâ & Marchand (1995). Empieza con la formación de una zona de diferenciación con dos centriolos asociados a raíces estriadas y con un cuerpo intercentriolar, formado por tres bandas, entre ellos. Esta zona de diferenciación, cónica, está rodeada por microtúbulos corticales y delimitada en su base por un anillo de membranas arqueadas.

Otra característica interesante es la presencia de un material denso a los electrones. Cada centriolo desarrolla un flagelo de crecimiento asincrónico. Dichos flagelos, tras una rotación flagelar también asincrónica, fusionan próximo-distalmente con una expansión citoplasmática mediana. Cabe comentar que tras esta fusión, todavía se observan las raíces estriadas. En la fase final de la espermiogénesis se observa la formación del futuro cono apical y del cuerpo en cresta en la base de la espermátida.

El espermatozoide es del tipo II según la clasificación de Levron *et al.* (2010) y se pueden distinguir cuatro regiones morfológicamente distintas:

- la región I es el extremo anterior y se caracteriza por la presencia de un único axonema del tipo 9+1' propio de los platelmintos Trepaxonemata (Ehlers, 1984), por el cono apical, por el cuerpo en cresta helicoidal (muy corto y de 160 nm de espesor) y por el anillo de microtúbulos corticales paralelos de tipo grueso.
- la región II posee los dos axonemas y en ella los microtúbulos se transforman en finos. Asimismo, al final de esta región aparece el glicógeno.
- la región III es la parte anterior de la región nuclear. Además del núcleo, exhibe los caracteres de la región anterior. Al final de esta región se desorganiza uno de los dos axonemas.
- la región IV es la parte posterior de la región nuclear. En ella progresivamente desaparecen los microtúbulos corticales, los gránulos de glicógeno y, finalmente, el núcleo.

La comparación de nuestros resultados con los existentes muestra bastantes similitudes. A nivel de espermiogénesis, todos los Bothriocephalidea estudiados presentan el patrón I de Bâ & Marchand (1995). Excepto *Eubothrium crassum* (Bruňanská *et al.*, 2001), que presenta una banda, el resto de especies del orden presentan tres, como *C. crassiceps* (Levron *et al.*, 2005, 2006b; Šípková *et al.*, 2010, 2011; presente estudio). En cuanto al espermatozoide, todas las especies del orden presentan el patrón II de espermatozoide de Levron *et al.* (2010), con cuerpo en cresta y con anillo de microtúbulos corticales. De hecho, este último carácter podría ser una autapomorfía para los Bothriocephalidea.

Las diferencias con el otro orden, los Diphylobothriidae, mención aparte de *Duthiersia fimbriata* (Justine, 1986), radican en el tipo de espermatozoide, I de Levron *et al.* (2010) y en la ausencia del anillo de microtúbulos corticales gruesos (Levron *et al.*,

2006a, 2009, 2011).

Marigo A.M., Eira C., Bâ C.T. & Miquel J. (2011). Ultraestructura de la espermiogénesis y del espermatozoide de *Echinobothrium euterpes* (Neifar, Tyler and Euzet 2001) Tyler 2006 (Diphyllidea), parásito de *Rhinobatos rhinobatos*. *Parasitology Research*, **109** (en prensa).

Palabras clave: *Echinobothrium euterpes*, Cestoda, Diphyllidea, ultraestructura, espermiogénesis, espermatozoide.

El orden Diphyllidea ha estado sumido en la controversia durante muchos años, aunque los estudios de Caira *et al.* (1999, 2001) y de Ivanov & Hoberg (1999) refuerzan el mantenimiento de este orden al demostrar su monofilia. Según Khalil *et al.* (1994), el orden incluye tres familias: Echinobothriidae, Ditrachybothriidae y Macrobothriidae. No obstante, en la reciente monografía de Tyler (2006), el orden Diphyllidea incluye dos géneros y 36 especies válidas clasificadas en dos familias (Echinobothriidae y Ditrachybothriidae). Posteriormente, la descripción de seis especies adicionales implica que actualmente el número de especies sea de 42 (Ivanov & Lipshitz, 2006; Li & Wang, 2007; Twohig *et al.*, 2008; Kuchta & Caira, 2010).

En la actualidad, existen estudios ultraestructurales de la espermiogénesis y del espermatozoide en cuatro especies del género *Echinobothrium* (*E. affine*, *E. brachysoma*, *E. harfordi* y *E. typus* –véase Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984; Azzouz-Draoui, 1985; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88), aunque los resultados son incompletos y confusos. Es por ello que el objetivo principal del estudio de *Echinobothrium euterpes* es el de clarificar el esquema espermatológico general en este orden, en particular en lo referente al número de axonemas presentes en el espermatozoide.

La espermiogénesis en *Echinobothrium euterpes* es del tipo I de Bâ & Marchand (1995). Los aspectos más característicos radican en la presencia de unas masas densas asociadas a los centriolos y en la formación de dos flagelos, de los que uno de ellos es muy corto (1 μm). Esta masa densa tiene una forma cónica, carece de estriación visible y es asimilable a las raíces estriadas típicas. Ambos flagelos sufren rotación flagelar y, posteriormente, fusión próximo-distal. El axonema corto se incorpora a la expansión citoplasmática mediana, se desplaza hacia zonas distales de la espermátida, pero no

crece. El cuerpo intercentriolar presenta tres bandas densas a los electrones. Otro aspecto interesante es que los microtúbulos corticales son escasos y restringidos a zonas proximales de la espermatida. En fases finales de la espermiogénesis se observa la formación del futuro cono apical y de un cuerpo en cresta.

El espermatozoide, de tipo IV según la clasificación de Levron *et al.* (2010), presenta cuatro regiones diferenciadas ultraestructuralmente:

- la región anterior ostenta un cono apical largo, un cuerpo en cresta, el axonema del patrón 9+1' típico de los Trepaxonemata (Ehlers, 1984) y un escaso número de microtúbulos corticales paralelos restringidos a las áreas más anteriores de esta región.
- la segunda región presenta sólo el axonema y en ella aparece el glicógeno que rodea totalmente al axonema.
- la región nuclear presenta un axonema rodeado por un núcleo espiralado y con gránulos de glicógeno.
- la región posterior presenta sólo el axonema y gránulos de glicógeno.

En tres de las cuatro especies estudiadas (*Echinobothrium affine*, *E. brachysoma* y *E. typus* –véase Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984; Azzouz-Draoui, 1985; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88), al igual que en *Echinobothrium euterpes* se observa la formación de dos flagelos (tipo I de espermiogénesis). Por el contrario, en *Echinobothrium harfordi* (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984; Azzouz-Draoui, 1985; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88) el tipo de espermiogénesis descrita es el II. En cuanto a las observaciones referentes al espermatozoide, todavía hay más disparidad, con tres tipos en las cuatro especies (tipos I, II y IV). Nuestro estudio, mucho más detallado y completo, muestra un patrón espermiogénético con formación de dos flagelos (uno muy corto) que posiblemente después de incorporarse como axonema, degenera y así, en el espermatozoide se observa un único axonema (tipo IV). El patrón espiralado del núcleo en el espermatozoide apoyaría esta hipótesis. Además, cabe añadir que el presente estudio supone la descripción de un cono apical por primera vez en un Diphyllidea. Cabe apuntar, finalmente, que todas las especies, o bien presentan un escaso número de microtúbulos corticales, o bien carecen de ellos.

Marigo A.M., Bâ C.T. & Miquel J. (2011). Ultraestructura de la espermiogénesis y del espermatozoide de *Molluscotaenia crassiscolex* (von Linstow, 1890) (Cyclophyllidea, Dilepididae), parásito intestinal de *Sorex araneus*. *Acta Zoologica (Stockholm)*, **92**(2): 116-125.

Palabras clave: *Molluscotaenia crassiscolex*, Cestoda, Cyclophyllidea, Dilepididae, ultraestructura, espermiogénesis, espermatozoide.

La familia Dilepididae incluye más de 100 géneros con especies parásitas de aves y mamíferos. La Taxonomía de los Dilepididae *sensu lato* ha sido controvertida a lo largo del tiempo. Actualmente, se consideran las familias Dipylidiidae, Metadilepididae y Paruterinidae que formaban parte de los Dilepididae (Schmidt, 1986). Por otra parte, los Gryporhynchidae eran considerados una subfamilia de los Dilepididae por diversos autores (Bona, 1994; Mariaux, 1998; Hoberg *et al.*, 1999).

Actualmente, existen estudios ultraestructurales del espermatozoide en diversas especies de estos grupos: *Angularella beema*, *Dilepis undula*, *Kowalewskiella glareola* y *Molluscotaenia crassiscolex* (Dilepididae), *Dipylidium caninum*, *Joyeuxiella echinorhynchoides* y *Joyeuxiella pasqualei* (Dipylidiidae), *Valipora mutabilis* (Gryporhynchidae), *Skrjabinoporus merops* (Metadilepididae), *Anonchotaenia globata* y *Triaenorhina rectangula* (Paruterinidae) (Świdorski & Tkach, 1996a; Miquel & Marchand, 1997; Miquel *et al.*, 1998a, 2005a; Świdorski *et al.*, 2000, 2002; Ndiaye *et al.*, 2003a; Yoneva *et al.*, 2006a,b, 2008, 2009, 2010). Cabe remarcar que el estudio existente sobre *Molluscotaenia crassiscolex* (Świdorski & Tkach, 1996a) consiste en un resumen de un congreso y sólo del espermatozoide, por lo que la presente Memoria aporta resultados completos de dicha especie.

La espermiogénesis en *Molluscotaenia crassiscolex* es del tipo IV postulado por Bâ & Marchand (1995). La zona de diferenciación contiene dos centriolos que carecen de raíces estriadas y de cuerpo intercentriolar. Uno de los dos centriolos desarrolla un axonema que crece directamente en una expansión citoplasmática. Es por ello que en este tipo no se da ni rotación flagelar ni fusión próximo-distal. El núcleo y los microtúbulos corticales migran a lo largo de la espermátida y, finalmente, aparece el futuro cono apical y un cuerpo en cresta en la base de la espermátida. La constricción del anillo de membranas arqueadas libera el espermatozoide.

El espermatozoide es del tipo VI según la clasificación propuesta por Levron *et al.* (2010) y, en el mismo, se pueden distinguir cuatro regiones:

- la región I se caracteriza por la presencia de un cono apical, el inicio del único axonema del tipo 9+1' de los platelmintos Trepaxonemata (Ehlers, 1984), un campo de microtúbulos corticales espiralados (45°) que rodea al axonema y un cuerpo en cresta helicoidal. El cuerpo en cresta presenta una morfología muy característica; en su área intermedia está parcialmente libre, llegando a un espesor máximo de 330 nm.
- en la región II desaparece el cuerpo en cresta. En esta zona se observan gránulos densos (de naturaleza no glicogénica) y una vaina periaxonemal.
- la región III es la región nuclear, con el núcleo espiralado alrededor del axonema y con una forma de herradura en secciones transversales. Al final de esta región desaparecen los microtúbulos corticales.
- la región IV contiene sólo el axonema rodeado por la membrana citoplasmática.

El presente estudio permite corroborar, atendiendo a caracteres espermatológicos ultraestructurales, las diferencias existentes entre los representantes de todas estas familias integrantes en los Dilepididae *sensu lato*, a excepción de los Gryporhynchidae. Los Dilepididae *sensu stricto* presentan una espermiogénesis de tipo IV y un espermatozoide de tipo VI (Świdorski & Tkach, 1996a; Świdorski *et al.*, 2000, 2002; Yoneva *et al.*, 2006a). Los Dipylidiidae ostentan los tipos III de espermiogénesis y VI de espermatozoide (Miquel & Marchand, 1997; Miquel *et al.*, 1998a, 2005a; Ndiaye *et al.*, 2003a). Los Gryporhynchidae presentan los patrones IV y VI, respectivamente (Yoneva *et al.*, 2008). Los Metadilepididae ostentan los tipos III y VII, respectivamente (Yoneva *et al.*, 2006b). Finalmente, los Paruterinidae exhiben los patrones III y VII, respectivamente (Yoneva *et al.*, 2009, 2010).

Así, se puede concluir que, en lo que se refiere a la espermiogénesis, Los Dipylidiidae, los Metadilepididae y los Paruterinidae presentan el mismo patrón, mientras que los Dilepididae y los Gryporhynchidae presentan otro. En cuanto al espermatozoide, los Metadilepididae y Paruterinidae se distinguen de los demás grupos.

Discusión

El análisis de la espermiogénesis y del espermatozoide de seis cestodos pertenecientes a seis órdenes (Bothriocephalidea, Cyclophyllidea, Diphyllidea, Proteocephalidea, Tetrephyllidea y Trypanorhyncha) nos ha permitido describir, generalizar, completar y redefinir los patrones espermatológicos propuestos para estos grupos.

Espermiogénesis

En los Eucestoda, el proceso de espermiogénesis es muy variable según los órdenes y según las especies. Así, para clasificarlos Bâ & Marchand (1995) establecieron cuatro tipos (I-IV) de espermiogénesis basándose en el número de flagelos en la zona de diferenciación, en la existencia o no de rotación flagelar y de fusión próximo-distal y en la presencia o no de raíces estriadas y de cuerpo intercentriolar.

Los tipos I y II se caracterizan por poseer dos raíces estriadas y un cuerpo intercentriolar en la zona de diferenciación, mientras que los tipos III y IV carecen de ellos. Además, en el tipo I se describe una rotación de los dos flagelos y su fusión próximo-distal con una expansión citoplasmática mediana. El tipo I se ha descrito en los Spathebothriidea, los Diphyllbothriidea, los Diphyllidea, los Bothriocephalidea, los Trypanorhyncha, los Tetrephyllidea-Onchobothriidae, los Tetrephyllidea-Phyllobothriidae y los Proteocephalidea. En el tipo II sólo un flagelo participa al proceso de espermiogénesis. El segundo no crece o no interviene en el proceso y aborta durante la espermiogénesis. Se ha descrito en los Caryophyllidea, los Diphyllidea, los Tetrephyllidea-Phyllobothriidae, los Tetrabothriidea y los Cyclophyllidea-Mesocestoididae. Los tipos III y IV son específicos de los Cyclophyllidea. Ambos tipos carecen de rotación flagelar. El tipo III se distingue por la formación de un flagelo que crece paralelo a una expansión citoplasmática y por su fusión posterior con dicha expansión. Se ha descrito en los Anoplocephalidae, los Catenotaeniidae, los Davaineidae, los Dipylidiidae, los Hymenolepididae, los Metadilepidae, los Nematotaeniidae, los Paruterinidae y los Taeniidae. El tipo IV se caracteriza por el crecimiento directo del axonema en la expansión citoplasmática. Se ha encontrado en los Anoplocephalidae, los Dilepididae y los Gryporhynchidae.

Es importante apuntar que en los Cyclophyllidea-Mesocestoididae se ha descrito el tipo II de espermiogénesis (Miquel *et al.*, 1999, 2007b).

Según los órdenes y según las especies, estos cuatro patrones pueden sufrir algunas modificaciones. Algunos grupos que presentan el tipo I de espermiogénesis presentan una zona de diferenciación que exhibe una acumulación característica de material denso a los electrones. Este material, descrito por primera vez por Bruňanská *et al.* (2001) en *Eubothrium crassum*, está presente sólo durante las fases iniciales de espermiogénesis. Se ha descrito en dos especies estudiadas en la presente memoria, *Clestobothrium crassiceps* (Bothriocephalidea) y *Barsonella lafoni* (Proteocephalidea), así como en todos los Bothriocephalidea (Bruňanská *et al.*, 2001; Levron *et al.*, 2005, 2006b,c; Šípková *et al.*, 2010, 2011), los Spathebothriidea (Bruňanská *et al.*, 2006; Bruňanská & Poddubnaya, 2010) y los Diphyllbothriidea (Justine, 1986; Levron *et al.*, 2006a, 2009, 2011).

En lo que se refiere a los Proteocephalidea, *Barsonella lafoni* constituye la primera especie en la cual se ha encontrado este material denso. Este material ha sido observado también en los Caryophyllidea, grupo que ostenta el tipo II de espermiogénesis (Bruňanská & Poddubnaya, 2006; Miquel *et al.*, 2008a; Bruňanská, 2009; Bruňanská & Kostič, 2011; Yoneva *et al.*, 2011).

Un carácter similar se ha encontrado en los Cyclophyllidea. En efecto, Bâ & Marchand (1995) describieron en el tipo IV de espermiogénesis un material denso asociado a los centriolos, que llamaron adjunto centriolar. Esta estructura se ha descrito en tres especies de Anoplocephalidae: *Thysaniezia ovilla* (Bâ *et al.*, 1991), *Gallegoides arfaai* (Miquel *et al.*, 2005b) y *Mosgovoyia ctenoides* (Eira *et al.*, 2006). En *Molluscotaenia crassiscolex*, así como en otras especies que ostentan el tipo IV de espermiogénesis, esta estructura no se ha encontrado.

En los Eucestoda, el número de bandas que constituyen el cuerpo intercentriolar puede variar de uno a diez. Sin embargo, en la mayoría de las especies, este número oscila entre uno y tres. Es importante destacar el caso de los Proteocephalidea y de los Bothriocephalidea, cuyas especies tienen un número de bandas constante en el cuerpo intercentriolar, una banda en los Proteocephalidea (Sène *et al.*, 1997; Bruňanská *et al.*, 2003b, 2004c, 2005; presente estudio) y tres bandas en los Bothriocephalidea (Levron *et al.*, 2005, 2006b,c; Šípková *et al.*, 2010, 2011; presente estudio). Por el contrario, en

los Trypanorhyncha, el cuerpo intercentriolar está formado por un número relevante de bandas (un mínimo de cinco). Según Justine (2001), la reducción progresiva del cuerpo intercentriolar es un signo de evolución.

Las raíces estriadas que, según Bâ & Marchand (1995) estarían ausentes en los Cyclophyllidea, fueron encontradas en los Mesocestoididae (Miquel *et al.*, 1999, 2007b) y también en dos especies de Dipylidiidae (Ndiaye *et al.*, 2003a; Miquel *et al.*, 2005a). Otras estructuras, las raíces estriadas vestigiales, de aspecto más fino, fueron también observadas en los Anoplocephalidae *Anoplocephaloides dentata*, *Gallegoides arfaai*, *Moniezia expansa* y *Mosgovoyia ctenoides* (Miquel & Marchand, 1998a; Li *et al.*, 2003; Miquel *et al.*, 2005b; Eira *et al.*, 2006), en el Dipylidiidae *Dipylidium caninum* (Miquel *et al.*, 1998a, 2005a), en el Metadilepididae *Skrjabinoporus merops* (Yoneva *et al.*, 2006b), en los Paruterinidae *Triaenorhina rectangula* y *Anonchotaenia globata* (Yoneva *et al.*, 2009, 2010), y en el Taeniidae *Taenia taeniaeformis* (Miquel *et al.*, 2009a). Por otra parte, en los Diphyllidea estas raíces están sustituidas por una estructura de forma triangular, de aspecto granular y sin estriación visible (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984; Azzouz-Draoui, 1985; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88). En el presente estudio se han observado también en *Echinobothrium euterpes*. Este carácter, sólo encontrado en los Diphyllidea, podría ser una autapomorfía para este grupo.

Otra particularidad observada en los Diphyllidea es la escasez de microtúbulos corticales. En nuestro estudio, durante el proceso de espermiogénesis, en *E. euterpes* se han observado muy pocos microtúbulos corticales. Estos microtúbulos están restringidos a la zona próxima a la zona de diferenciación. Ello se da en casi todos los Diphyllidea, salvo en *Echinobothrium affine* (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984; Azzouz-Draoui, 1985; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88).

Según la descripción original de Bâ & Marchand (1995), en los tipos III y IV de espermiogénesis no existe rotación flagelar. Sin embargo, en algunas especies que presentan estos tipos se ha visto una ligera rotación, inferior a 90°. Es el caso del Catenotaeniidae *Catenotaenia pusilla* (Hidalgo *et al.*, 2000), del Metadilepididae *Skrjabinoporus merops* (Yoneva *et al.*, 2006b), de los Paruterinidae *Anonchotaenia globata* y *Triaenorhina rectangula* (Yoneva *et al.*, 2009, 2010) y de los Taeniidae *Taenia parva* y *Taenia taeniaeformis* (Ndiaye *et al.*, 2003b; Miquel *et al.*, 2009a). Ello supone

rechazar la proposición de Bâ & Marchand (1995) y Justine (1998a, 2001), que propusieron la ausencia de rotación flagelar como sinapomorfía para los Cyclophyllidea. En lo que se refiere a los Cyclophyllidea-Mesocestoididae, los caracteres descritos son plesiomórficos (tipo II de espermiogénesis) en comparación con los datos obtenidos en los otros Cyclophyllidea (Miquel *et al.*, 1999, 2007b).

En dos otras especies como el Spathebothriidea *Cyathocephalus truncatus* y el Caryophyllidea *Wenyonia virilis*, se ha descrito una rotación flagellar superior a 90° (Bruňanská *et al.*, 2006; Miquel *et al.*, 2008a).

Espermatozoide

Los espermatozoides de los Eucestoda pueden clasificarse en siete tipos según el reciente escrito de Levron *et al.* (2010). Dichos tipos han sido planteados basándose en el número de axomemas (uno o dos), la disposición de los microtúbulos corticales y del núcleo (paralela o espiralada) y la presencia o ausencia de cuerpo en cresta, de vaina periaxonemal y de paredes intracitoplasmáticas.

Los tipos I y II presentan dos axonemas. El tipo I se caracteriza por la presencia de microtúbulos corticales y de núcleo paralelos. Se encuentra en los Spathebothriidea, los Diphyllbothriidea, los Haplobothriidea y los Trypanorhyncha. El tipo II presenta, además del núcleo y de los microtúbulos paralelos, un cuerpo en cresta helicoidal en su parte anterior. Se ha encontrado en los Bothriocephalidea, los Tetrphyllidea-Onchobothriidae, los Proteocephalidea y en algunos Diphyllidea. Los tipos III, IV, V, VI y VII sólo ostentan un único axonema. El tipo III se ha descrito en los Caryophyllidea y se caracteriza por tener el núcleo y los microtúbulos corticales paralelos. El tipo IV posee, además de los caracteres presentes en el III, un cuerpo en cresta helicoidal y se observa en los Tetrphyllidea-Phyllobothriidae, los Mesocestoididae y, probablemente, en los Lecanicephalidea. Los tipos V, VI y VII sólo se han descrito en los Cyclophyllidea (salvo en los Mesocestoididae). Estos tres últimos tipos poseen tanto el núcleo como los microtúbulos corticales espiralados y presentan un cuerpo en cresta en su extremidad anterior. El tipo VI se caracteriza, además, por la presencia de la vaina periaxonemal y el tipo VII por tener vaina periaxonemal y paredes intracitoplasmáticas. Este último tipo VII también ha sido descrito en los Tetrabothriidea.

La variación en el número de axonemas es un carácter clave en los Eucestoda. Permite discernir los grupos basales (con dos axonemas) de los grupos más evolucionados (con un axonema). Actualmente, sólo existe problemática a nivel del número de axonemas en el espermatozoide para dos grupos: los Tetracystidae-Phyllobothriidae y los Diphyllidae.

En los Tetracystidae, las dos familias estudiadas tienen un patrón espermatológico distinto. En los Tetracystidae-Onchobothriidae el patrón de espermatozoide es constante (tipo II), mientras que en los Tetracystidae-Phyllobothriidae existen dos tipos de espermatozoides, los que tienen dos axonemas (Mahendrasingam *et al.*, 1989) y los que tienen un solo axonema (Mokhtar-Maamouri, 1979; MacKinnon & Burt, 1984). Estos resultados apoyarían los estudios moleculares que estipulan que los Tetracystidae son un grupo parafilético (Caira *et al.*, 1999).

Por el contrario, los Diphyllidae, según los estudios filogenéticos (Caira *et al.*, 1999, 2001; Ivanov & Hoberg, 1999), serían un grupo monofilético. Sin embargo, en los estudios ultraestructurales se han descrito tres tipos de espermatozoide (I, II, IV) (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984; Azzouz-Draoui, 1985; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88; presente estudio). En base a los resultados que hemos obtenido con el estudio de *Echinobothrium euterpes*, proponemos el tipo IV de espermatozoide para este grupo. En efecto, durante las etapas finales del proceso de espermiogénesis, un axonema muy reducido degeneraría y sólo se encontraría un único axonema en el espermatozoide maduro. Ello explicaría la carencia o la inexistencia de cortes con dos axonemas en el estudio de Azzouz-Draoui (1985).

En la mayoría de los Eucestoda, la parte anterior del espermatozoide, además de estar marcada por la presencia del centriolo, también presenta otras características. En primer lugar y como más importante podemos remarcar la presencia del cuerpo en cresta helicoidal. Esta estructura, descrita por primera vez por Mokhtar-Maamouri & Świdorski (1975) en *Acanthobothrium benedenii* y *Onchobothrium uncinatum*, jugaría un papel importante en la fecundación. La presencia de esta estructura se ha postulado como una sinapomorfía para los Eucestoda (Bâ & Marchand, 1995) o para una parte de los Eucestoda (Justine, 1998a, 2001). Según dichos autores, el cuerpo en cresta estaría ausente en los grupos basales como los Caryophyllidae (Świdorski & Mackiewicz, 2002; Arafa & Hamada, 2004; Bruňanská & Poddubnaya, 2006; Miquel *et*

al., 2008a; Bruňanská, 2009; Bruňanská & Kostič, 2011; Yoneva *et al.*, 2011), los Spathebothriidea (Bruňanská *et al.*, 2006; Bruňanská & Poddubnaya, 2010), los Haplobothriidea (MacKinnon & Burt, 1985), los Trypanorhyncha (Miquel & Świderski, 2006a; Miquel *et al.*, 2007a; presente estudio) y el nuevo orden Diphyllbothriidea (Levron *et al.*, 2006a, 2009, 2011).

En la mayoría de los cestodos sólo se describe un cuerpo en cresta. Sin embargo, en muchos Cyclophyllidea (Bâ & Marchand, 1993; Bâ *et al.*, 2000; Miquel *et al.*, 2007c...) y también en un Proteocephalidea (Sène *et al.*, 1997) se ha observado más de un cuerpo en cresta.

Otra estructura que caracteriza la extremidad anterior del espermatozoide en los Eucestoda es la presencia de un cono apical. Esta estructura, sólo encontrada en los cestodos, no está descrita en todos los grupos. De los 17 órdenes que constituyen los Eucestoda, el cuerpo en cresta ha sido descrito en sólo cinco órdenes: Bothriocephalidea, Tetraphyllidea-Onchobothriidae, Diphyllidea, Proteocephalidea y Cyclophyllidea.

La tercera estructura que puede determinar la extremidad anterior del gameto en los Eucestoda es la presencia de un arco de microtúbulos corticales. Este arco está presente en especies con los tipos I, II, III y IV de espermatozoide (Mokhtar-Maamouri & Świderski, 1975, 1976; Mokhtar-Maamouri, 1979, 1982; MacKinnon & Burt, 1984; Justine, 1986; Mahendrasingam *et al.*, 1989; Miquel *et al.*, 1999, 2007a,b; Arafa & Hamada, 2004; Bruňanská *et al.*, 2006; Miquel & Świderski, 2006a; Levron *et al.*, 2006a, 2009, 2011; Bâ *et al.*, 2007; Quilichini *et al.*, 2007; Gamil, 2008; Bruňanská, 2009; Bruňanská & Poddubnaya, 2010; Bruňanská & Kostič, 2011; Yoneva *et al.*, 2011; presente estudio), excepto en las especies de los órdenes Diphyllidea y Bothriocephalidea.

En los Bothriocephalidea, este arco está sustituido por un anillo de microtúbulos corticales, presente en todas las especies de este orden, salvo en *Bothriocephalus claviceps* (Bâ *et al.*, 2007). Este carácter es muy importante porque permite discernir ultraestructuralmente los Bothriocephalidea de los Diphyllbothriidea.

Los microtúbulos que forman el arco o el anillo, son generalmente más gruesos. Ello permite distinguir dos tipos de microtúbulos corticales. La aparición del segundo tipo (microtúbulos finos) coincide con la formación del segundo axonema en las

especies que tienen el tipo I o II de espermatozoide. La presencia de estos dos tipos de microtúbulos, ya enunciado por Justine (1998a) con en el estudio de *Echeinebothrium beauchampi* de Mokhtar-Maamouri & Świdorski (1976), es hoy en día evidente también en cestodos de distintos órdenes, como los Tetracystida (presente estudio), los Bothriocephalida (Świdorski & Mokhtar-Maamouri, 1980; Bruňanská *et al.*, 2002, 2010; Levron *et al.*, 2005, 2006b,c; Šípková *et al.*, 2010, 2011; presente estudio), los Diphyllidida (Justine, 1986), los Trypanorhyncha (Miquel & Świdorski, 2006a; Miquel *et al.*, 2007a; presente estudio), los Proteocephalida (Bruňanská *et al.*, 2003a,c, 2004a,b; presente estudio) y los Cyclophyllida-Mesocestoidida (Miquel *et al.*, 1999, 2007b).

En los Diphyllida, la escasez de microtúbulos corticales, observada durante la espermiogénesis, se aprecia también en el espermatozoide (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984; Azzouz-Draoui, 1985; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88). En el espermatozoide de *Echinobothrium euterpes* (presente estudio), los microtúbulos están muy reducidos y restringidos a la parte apical del espermatozoide, precisamente en la zona con cuerpo en cresta.

En el espermatozoide de los Cyclophyllida y de los Tetracystida, los microtúbulos corticales son espiralados. El ángulo de torsión de los microtúbulos puede variar según los grupos. Está entre 15 y 50° en los Anoplocephalida (Bâ *et al.*, 1991; Bâ & Marchand, 1994b), entre 45 y 60° en los Davaineida (Bâ & Marchand, 1994c; Bâ *et al.*, 2005a), alrededor de los 40° en los Catenotaeniida y Dipylidiida (Hidalgo *et al.*, 2000; Miquel *et al.*, 2005a), entre 30 y 45° en los Dilepidida (Świdorski *et al.*, 2000; Yoneva *et al.*, 2006a), sobre los 45° en los Gryporhynchida (Yoneva *et al.*, 2008), entre 15 y 30° en los Hymenolepidida (Bâ & Marchand, 1992a, 1996a), entre 30 y 40° en los Metadilepidida (Yoneva *et al.*, 2006b), entre 35 y 40° en los Paruterinida (Yoneva *et al.*, 2009, 2010) y entre 40 y 50° en los Taeniida (Featherston, 1971).

Los cestodos también pueden presentar gránulos densos a los electrones a lo largo de casi todo el espermatozoide. La naturaleza glicogénica de estos gránulos se puede confirmar con el test citoquímico de Thiéry (1967). Según su distribución en roseta o en gránulos dispersos, se puede discernir los tipos α o β de glicógeno. Sin embargo, no todos los autores han ensayado este test. Ello es importante, ya que en

algunos Cyclophyllidea el test de Thiéry ha revelado la existencia de otro tipo de gránulos densos a los electrones, que no son glicogéno. Es el caso de *Molluscotaenia crassiscolex* (presente estudio).

Por otra parte, en los Mesocestoididae (Miquel *et al.*, 1999, 2007b) los gránulos de glicógeno, evidenciados por el test de Thiéry, están distribuidos en cordón espiralado. Esta disposición sólo ha sido descrita en este grupo.

Existen otros tipos de inclusiones presentes en los cestodos Cyclophyllidea, como los gránulos proteicos, más gruesos, y otros gránulos de tamaño intermedio entre las partículas proteicas y los gránulos de glicógeno.

Según Justine (2001), la presencia de los microtúbulos torsionados y de la vaina periaxonemal sería una sinapomorfía para los Cyclophyllidea+Tetrabothriidea. En referencia al este último carácter, su atribución como sinapomorfía es aventurada, ya que no está presente en algunos Anoplocephalidae, Hymenolepididae y Nematotaeniidae (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1990; Bâ *et al.*, 1991, 2000, 2002; Bâ & Marchand, 1992a,b, 1993, 1994b, 1996a, 1998; Miquel & Marchand, 1998a,b; Li *et al.*, 2003; Miquel *et al.*, 2004; Eira *et al.*, 2006).

Otra estructura observada en los Cyclophyllidea es la pared intracitoplasmática, descrita en todas las especies con vaina periaxonemal (véase Justine, 1998a).

En algunos espermatozoides de eucestodos, se puede encontrar una formación submembranar densa a los electrones, los denominados puntos de fusión. Estas zonas, densas a los electrones, indicarían la zona de fusión de los flagelos con la expansión citoplasmática. Se han observado en los Spathebothriidea (Bruňanská *et al.*, 2006; Bruňanská & Poddubnaya, 2010), en los Diphyllbothriidea (Levron *et al.*, 2006a, 2009, 2011), en los Bothriocephalidea (Bruňanská *et al.*, 2002, 2010; Levron *et al.*, 2006b,c; Šípková *et al.*, 2011; presente estudio) y en los Trypanorhyncha (Świderski, 1976a, 1994; McKerr, 1985; Miquel & Świderski, 2006a; Miquel *et al.*, 2007a; presente estudio).

Conclusiones

Las conclusiones que se extraen del presente estudio son las siguientes:

1. *Acanthobothrium crassicolle* se caracteriza por ostentar un modelo espermiogénico de tipo I y un espermatozoide de tipo II. El presente estudio

confirma el arco de microtúbulos corticales gruesos como característico de los Tetrphyllidea-Onchobothriidae.

2. Se confirma la parafilia de los Tetrphyllidea. El estudio del Tetrphyllidea-Onchobothriidae *Acanthobothrium crassicolle* ha permitido validar el tipo I de espermiogénesis y el tipo II de espermatozoide en este grupo.
3. *Aporhynchus menezesi* se caracteriza por presentar una espermiogénesis de tipo I y una organización del espermatozoide que responde al tipo I. La presencia de un arco de microtúbulos corticales gruesos en la parte anterior del espermatozoide se muestra también constante en el orden Trypanorhyncha.
4. Las ligeras diferencias ultraestructurales observadas en *Aporhynchus menezesi* (Gymnorhynchoidea) en relación a otras especies de otras superfamilias no son suficientes para apoyar el posible carácter polifilético de los Trypanorhyncha.
5. *Barsonella lafoni* presenta una espermiogénesis de tipo I y un espermatozoide de tipo II, modelos constantes para el orden Proteocephalidea. El cuerpo intercentriolar reducido y el arco de microtúbulos corticales gruesos se confirman también como caracteres típicos de este orden. *Sandonella sandoni* se muestra como una especie problemática en relación a la ultraestructura del espermatozoide. El estudio de la espermiogénesis en esta especie o en otro Sandonellidae sería muy importante.
6. Se describe por primera vez la presencia de un material denso a los electrones en la zona de diferenciación de *Barsonella lafoni* durante las fases iniciales de la espermiogénesis. Este carácter, hasta la fecha, se atribuía sólo a grupos de cestodos basales.
7. *Clestobothrium crassiceps* se caracteriza por presentar los tipos I de espermiogénesis y II de espermatozoide. Estos modelos son constantes en todo el orden. La presencia de un material denso a los electrones en los estadios iniciales de la espermiogénesis, el cuerpo intercentriolar reducido y la presencia de un anillo de microtúbulos corticales gruesos en el espermatozoide se confirman también como caracteres típicos del orden Bothriocephalidea.
8. El tipo de espermatozoide (I o II) y la presencia o ausencia del anillo de microtúbulos corticales son aspectos importantes que permiten apoyar la erección

de los Diphyllbothriidea y los Bothriocephalidea como nuevos órdenes a partir de los "Pseudophyllidea".

9. *Echinobothrium euterpes* sigue el patrón I de espermiogénesis. La degeneración de un corto axonema formado durante la espermiogénesis conduce a la formación de un espermatozoide de tipo IV. La disparidad existente entre las especies estudiadas a nivel del número de axonemas queda resuelta con el estudio de *Echinobothrium euterpes*.
10. La ausencia o la gran reducción de los microtúbulos corticales se confirma para el orden Diphyllidea. Esta reducción se compensaría por la presencia de gran cantidad de glicógeno distribuido por todo el espermatozoide.
11. En los Diphyllidea, las raíces estriadas típicas descritas en los cestodos son sustituidas por unas masas triangulares opacas, de aspecto granular y carentes de estriación. Este carácter, sólo descrito en los Diphyllidea, podría ser una autapomorfía para este grupo.
12. *Molluscotaenia crassiscolex* se caracteriza por una espermiogénesis de tipo IV y por una organización ultraestructural del espermatozoide coincidente con el tipo VI. Estos modelos se confirman para los Dilepididae *sensu stricto*. Se describe en *Molluscotaenia crassiscolex* una forma nueva de cuerpo en cresta.
13. El análisis global de los datos espermatológicos existentes en los Dilepididae *sensu lato* permite discernir los Dilepididae *sensu stricto* de los Dipylidiidae, Metadilepididae y Paruterinidae (familias antes incluidas en los Dilepididae *sensu lato*), pero no permite distinguirlos de los Gryporhynchidae.



CHAPITRE I : *INTRODUCTION*

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Le présent travail porte essentiellement sur l'ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde de six espèces de cestodes appartenant à six ordres. Il vise à augmenter les connaissances actuelles, à corroborer les différents schémas spermiogénétiques antérieurs et à apporter quelques précisions sur certains doutes et incohérences.

Il comporte cinq chapitres.

Le premier est un bref rappel de l'intérêt des études ultrastructurales de la spermiogenèse et du spermatozoïde dans la Systématique et la Phylogénie des Cestodes. Dans cette partie, nous présentons les principales contributions des auteurs, l'état actuel des connaissances sur l'ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde des cestodes et les objectifs de notre étude.

Le second est consacré aux hôtes et aux caractéristiques morfo-anatomiques et bioécologiques des cestodes étudiés. Ainsi, pour chaque espèce de cestode, nous avons indiqué l'hôte, le lieu de récolte de l'hôte, la position systématique, les caractères morfo-anatomiques le cycle évolutif et la répartition géographique. De plus, les techniques utilisées en microscopie électronique à transmission sont détaillées à la fin de ce chapitre.

Le troisième correspond à nos principaux résultats, parus ou à paraître dans des revues internationales de parasitologie et/ou de zoologie.

Le quatrième est une discussion globale de nos résultats sur la spermiogenèse et le spermatozoïde des cestodes.

Les conclusions qui en découlent forment le dernier chapitre.

Toutes les références bibliographiques qui apparaissent dans le présent Mémoire seront répertoriées à la fin.

I.1. Intérêt des études ultrastructurales de la spermiogénèse et du spermatozoïde des Plathelminthes parasites

La classification strictement basée sur la morphologie classique a souvent posé un grand problème. Selon Littlewood *et al.* (1998), bien que la base des données morphologiques sur les Plathelminthes soit vaste, elle est très peu fiable pour être utilisée à des fins phylogénétiques.

Ainsi, depuis les années 70, les études en microscopie électronique des Plathelminthes se sont multipliées et ce sont axées principalement sur des problèmes de phylogénie. Parmi ces études ultrastructurales, celles de la spermiogénèse et du spermatozoïde sont d'une grande importance. En effet, elles permettent de mieux comprendre le processus de formation du gamète mâle et de mettre en évidence l'existence de caractères ultrastructuraux, utiles pour affiner les relations phylogénétiques au sein et entre différents groupes de Plathelminthes (Hendelberg, 1969 ; Euzet *et al.*, 1981 ; Ehlers, 1984, 1985a,b, 1986, 1988 ; Brooks *et al.*, 1985 ; Świdorski, 1986a,b ; Justine, 1991a,b, 1995, 1997, 1998a,b, 1999, 2001, 2003 ; Bâ & Marchand, 1994d, 1995 ; Watson & Rohde, 1995 ; Hoberg *et al.*, 1997 ; Bruňanská, 2010 ; Levron *et al.*, 2010).

Des études moléculaires, récentes, ont aussi eu une grande portée phylogénétique. Elles ont été associées ou non à des études ultrastructurales, ou à la morphologie classique (Hoberg *et al.*, 1997 ; Mariaux, 1998 ; Olson *et al.*, 1999, 2001 ; Baguñà & Riutort, 2004 ; Olson & Tkach, 2005 ; Waeschenbach *et al.*, 2007 ; Kutcha *et al.*, 2008a).

L'établissement du taxon Trepaxonemata défini sur la base de caractères ultrastructuraux par Ehlers (1984) représente le premier cas historique de synapomorphie chez les Plathelminthes. Ce taxon est caractérisé par la présence d'un axonème torsadé qui fait référence à la structure hélicoïdale de l'élément centrale de l'axonème 9+'1'. Cette structure tout à fait particulière n'est rencontrée dans aucun autre embranchement. Par ailleurs, les cils somatiques des Trepaxonemata sont de type 9+2 ; donc chez un même organisme peuvent coexister les deux modèles.

Cependant, Euzet *et al.* (1981) furent les premiers à essayer d'établir, à partir du nombre d'axonème dans les spermatozoïdes des cestodes, une relation phylogénétique entre six

ordres : Tetrarhynchidea, Pseudophyllidea, Tetraphyllidea, Proteocephalidea, Caryophyllaeidea et Cyclophyllidea.

Justine (1991a), à partir d'études ultrastructurales, a pu mettre en évidence l'existence de nombreuses synapomorphies qui eurent un grand intérêt sur la phylogénie des Plathelminthes parasites :

1. Chez les Plathelminthes parasites appartenant aux Cercomeridea, les centrioles apparaissent à la base des spermatides en élongation et les flagelles s'incorporent à l'expansion cytoplasmique durant un processus de fusion proximo-distale.
2. Chez les Monogènes Polyopisthocotylea, la région principale du spermatozoïde est caractérisée par la présence de microtubules latéraux.
3. Les Monogènes Monopisthocotylea sont démunis de microtubules dorsaux et ventraux dans leur région principale.
4. Les Temnocephalidea sont caractérisés par la présence d'une couche de microtubules corticaux longitudinaux et qui forme une spirale bien visible en coupe transversale.
5. Les Neodermata se discernent par l'absence de granules opaques aux électrons
6. Les Eucestoda sont caractérisés par l'absence de mitochondries dans le spermatozoïde, aspect qui les différencie des Digènes.
7. Les Cyclophyllidea sont caractérisés par une torsion des microtubules corticaux aspect qui les différencie des cestodes non Cyclophyllidea. Cependant, le problème des Mesocestoididae (Cyclophyllidea) reste encore posé.

Świdorski (1986a) distingue trois types fondamentaux de spermiogénèse (Fig. 1) chez les cestodes en se basant principalement sur le nombre de flagelles issus de la zone de différenciation et l'existence ou non d'une fusion complète entre le ou les flagelles et l'expansion cytoplasmique médiane. Il s'agit des types « Pseudophyllidea », « Caryophyllidea » et « Cyclophyllidea ».

Neuf années plus tard, grâce à une base de données spermatologiques plus large, Bâ & Marchand (1995) proposèrent quatre types de spermiogénèse chez les Eucestoda (types I à IV, Fig. 2) basés sur trois critères :

- le nombre de flagelles (un ou deux) 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

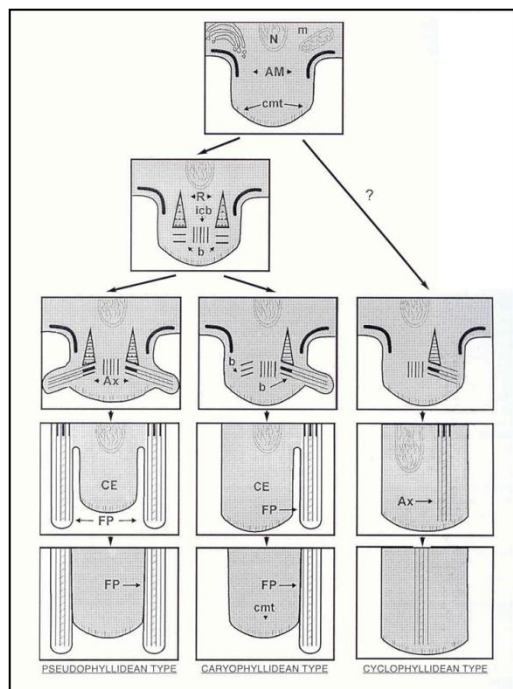


Fig. 1. Types de spermiogénèse chez les cestodes (d'après Świdorski, 1986a)

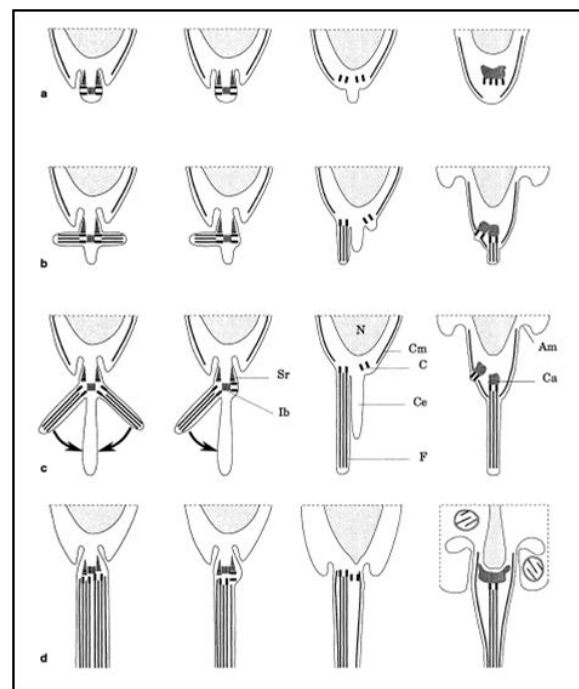


Fig. 2. Types de spermiogénèse chez les cestodes (d'après Bâ & Marchand, 1995)

Dans cette même étude Bâ & Marchand (1995) considèrent que :

- la rotation flagellaire et la fusion proximo-distale sont des caractères plésiomorphes chez les 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 chez les Eucestoda
- l'absence de mitochondrie est une synapomorphie pour les Eucestoda

L'intérêt phylogénétique des études ultrastructurales fut également souligné par Hoberg *et al.* (1997) qui ont associé des caractères morphologiques et neuf caractères spermatologiques, à savoir :

- 1- le nombre d'axonèmes dans le spermatozoïde
- 2- la disposition, parallèle ou en spirale, des microtubules corticaux
- 3- la présence d'un ou de deux types de microtubules corticaux
- 4- la présence ou non de mitochondrie

- 5- la présence ou non de corps en crête
- 6- la présence ou non de gaine périaxonemal
- 7- le type de spermiogenèse
- 8- la présence ou non de racines striées associées aux centrioles
- 9- la présence ou non de corps intercentriolaire

En 1998, Justine fit une révision, à des fins phylogénétiques, des caractères ultrastructuraux de la spermiogenèse et du spermatozoïde des Eucestoda. Les caractères qu'il a retenus sont les suivants : le nombre de flagelles dans la zone de différenciation, le nombre d'axonèmes dans le spermatozoïde, la présence ou non d'un corps intercentriolaire, de racines striées, de microtubules corticaux, d'une rotation flagellaire, d'une fusion proximo-distale, de corps en crête, d'une gaine periaxonemale, de parois intracytoplasmiques et la disposition des microtubules corticaux. Justine (1998a) put définir diverses synapomorphies dont certaines avaient déjà été signalées par d'autres auteurs (Justine, 1991a,b ; Bâ & Marchand, 1995). Ces synapomorphies sont, essentiellement :

1. l'absence de mitochondrie dans le spermatozoïde des Eucestoda
2. la présence de corps en crête dans le spermatozoïde des Eucestoda
3. l'absence de corps intercentriolaire chez les Tetrabothriidea et les Cyclophyllidea
4. l'absence de racines striées chez les Tetrabothriidea et les Cyclophyllidea
5. la présence de microtubules corticaux spiralés chez les Tetrabothriidea et les Cyclophyllidea
6. la présence d'une gaine périaxonemale dans le spermatozoïde des Tetrabothriidea et des Cyclophyllidea
7. l'absence de rotation flagellaire chez les Cyclophyllidea
8. la présence d'un seul axonème dans la zone de différenciation chez les Cyclophyllidea
9. la présence de deux types de microtubules corticaux, chez les Tetrabothriidea-Onchobothriidae et les Cyclophyllidea-Phyllobothriidae

Justine (2001), en ajoutant de nouvelles données sur, en particulier, les Lecanicephalidea et les Mesocestoididae, a pu mettre en évidence l'existence d'autres synapomorphies telles que :

1. l'absence de mitochondries dans le spermatozoïde des Eucestoda
2. la présence d'un ou de plusieurs corps en crête dans le spermatozoïde des Eucestoda
3. l'absence de corps intercentriolaire constitué de plusieurs bandes claires et sombres disposées en alternance, chez les cestodes les plus évolués
4. l'absence de racines striées chez les Cyclophyllidea
5. la présence de microtubules corticaux spiralés chez les Tetrabothriidea et les Cyclophyllidea
6. la présence d'une gaine périaxonémale dans le spermatozoïde des Tetrabothriidea et certains Cyclophyllidea
7. l'absence de rotation flagellaire chez les Cyclophyllidea
8. la présence d'un seul axonème dans la zone de différenciation chez les Cyclophyllidea
9. la présence de deux types de microtubules corticaux chez les Tetraphyllidea-Onchobothriidae et les Tetraphyllidea-Phyllobothriidae
10. l'absence de fusion proximo-distale chez certains Cyclophyllidea

Récemment, suivant la même logique, Levron *et al.* (2010) effectuèrent une autre révision de l'ultrastructure de la spermiogénèse et du spermatozoïde des Eucestoda. Se basant seulement sur les caractères ultrastructuraux du spermatozoïde, ils proposèrent l'arbre phylogénétique ci-dessous (Fig. 3) :

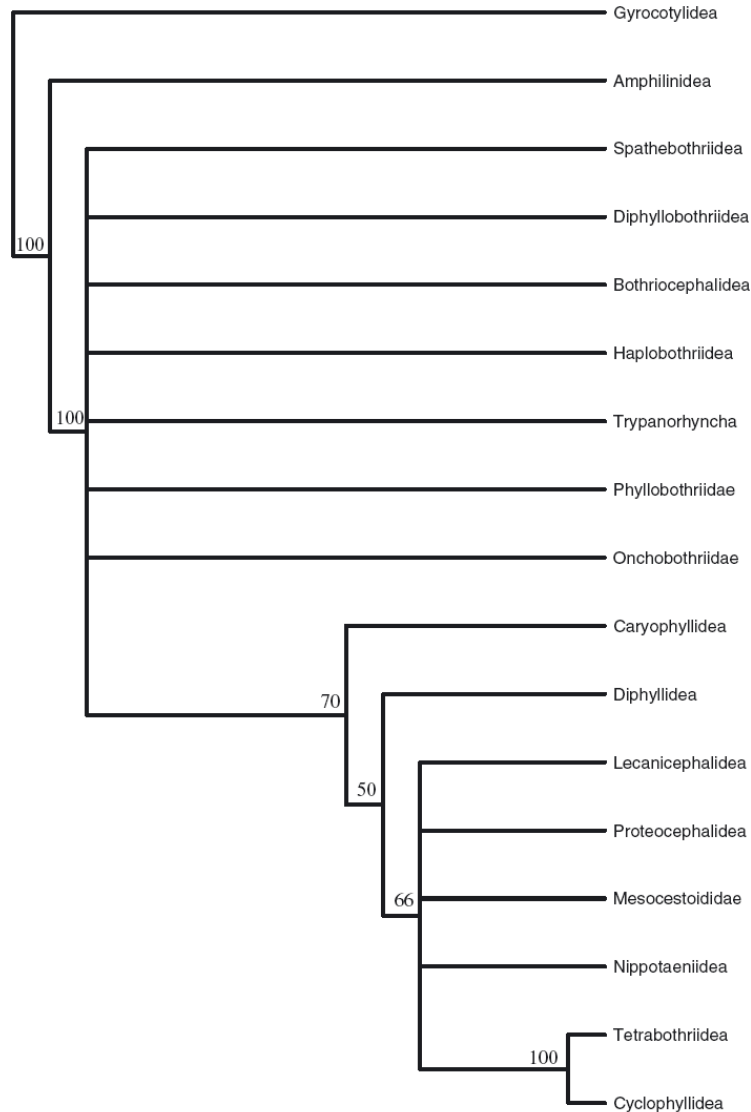


Fig. 3. Arbre phylogénétique des cestodes basé sur l'analyse de caractères spermatologiques (d'après Levron *et al.*, 2010)

De l'analyse des caractères morphologiques du spermatozoïde de tous les cestodes étudiés, ils proposèrent sept types de spermatozoïdes (Fig. 4), en se basant sur les six caractères suivants :

- 1- la présence d'un ou de deux axonèmes
- 2- la disposition des microtubules corticaux (parallèles ou en spirale)
- 3- la disposition du noyau (parallèle ou en spirale)
- 4- la présence ou non de corps en crête
- 5- la présence ou non de gaine périaxonémale
- 6- la présence ou non de parois intracytoplasmiques

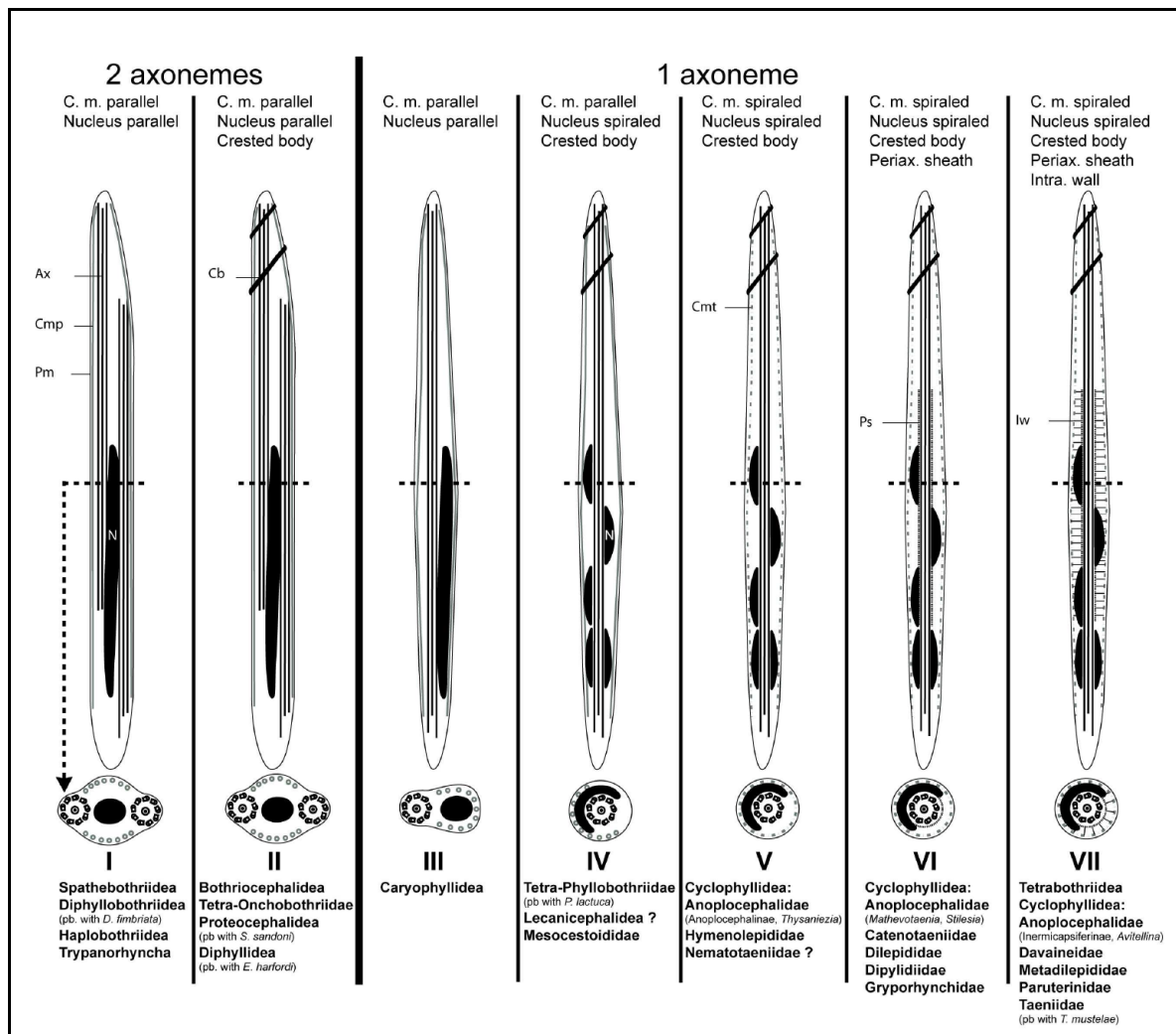


Fig. 4. Types de spermatozoïdes chez les Eucestoda (d'après Levron *et al.*, 2010)

I.2. Etat actuel des connaissances sur la spermiogénèse et le spermatozoïde des Eucestoda

Les cestodes représentent un groupe de parasites internes très important, du point de vue numérique. Selon Georgiev (2003), la classe renfermerait plus de 5000 espèces, réparties dans environ 680 genres, 72 familles et 15 ordres dont les Cyclophyllidea. Ce dernier, à lui seul, comprend plus de la moitié des espèces, soit environ 3100 espèces appartenant à 380 genres et 18 familles.

Depuis 2003, la classe des cestodes ne cesse de grandir, avec des descriptions, de plus en plus nombreuses, de nouvelles espèces, de nouveaux genres, de nouvelles familles et de nouveaux ordres. Actuellement, le nombre exact d'espèces reste indéfini. Cependant,

on sait que la Classe compte 17 ordres, considérés comme valides, avec l'éclatement de l'ordre des « Pseudophyllidea » en deux nouveaux ordres, les Bothriocephalidea et les Diphyllbothriidea (Kuchta *et al.*, 2008a) et l'érection d'un nouvel ordre, les Rhinebothriidea (Healy *et al.*, 2009) qui constituaient une famille de Tetraphyllidea.

À ce jour, les ouvrages de base de classifications des cestodes aux niveaux ordinal, familial et générique restent incontestablement ceux de Schmidt (1986) et Khalil *et al.* (1994). Cependant, d'autres ouvrages de systématiques, spécifiques, existent sur les Trypanorhyncha (Palm, 2004), les Diphyllidea (Tyler, 2006), les Bothriocephalidea, les Diphyllbothriidea (Kuchta *et al.*, 2008a,b), les Rhinebothriidea (Healy *et al.*, 2009) et les Lecanicephalidea (Jensen, 2005).

À notre connaissance, plus d'une centaine d'espèces de cestodes dont autour de 60 appartenant à l'ordre des Cyclophyllidea, ont fait l'objet d'une étude ultrastructurale, complète ou partielle, de la spermiogenèse et/ou du spermatozoïde (Tableau I).

Dans cette liste sont incluses les espèces étudiées dans le présent travail.

Cestodes (systématique)	Spg	Spz	Références
Ordre CARYOPHYLLIDEA van Beneden dans Carus, 1863			
Famille Capingentidae Hunter, 1930			
Genre <i>Breviscolex</i> Kulakovskaya, 1962			
<i>Breviscolex orientalis</i> Kulakovskaya, 1962	+	+	Yoneva <i>et al.</i> (2011)
Famille Caryophyllaeidae Leuckart, 1878			
Genre <i>Caryophyllaeus</i> Gmelin, 1790			
<i>Caryophyllaeus laticeps</i> (Pallas, 1781)			Bruňanská & Kostič (2011)
Genre <i>Glaridacris</i> Cooper, 1920			
<i>Glaridacris catostomi</i> Cooper, 1920	+	+	Świderski & Mackiewicz (1976, 2002), Euzet <i>et al.</i> (1981), Świderski (1986a, 2001), Miquel <i>et al.</i> (2008a)
Genre <i>Monobothrium</i> Diesing, 1863			
<i>Monobothrium wageneri</i> Nybelin, 1922		+	Mehlhorn (1988)
Genre <i>Wenyonia</i> Woodland, 1923			
<i>Wenyonia virilis</i> Woodland, 1923	+	+	Gamil (2008), Miquel <i>et al.</i> (2008a)
Famille Lytocestidae Hunter, 1927			
Genre <i>Khawia</i> Hsu, 1935			
<i>Khawia armeniaca</i> Cholodkovski, 1915	+	+	Bruňanská & Poddubnaya (2006)
<i>Khawia sinensis</i> Hsü, 1935	+	+	Bruňanská (2009)
Genre <i>Monobothrioides</i> Fuhrmann & Baer, 1925			
<i>Monobothrioides chalmersius</i> Woodland, 1924		+	Arafa & Hamada (2004)
<i>Monobothrioides chalmersius</i> Woodland, 1924	+	+	
Ordre SPATHEBOTRHIIDEA Wardle & McLeod, 1952			
Famille Acrobothriidae Olson, 1872			
Genre <i>Bothrimonus</i> Duvernoy, 1842			
<i>Bothrimonus sturionis</i> Duvernoy, 1842		+	MacKinnon & Burt (1984)
Genre <i>Cyathocephalus</i> Kessler, 1868			
<i>Cyathocephalus truncatus</i> (Pallas, 1781)	+	+	Bruňanská <i>et al.</i> (2006)
Genre <i>Didymobothrium</i> Nybelin, 1922			
<i>Didymobothrium rudolphii</i> (Monticelli, 1890)	+	+	Bruňanská & Poddubnaya (2010)

Ordre DIPHYLLOBOTHRIDEA Kuchta et al., 2008			
Famille Diphyllobothriidae Lühe, 1910			
Genre <i>Diphyllobothrium</i> Cobbold, 1858			
<i>Diphyllobothrium latum</i> (Linnaeus, 1758)	+	+	Bonsdorff & Telkkä (1965), Levron et al. (2006a)
Genre <i>Ligula</i> Bloch, 1782			
<i>Ligula intestinalis</i> (Linnaeus, 1758)	+	+	Levron et al. (2009)
Genre <i>Schistocephalus</i> Creplin, 1829			
<i>Schistocephalus solidus</i> (Müller, 1776)	+	+	Levron et al. (2011)
Famille Scyphocephalidae Freze, 1974			
Genre <i>Duthiersia</i> Perrier, 1873			
<i>Duthiersia fimbriata</i> (Diesing, 1850)		+	Justine (1986)
Ordre BOTHERIOCEPHALLIDEA Kuchta et al., 2008			
Famille Bothriocephalidae (Blanchard, 1849)			
Genre <i>Bothriocephalus</i> Rudolphi, 1808			
<i>Bothriocephalus clavibothrium</i> Ariola, 1901	+	+	Świdorski & Mokhtar-Maamouri (1980), Euzet et al. (1981)
<i>Bothriocephalus claviceps</i> (Goeze, 1782)	+	+	Bâ et al. (2007)
<i>Bothriocephalus scorpii</i> (Müller, 1776)	+	+	Levron et al. (2006b)
Genre <i>Clestobothrium</i> Lühe, 1899			
<i>Clestobothrium crassiceps</i> (Rudolphi, 1819)	+	+	Marigo et al. (2011a), Marigo & Miquel (2011)
Genre <i>Oncodiscus</i> Yamaguti, 1934			
<i>Oncodiscus sauridae</i> Yamaguti, 1934	+	+	Šípková et al. (2011)
Genre <i>Senga</i> Dollfus, 1934			
<i>Senga</i> sp.	+	+	Šípková et al. (2011)
Famille Echinophallidae Schumacher, 1914			
Genre <i>Parabothriocephaloides</i> Yamaguti, 1934			
<i>Parabothriocephalus gracilis</i> Yamaguti, 1934	+	+	Šípková et al. (2010)
Genre <i>Paraechinophallus</i> Protasova, 1975			
<i>Paraechinophallus japonicus</i> (Yamaguti, 1934)	+	+	Levron et al. (2006c)

Famille Triaenophoridae Lönnberg, 1889				
Genre <i>Eubothrium</i> Nybelin, 1920				
<i>Eubothrium crassum</i> (Bloch, 1779)	+	+		Bruňanská <i>et al.</i> (2001, 2002, 2010)
<i>Eubothrium rugosum</i> (Batsch, 1786)	+	+		Bruňanská <i>et al.</i> (2010)
Genre <i>Triaenophorus</i> Rudolphi, 1793				
<i>Triaenophorus nodulosus</i> (Pallas, 1781)	+	+		Levron <i>et al.</i> (2005)
Ordre HAPLOBOTHRIDEA Joyeux & Baer, 1961				
Famille Haplobothriidae Cooper, 1917				
Genre <i>Haplobothrium</i> Cooper, 1914				
<i>Haplobothrium globuliforme</i> Cooper, 1914	+			MacKinnon <i>et al.</i> (1983), MacKinnon & Burt (1985)
Ordre DIPHYLLIDEA van Beneden dans Carus, 1863				
Famille Echinobothriidae Perrier, 1897				
Genre <i>Echinobothrium</i> van Beneden, 1849				
<i>Echinobothrium affine</i> Diesing, 1863	+	+		Euzet <i>et al.</i> (1981), Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui (1984), Azzouz-Draoui (1985), Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri (1986/88)
<i>Echinobothrium brachysoma</i> Pintner, 1889	+	+		Azzouz-Draoui (1985)
<i>Echinobothrium euterpes</i> (Neifar, Tyler & Euzet, 2001)	+	+		Marigo <i>et al.</i> (2011b)
<i>Echinobothrium harfordi</i> Mac Vicar, 1976	+	+		Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui (1984), Azzouz-Draoui (1985), Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri (1986/88)
<i>Echinobothrium typus</i> van Beneden, 1849	+	+		Euzet <i>et al.</i> (1981), Azzouz-Draoui (1985)
Ordre TRYPANORHYNCHA Diesing, 1863				
Super-famille Eutetrarhynchoidea Guiart, 1927				
Famille Eutetrarhynchidae Guiart, 1927				
Genre <i>Dollfusietta</i> Campbell & Beveridge, 1994				
<i>Dollfusietta spinulifera</i> Beveridge & Jones, 2000	+			Miquel & Świderski (2006a,b)
Genre <i>Parachristianella</i> Dollfus, 1946				
<i>Parachristianella trygonis</i> Dollfus, 1946	+			Miquel <i>et al.</i> (2007a)

Super-famille Gymnorhynchoidea Dollfus, 1935				
Famille Aporhynchidae Poche, 1926				
Genre <i>Aporhynchus</i> Nybelin, 1918				
<i>Aporhynchus menezesi</i> Noever, Caira, Kuchta & Desjardins, 2010	+	+	+	Marigo <i>et al.</i> (2010a, 2011c)
Super-famille Lacistorhynchoidea Guiart, 1927				
Famille Lacistorhynchidae Guiart, 1927				
Sous-famille Grillotiinae Dollfus, 1942				
Genre <i>Grillotia</i> Guiart, 1927				
<i>Grillotia erinaceus</i> (van Beneden, 1858)	+	+	+	McKerr (1985)
Sous-famille Lacistorhynchinae Guiart, 1927				
Genre <i>Lacistorhynchus</i> Pintner, 1913				
<i>Lacistorhynchus tenuis</i> (van Beneden, 1858)	+	+	+	Świderski (1976a, 1994), Euzet <i>et al.</i> (1981)
Ordre TETRAPHYLLEA Carus, 1863				
Famille Onchobothridae Braun, 1900				
Genre <i>Acanthobothrium</i> van Beneden, 1849				
<i>Acanthobothrium crassicolle</i> Wedl, 1855	+	+	+	Marigo <i>et al.</i> (2009, 2011d), Marigo (2010)
<i>Acanthobothrium filicolle benedenii</i> Loennberg, 1889	+	+	+	Mokhtar-Maamouri & Świderski (1975), Euzet <i>et al.</i> (1981), Świderski (1986a)
<i>Acanthobothrium filicolle filicolle</i> Zschokke, 1887	+	+	+	Mokhtar-Maamouri (1976, 1980, 1982)
Genre <i>Calliobothrium</i> van Beneden, 1850				
<i>Calliobothrium verticillatum</i> (Rudolphi, 1819)	+	+	+	Quilichini (2007), Quilichini <i>et al.</i> (2007)
Genre <i>Onchobothrium</i> De Blainville, 1828				
<i>Onchobothrium uncinatum</i> (Rudolphi, 1819)	+	+	+	Mokhtar-Maamouri & Świderski (1975)

Famille Phyllobothriidae Braun, 1900			
Sous-famille Echeneibothriinae de Beauchamp, 1905			
Genre <i>Phyllobothrium</i> van Beneden, 1850			
<i>Phyllobothrium gracile</i> Wedl, 1855	+	+	Mokhtar-Maamouri (1976, 1979), Euzet <i>et al.</i> (1981)
<i>Phyllobothrium lactuca</i> van Beneden, 1850	+		Sène <i>et al.</i> (1998, 1999)
Genre <i>Pseudoanthobothrium</i> Baer, 1956			
<i>Pseudoanthobothrium hansenii</i> Baer, 1956		+	MacKinnon & Burt (1984)
Sous-famille Triloculariinae Yamaguti, 1959			
Genre <i>Trilocularia</i> Olsson, 1867			
<i>Trilocularia acanthiaevulgaris</i> Olsson, 1867		+	Mahendrasingam <i>et al.</i> (1989)
Ordre RHINEBOTHRIIDEA Healy <i>et al.</i>, 2009			
Genre <i>Echeneibothrium</i> van Beneden, 1850			
<i>Echeneibothrium beauchampi</i> Euzet, 1959		+	Mokhtar-Maamouri & Świdorski (1976), Euzet <i>et al.</i> (1981)
Ordre LECANICEPHALIDEA Wardle & McLeod, 1952			
Famille Tetragonocephalidae Yamaguti, 1959			
Genre <i>Tetragonocephalum</i> Shipley & Hornell, 1905			
<i>Tetragonocephalum</i> sp.		+	Justine (2001)
Ordre PROTEOCEPHALIDEA Mola, 1928			
Famille Monticelliidae La Rue, 1911			
Sous-famille Zygobothriinae Woodland, 1933			
Genre <i>Nomimoscolex</i> Woodland, 1934			
<i>Nomimoscolex</i> sp.		+	Sène <i>et al.</i> (1997)

Famille Proteocephalidae La Rue, 1911			
Sous-famille Corallobothriinae Freze, 1965			
Genre <i>Corallobothrium</i> Fritsch, 1866			
<i>Corallobothrium solidum Fritsch, 1886</i>	+	+	Bruňanská <i>et al.</i> (2004a, 2005)
Sous-famille Gangesiinae Mola, 1929			
Genre <i>Electrotaenia</i> Nybelin, 1942			
<i>Electrotaenia malopteruri (Fritsch, 1886)</i>	+	+	Bruňanská <i>et al.</i> (2004b)
Sous-famille Proteocephalinae Mola, 1929			
Genre <i>Barsonella</i> de Chambrier, Scholz, Beletew & Mariaux, 2009			
<i>Barsonella lafoni de Chambrier, Scholz, Beletew & Mariaux, 2009</i>	+	+	Marigo <i>et al.</i> (2011e)
Genre <i>Proteocephalus</i> Weinland, 1858			
<i>Proteocephalus longicollis (Zeder, 1800)</i>	+	+	Świderski & Eklun-Natey (1978), Euzet <i>et al.</i> (1981), Świderski (1985, 1996), Bruňanská <i>et al.</i> (2003a, 2004c)
<i>Proteocephalus torulosus (Batsch, 1786)</i>	+	+	Bruňanská <i>et al.</i> (2003b,c)
Sous-famille Sandonellinae Khalil, 1960			
Genre <i>Sandonella</i> Khalil, 1960			
<i>Sandonella sandoni (Lynsdale, 1960)</i>	+	+	Bâ & Marchand (1994a)
Ordre NIPPOTAENIDEA Yamaguti, 1939			
Famille Nippotaeniidae Yamaguti, 1939			
Genre <i>Amurotaenia</i> Akhmerov, 1941			
<i>Amurotaenia decidua Hine, 1977</i>	+		Weekes (1987)
Ordre TETRABOTHRIIDEA Baer, 1954			
Famille Tetrabothriidae Linton, 1891			
Genre <i>Tetrabothrius</i> Rudolphi, 1819			
<i>Tetrabothrius erostris Loennberg, 1896</i>	+	+	Stoitsova <i>et al.</i> (1995)

Ordre CYCLOPHYLLEA van Beneden dans Braun, 1900			
Famille Anoplocephalidae Cholodkovsky, 1902			
Sous-famille Anoplocephalinae Blanchard, 1891			
Genre <i>Anoplocephaloides</i> Baer, 1923			
<i>Anoplocephaloides dentata</i> (Galli-Valerio, 1905)	+	+	Miquel & Marchand (1998a), Miquel <i>et al.</i> (2001)
Genre <i>Aporina</i> Fuhrmann, 1902			
<i>Aporina delafondi</i> Railliet, 1892	+	+	Bâ & Marchand (1994b)
Genre <i>Gallegoides</i> Tenora & Mas-Coma, 1978			
<i>Gallegoides arfaai</i> (Mobedi & Ghadirian, 1977)	+	+	Miquel <i>et al.</i> (2004, 2005b), Eira <i>et al.</i> (2005)
Genre <i>Moniezia</i> Blanchard, 1891			
<i>Moniezia benedenii</i> (Moniez, 1879)	+	+	Bâ & Marchand (1992b)
<i>Moniezia expansa</i> (Rudolphi, 1810)	+	+	Świderski (1968), Bâ & Marchand (1992b), Li <i>et al.</i> (2003)
Genre <i>Monoecocestus</i> Beddard, 1914			
<i>Monoecocestus americanus</i> (Stiles, 1895)	+	+	MacKinnon & Burt (1984)
Genre <i>Mosgovoyia</i> Spasskii, 1951			
<i>Mosgovoyia ctenoides</i> (Railliet, 1890)	+	+	Eira (2004, 2006), Eira <i>et al.</i> (2006)
Genre <i>Sudarikovina</i> Spasskii, 1951			
<i>Sudarikovina taterae</i> Hunkeler, 1972	+	+	Bâ <i>et al.</i> (2000)
Genre <i>Paranoplocephala</i> Lühe, 1910			
<i>Paranoplocephala omphalodes</i> (Hermann, 1783)	+	+	Miquel & Marchand (1998b), Miquel <i>et al.</i> (2001)
Sous-famille Inermicapsiferinae López-Neyra, 1943			
Genre <i>Inermicapsifer</i> Janicki, 1910			
<i>Inermicapsifer guineensis</i> (Graham, 1908)	+	+	Bâ & Marchand (1994d,e), Bâ <i>et al.</i> (1996)
<i>Inermicapsifer madagascariensis</i> (Davaine, 1870)	+	+	Świderski (1970, 1984a,b), Bâ & Marchand (1994d,e)
Sous-famille Linstowiinae Fuhrmann, 1907			
Genre <i>Mathevotaenia</i> Akhmyan, 1946			
<i>Mathevotaenia herpestis</i> (Kofend, 1917)	+	+	Bâ & Marchand (1994f, 1996b)
Genre <i>Oochoristica</i> Lühe, 1898			
<i>Oochoristica agamae</i> Baylis, 1919	+	+	Świderski & Subilia (1985)

Sous-famille Thysanosomatinae Skryabin, 1933 Genre <i>Avitellina</i> Gough, 1911 <i>Avitellina centripunctata</i> (Rivolta, 1874) Genre <i>Stilesia</i> Railliet, 1893 <i>Stilesia globipunctata</i> (Rivolta, 1874) Genre <i>Thysaniezia</i> Skryabin, 1926 <i>Thysaniezia ovilla</i> (Rivolta, 1878)	+ + + +	Bâ & Marchand (1994d,g) Bâ & Marchand (1992c) Bâ <i>et al.</i> (1991)
Famille Catenotaeniidae Spasskii, 1950 Sous-famille Catenotaeniinae Spasskii, 1949 Genre <i>Catenotaenia</i> Janicki, 1904 <i>Catenotaenia pusilla</i> (Goeze, 1782)	+ +	Świdorski (1970), Hidalgo (1999), Torres <i>et al.</i> (1999), Hidalgo <i>et al.</i> (2000)
Sous-famille Skrjabinothaeniinae Genov & Tenora, 1979 Genre <i>Skrjabinothaenia</i> Akhumyan, 1946 <i>Skrjabinothaenia lobata</i> (Baer, 1925)	+ +	Miquel <i>et al.</i> (1997a), Torres <i>et al.</i> (1999)
Famille Davaineidae Braun, 1900 Sous-famille Davaineinae Braun, 1900 Genre <i>Cotugnia</i> Diamare, 1893 <i>Cotugnia polyacantha</i> Fuhrmann, 1909 Genre <i>Paroniella</i> Fuhrmann, 1920 <i>Paroniella reynoldsae</i> (Meggit, 1926) Genre <i>Raillietina</i> Fuhrmann, 1920 <i>Raillietina baeri</i> Meggit & Subramanian, 1927 <i>Raillietina carneostrobilata</i> Vassilev, 1967 <i>Raillietina micracantha</i> Fuhrmann, 1908 <i>Raillietina tunetensis</i> Joyeux & Houdemer, 1928	+ + + + + + + +	Bâ & Marchand (1994d) Bâ <i>et al.</i> (2005a) Bâ <i>et al.</i> (2005b) Polyakova-Krusteva & Vassilev (1973) Miquel <i>et al.</i> (2008b, 2010) Bâ & Marchand (1994c,d)

Famille Dilepididae Railliet & Henry, 1909				
Genre <i>Angularella</i> Strand, 1928				
<i>Angularella beema</i> (Clerc, 1906)	+	+		Yoneva <i>et al.</i> (2006a)
Genre <i>Dilepis</i> Weinland, 1858				
<i>Dilepis undula</i> (Schrank, 1788)	+	+		Świderski <i>et al.</i> (2000)
Genre <i>Kowalewskiiella</i> Baczynska, 1914				
<i>Kowalewskiiella glareola</i> (Burt, 1940)	+	+		Świderski <i>et al.</i> (2002)
Genre <i>Molluscotaenia</i> Spasskii & Andreiko, 1971				
<i>Molluscotaenia crassiscolex</i> (von Linstow, 1890)	+	+		Świderski & Tkach (1996a), Marigo (2010), Valent (2010), Marigo <i>et al.</i> (2010b, 2011f)
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,b), Miquel <i>et al.</i> (2005a)
Genre <i>Joyeuxiella</i> Fuhrmann, 1935				
<i>Joyeuxiella echinorhyncoides</i> (Sonsino, 1899)	+	+		Agostini <i>et al.</i> (2003), Ndiaye (2003), Ndiaye <i>et al.</i> (2003a), Miquel <i>et al.</i> (2005a)
<i>Joyeuxiella pasqualei</i> (Diamare, 1893)	+	+		Ndiaye (2003), Ndiaye <i>et al.</i> (2003a), Miquel <i>et al.</i> (2005a)
Famille Gryporhynchidae Spasskii & Spasskaya, 1973				
Genre <i>Valipora</i> Linton, 1927				
<i>Valipora mutabilis</i> Linton, 1927	+	+		Yoneva <i>et al.</i> (2008)

Famille Hymenolepididae (Ariola, 1899)			
Sous-famille Hymenolepidinae Perrier, 1897			
Genre <i>Cladogynia</i> Baer, 1938			Świderski & Chomicz (1994) Bâ & Marchand (1993)
<i>Cladogynia guberiana</i> (Czaplinski, 1965)			
<i>Cladogynia serrata</i> (Fuhrmann, 1906)			
Genre <i>Dicranotaenia</i> Railliet, 1892			Chomicz & Świderski (1992a)
<i>Dicranotaenia coronula</i> (Dujardin, 1845)	+		Chomicz & Świderski (1992b)
Genre <i>Diorchis</i> Clerc, 1903			
<i>Diorchis parvogenitalis</i> Skrjabin & Mathevossian, 1945	+		Bâ <i>et al.</i> (2002)
Genre <i>Echinocotyle</i> Blanchard, 1891			Rosario (1964), Lumsden (1965), Sun (1972), Świderski (1976b), Kelsoe <i>et al.</i> (1977), Robinson & Bogitsh (1978), Coil (1991)
<i>Echinocotyle dolosa</i> Joyeux & Baer, 1928	+		Ndiaye (2002a), Miquel <i>et al.</i> (2007c)
Genre <i>Hymenolepis</i> Weinland, 1858			
<i>Hymenolepis diminuta</i> (Rudolphi, 1819)	+		Świderski & Tkach (1996b)
<i>Hymenolepis sulcata</i> (von Linstow, 1879)	+		Ndiaye (2002a), Miquel <i>et al.</i> (2007c)
Genre <i>Monorcholepis</i> Oshmarin, 1961			Świderski (1970, 1986), Euzet <i>et al.</i> (1981), Bâ & Marchand (1998)
<i>Monorcholepis dujardini</i> (Krabbe, 1869)	+		Ndiaye (2002a), Miquel <i>et al.</i> (2007c)
Genre <i>Rodentolepis</i> Spasskii, 1954			
<i>Rodentolepis fraterna</i> (Stiles, 1906)	+		Rosario (1964), Mehlhorn (1988), Abouzakham <i>et al.</i> (1990), Bâ & Marchand (1992a)
<i>Rodentolepis microstoma</i> (Dujardin, 1845)	+		Bâ & Marchand (1996a), Ndiaye (2002a), Miquel <i>et al.</i> (2007c)
<i>Rodentolepis myoxi</i> (Rudolphi, 1819)	+		Ndiaye (2002a)
<i>Rodentolepis nana</i> (von Siebold, 1852)	+		
<i>Rodentolepis straminea</i> (Goeze, 1782)	+		
<i>Rodentolepis</i> sp.	+		Ndiaye (2002a)

Famille Mesocestoididae Fuhrmann, 1907 Sous-famille Mesocestoidinae Lühe, 1894 Genre <i>Mesocestoides</i> Vaillant, 1863 <i>Mesocestoides lineatus</i> (Goeze, 1782) <i>Mesocestoides litteratus</i> (Batsch, 1786)	+	+	Conn (2001), Miquel <i>et al.</i> (2007b) Feliu <i>et al.</i> (1999), Hidalgo (1999), Hidalgo <i>et al.</i> (1999), Miquel <i>et al.</i> (1999)
Famille Metadilepidae Spasski, 1959 Genre <i>Skrjabinoporus</i> Spasskii & Borgarenko, 1960 <i>Skrjabinoporus merops</i> (Woodland, 1928)	+	+	Yoneva <i>et al.</i> (2006b)
Famille Nematotaeniidae Lühe, 1910 Genre <i>Cylindrotaenia</i> Jewell, 1916 <i>Cylindrotaenia hickmani</i> (Jones, 1985) Genre <i>Nematotaenia</i> Lühe, 1899 <i>Nematotaenia chantalae</i> Dollfus, 1957	+	+	Jones (1989, 1994) Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui (1990)
Famille Paruterinidae Fuhrmann, 1907 Genre <i>Anonchotaenia</i> Cohn, 1900 <i>Anonchotaenia globata</i> (von Linstow, 1879) Genre <i>Triaeorhina</i> Spasskii & Shumilo, 1965 <i>Triaeorhina rectangula</i> (Fuhrmann, 1908)	+	+	Yoneva <i>et al.</i> (2010) Yoneva <i>et al.</i> (2009)

Famille Taeniidae Ludwig, 1886			
Sous-famille Taeniinae Stiles, 1896			
Genre <i>Taenia</i> Linnaeus, 1758			
<i>Taenia crassiceps</i> (Zeder, 1800)	+	+	Willms <i>et al.</i> (2004), Willms & Robert (2007)
<i>Taenia hydatigena</i> Pallas, 1766	+	+	Featherston (1971)
<i>Taenia mustelae</i> Gmelin, 1790		+	Hidalgo (1999), Miquel <i>et al.</i> (2000a,b)
<i>Taenia parva</i> Baer, 1926		+	Ndiaye (2002b, 2003), Ndiaye <i>et al.</i> (2003b)
<i>Taenia pisiformis</i> (Bloch, 1780)		+	Tian <i>et al.</i> (1998a,b)
<i>Taenia saginata</i> (Goeze, 1782)		+	Tian <i>et al.</i> (1998a,b), Bâ <i>et al.</i> (2011)
<i>Taenia solium</i> Linnaeus, 1758		+	Tian <i>et al.</i> (1998a,b), Willms <i>et al.</i> (2003)
<i>Taenia taeniaeformis</i> (Batsch, 1786)	+	+	Miquel <i>et al.</i> (2009a,b)
Sous-famille Echinococcinae Abuladze, 1960			
Genre <i>Echinococcus</i> Rudolphi, 1801			
<i>Echinococcus granulosis</i> (Batsch, 1786)		+	Morseth (1969)
<i>Echinococcus multilocularis</i> Leuckart, 1863		+	Barret & Smyth (1983), Shi <i>et al.</i> (1994)

Tableau I. Etat actuel des connaissances sur l'ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde chez les Eucestoda incluant les espèces étudiées dans le présent Mémoire

I.3. Objectifs

Dans ce travail, nous avons étudié six espèces de cestodes appartenant à six ordres, jusqu'ici peu ou pas étudiées du point de spermatologique. Le choix des espèces est essentiellement fondé d'une part, sur leur disponibilité, d'autre part sur leur importance éventuelle en Taxonomie et Phylogénie.

Ainsi, notre étude pourrait permettre de définir, dans certains cas, le véritable schéma général de formation du spermatozoïde ainsi que son organisation ultrastructurale. C'est le cas de *Echinobothrium euterpes*, une espèce appartenant à l'ordre des Diphyllidea. Les données jusque-là disponibles, sur l'ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde des espèces de cet ordre sont très confuses, spécialement celles faisant référence au nombre d'axonemes dans le spermatozoïde mûr. De plus, l'étude de ce Diphyllidea, initialement décrit comme *Macrobothridium euterpes* (Neifar *et al.*, 2001), puis transféré au genre *Echinobothrium* par Tyler (2006), pourrait mettre en évidence des similitudes ultrastructurales avec ce dernier genre et ainsi, confirmer son correct emplacement dans le nouveau genre.

Acanthobothrium crassicolle, un Tetrephyllidea-Onchobothriidae, est la cinquième espèce de la famille et la troisième du genre à être étudiée. Cependant, l'étude que nous nous proposons de faire, fera partie des plus récentes et des plus complètes. Son aboutissement devrait permettre de confirmer le modèle spermiogénétique et l'organisation ultrastructurale, proposés pour les Tetrephyllidea-Onchobothriidae et de les comparer avec ceux observés chez les Tetrephyllidea-Phyllobothriidae.

Le cas du Trypanorhyncha choisi est aussi très intéressant car l'espèce *Aporhynchus menezesi* appartient à la super-famille Gymnorhynchoidea. De nombreux auteurs ont eu à proposer la possible paraphylie de l'ordre des Trypanorhyncha, en se basant sur des critères morphologiques et moléculaires (Olson *et al.*, 2001 ; Palm, 2004 ; Palm *et al.*, 2009). Cependant, des études ultrastructurales complètes existent seulement pour des espèces incluses dans l'un des clades, formé par les Tentacularioidea et les Eutetrarhynchoidea. Notre travail deviendra ainsi la première étude complète sur une espèce appartenant au clade formé par les Gymnorhynchoidea, les Lacistorhynchoidea et les Otophthorioidea.

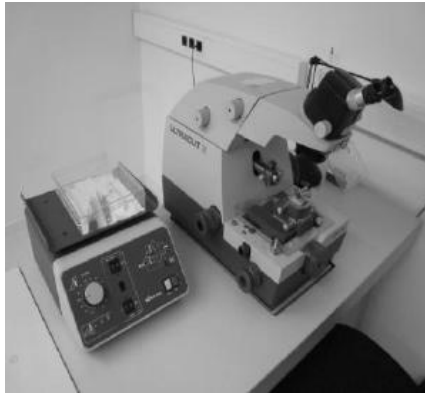
En ce qui concerne le Bothriocephalidea *Clestobothrium crassiceps*, l'importance de son étude réside dans le fait que récemment les « Pseudophyllidea » ont subi un réaménagement important : l'ancien ordre des « Pseudophyllidea » est actuellement scindé en deux ordres, les Bothriocephallidea et les Diphyllbothriidea, sur la base d'études moléculaires (Kuchta *et al.*, 2008a). De plus, *Clestobothrium crassiceps* fut précédemment décrite sous le nom de *Bothriocephalus crassiceps*. Ainsi, notre étude nous permettra de voir s'il existe des différences dans la spermiogenèse et le spermatozoïde chez les deux genres. Cette étude ultrastructurale du gamète mâle sera donc la première faite chez une espèce de ce genre et nous permettra, non seulement d'augmenter la base de données disponibles, mais aussi de confirmer le modèle spermatologique générale pour l'ordre des Bothriocephalidea, tout en mettant en exergue les différences avec les Diphyllbothriidea.

Pour le Proteocephalidea *Barsonella lafoni*, le choix de notre étude est similaire car cet ordre renferme un nombre important de descriptions ultrastructurales de la spermiogenèse et du spermatozoïde d'espèces appartenant à des genres différents. Notre travail apportera ainsi de nouvelles données sur un genre jamais étudié auparavant, permettra d'analyser le modèle spermatologique proposé pour cet ordre et finalement, de déceler les particularités au niveau sous-ordinal.

En dernier lieu, *Molluscotaenia crassiscolex* est une espèce incluse dans la famille Dilepididae de l'ordre Cyclophyllidea. Cet ordre est, parmi les Eucestoda, celui qui compte le plus grand nombre de travaux ultrastructuraux de la spermiogenèse et du spermatozoïde. Cependant, les modèles spermiogénétiques et ceux du spermatozoïde rencontrés dans cet ordre sont très variés. *Molluscotaenia crassiscolex* sera la quatrième espèce de la famille et la première du genre à bénéficier d'une étude ultrastructurale complète et notre description permettra de corroborer le schéma spermatologique assigné à cette famille.

Ainsi, les objectifs concrets et résumés de notre Mémoire sont les suivants :

1. Renforcer l'état de connaissance relatif aux études ultrastructurales de la spermiogenèse et du spermatozoïde chez les cestodes.
2. Étudier diverses espèces de cestodes appartenant à des ordres distincts afin d'évaluer les divers modèles spermiogénétiques proposés chez les cestodes, mais aussi, de résoudre certains doutes et incongruences actuels concernant l'ultrastructure de la spermiogenèse et du spermatozoïde.
3. Analyser l'intérêt taxonomique et phylogénétique de divers caractères ultrastructuraux de la spermiogenèse et du spermatozoïde.



CHAPITRE II : *MATERIEL ET* *METHODES*

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Dans ce chapitre, nous présentons les aspects morpho-anatomiques et bio-écologiques du matériel objet de notre étude et la méthodologie suivie pour l'étude en microscopie électronique à transmission.

En outre, toute la méthodologie utilisée pour l'étude morpho-anatomique des cestodes sera omise. Pour les détails concernant cette méthodologie, comportant l'extraction des cestodes de leurs hôtes respectifs, leur fixation, jusqu'à leur observation au microscope optique en passant par la coloration et le montage entre lame et lamelle, voir les œuvres de Lageron (1949) et Casanova (1993).

A la fin du montage, les cestodes sont identifiés en s'appuyant sur la bibliographie déjà existante (Schmidt, 1986 ; Khalil *et al.*, 1994 ; Neifar *et al.*, 2001 ; Palm, 2004 ; Tyler, 2006 ; Kuchta *et al.*, 2008b ; de Chambrier *et al.*, 2009 ; Noever *et al.*, 2010).

II.1. Caractères morpho-anatomiques et bio-écologiques des espèces étudiées

Nous avons travaillé sur six espèces de cestodes appartenant à six genres et six ordres différents (Tableau II).

Pour chacune d'elles, nous avons précisé l'hôte ainsi que le site de capture, la localisation dans l'hôte, la position systématique, les caractères morpho-anatomiques, le cycle biologique et la répartition géographique.

Cestodes étudiés	Position systématique (Ordre, Famille)	Hôtes (Ordre, Famille)	Localités de capture des hôtes
<i>Acanthobothrium crassicolle</i>	Tetraphyllidea, Onchobothriidae	<i>Dasyatis pastinaca</i> (Rajiformes, Dasyatidae)	Sidi Mansour (Tunisie) Mer Méditerranée
<i>Aporhynchus menezesi</i>	Trypanorhyncha, Aporhynchidae	<i>Etmopterus spinax</i> (Elasmobranchii, Etmopteridae)	Île de Faial (Açores) Océan Atlantique
<i>Barsonella lafoni</i>	Proteocephalidea, Proteocephalidae	<i>Clarias gariepinus</i> (Siluriformes, Clariidae)	Lac Tana (Ethiopie)
<i>Clestobothrium crassiceps</i>	Bothriocephalidea, Bothriocephalidae	<i>Merluccius merluccius</i> (Gadiformes, Merlucciidae)	Roses (Espagne) Mer Méditerranée
<i>Echinobothrium euterpes</i>	Diphyllidea, Echinobothriidae	<i>Rhinobatos rhinobatos</i> (Rajiformes, Rhinobatidae)	Zarzis (Tunisie) Mer Méditerranée
<i>Molluscotaenia crassiscolex</i>	Cyclophyllidea, Dilepididae	<i>Sorex araneus</i> (Soricomorpha, Soricidae)	Réserve Naturelle de Py (Pyrénées françaises)

Tableau II : Position systématique des cestodes étudiés et localités de capture de leurs hôtes

II.1.1. *Acanthobothrium crassicolle* Weld, 1855

a. **Hôte** : la raie pastenague ou pastenague commune, *Dasyatis pastinaca* (Linnaeus, 1758) (Rajiformes, Dasyatidae) (Fig. 5)



Fig. 5. *Dasyatis pastinaca*

b. **Localité de capture de l'hôte** : côte de Sidi Mansour (Tunisie)

c. **Localisation dans l'hôte** : valvule spirale

d. **Systematique**

- Embranchement : Plathelminthes
- Super-classe : Cercomeromorphae Bychowsky, 1937
- Classe : Cestoda Rudolphi, 1808
- Sous-classe : Eucestoda Southwell, 1930
- Ordre : Tetracyllidea Carus, 1863
- Famille : Onchobothriidae Braun, 1900
- Genre : *Acanthobothrium* van Beneden, 1849
- *Acanthobothrium crassicolle* Wedl, 1855

L'ordre des tétraphyllidés renferme des parasites qui vivent essentiellement dans la valvule spirale d'élasmobranches et d'holocéphales (requins et raies). Le nombre total d'espèces reste inconnu. Cependant, d'après le site *Planetary Biodiversity Inventory*, l'ordre compterait 64 genres et environ 400 espèces. De plus, le nombre exact de familles que renferme l'ordre est aussi un sujet de discussion. Euzet (1994) reconnut huit familles de Tetrphyllidea (Cathetocephalidae, Litobothriidae, Disculicipitidae, Prosobothriidae, Dioecotaeniidae, Onchobothriidae, Phyllobothriidae et Chimaerocestidae). Exception faite des Onchobothriidae et des Phyllobothriidae, toutes les autres familles sont monogénériques. Cependant, une analyse phylogénétique effectuée par Caira *et al.* (1999), a révélé que l'ordre des Tetrphyllidea n'est pas monophylétique et que la validité des Prosobothriidae, Dioecotaeniidae et Chimaerocestidae restait à confirmer.

e. Morpho-anatomie

Acanthobothrium crassicolle appartient à la famille des Onchobothriidae. Elle peut mesurer jusqu'à 8 cm de long ; mais en général les adultes mesurent entre 15 et 60 mm de long. Le scolex présente 4 bothridies sessiles, triloculées, armées chacune d'une paire de crochets (Fig. 6A). Chaque crochet est constitué d'un manche, d'une pointe latérale en forme de « L » (de 25 à 60 μm de long) et d'une pointe axiale (de 95 à 120 μm de long) (Fig. 6B). Les manches des crochets sont recouverts par un plateau musculaire qui porte une ventouse accessoire antérieure, discoïde, de 120 à 180 μm de diamètre. Le scolex est suivi d'un pédoncule céphalique, d'environ 1600 à 4000 μm de long, puis d'un cou de 100 à 400 μm de long et d'un strobile. Ce dernier est formé d'une succession d'anneaux appelés proglottis, généralement acraspédotes et apolitiques, avec une musculature longitudinale particulièrement abondante au niveau du pédoncule céphalique. Le cou est court. Le strobile contient environ 300 proglottis. Les proglottis antérieurs et moyens sont plus larges que longs tandis que les proglottis postérieurs sont plus longs que larges. Chaque proglottis mûr contient environ 135 testicules répartis en trois champs, antiporal, pré-vaginal et post-vaginal. Le canal déférent, pelotonné dans la partie médiane du proglottis, se termine au niveau de la poche du cirre. Le cirre est armé. Les orifices génitaux sont latéraux et irrégulièrement alternés (Fig. 6C). L'ovaire

est postérieur et apparaît tétralobulé en section transversale. Le vagin est musculéux et antérieur à la poche du cirre. Les glandes vitellogènes sont sous la forme de nombreux follicules, organisés en bandes longitudinales vers les bords des proglottis. L'utérus, en position médiane, s'étend jusqu'au tiers des proglottis (Fig. 6C). Dans les proglottis gravides, l'utérus est sacciforme et contient de nombreux œufs sphériques, d'environ 90 à 100 μm de diamètre.

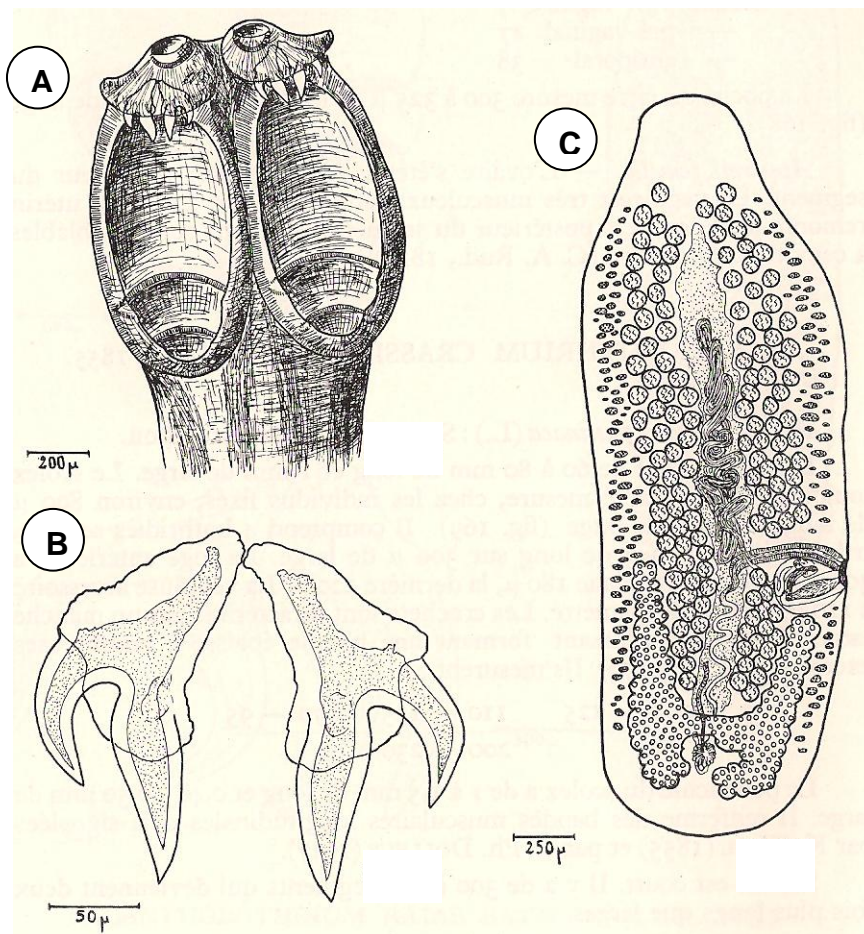


Fig. 6. Morphologie de *Acanthobothrium crassicolle* Wedl, 1855.
A : Scolex. B : Crochets. C : Proglottis mûr (d'après Euzet, 1959).

f. Cycle biologique

En général, les tétraphyllidés entretiennent une spécificité oioxène ou sténoxène avec leur hôte. Cependant, il est fréquent de rencontrer plusieurs espèces de Tetraphyllidea chez un même hôte (Campbell & Beveridge, 2002 ; Caira *et al.*, 2007).

Ce sont des parasites hétéroxènes et leur cycle renferme au moins un hôte intermédiaire qui peut être un poisson téléostéen, un mollusque, un crustacé ou un mammifère marin.

Le cycle biologique complet des tétraphyllidés n'est pas bien connu. Selon Euzet (1959), le stade larvaire inclut l'embryon hexacante, la forme procercoïde qui se rencontre chez le premier hôte intermédiaire (copépoïde) et la forme plérocercocœide qui se rencontre chez le second hôte intermédiaire (crustacé, téléostéen ou céphalopode) et chez un troisième hôte (paraténique) s'il y a lieu (téléostéen ou céphalopode) (Fig. 7).

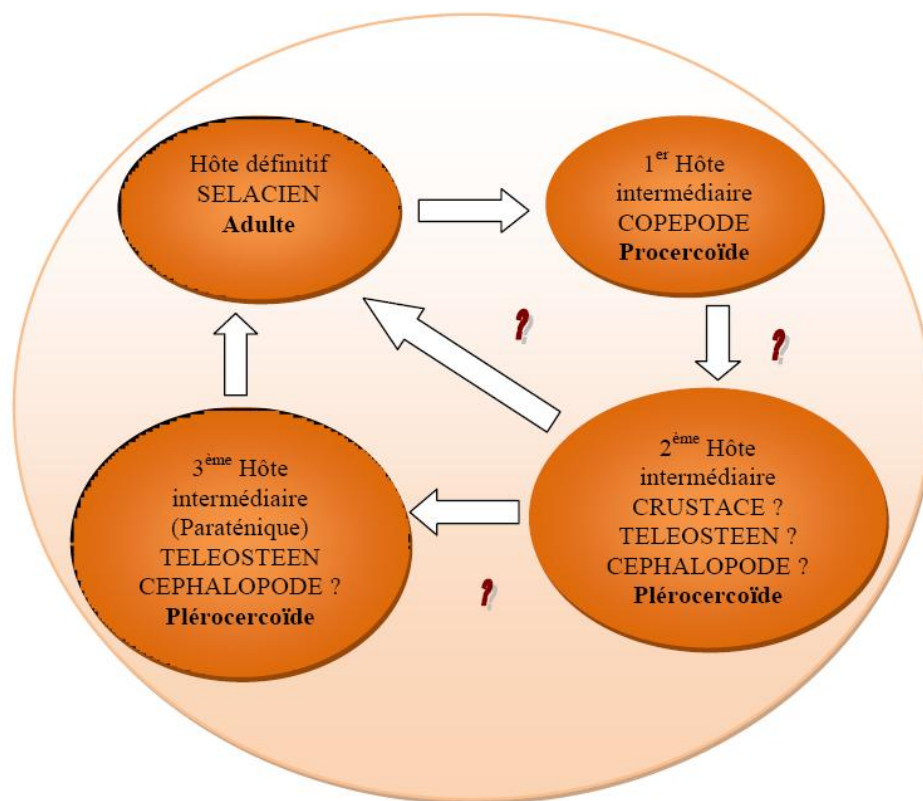


Fig. 7. Cycle biologique de *Acanthobothrium crassicolle* (d'après Euzet, 1959)

g. Biogéographie

Les tétraphyllidés sont des parasites cosmopolites, mais souvent localisés dans les eaux subtropicales et tropicales. Du fait qu'ils sont hautement spécifiques, avec un niveau de prévalence élevé, il serait logique de corréler leur distribution à celle de leur hôte, *Dasyatis pastinaca* (Fig. 8).

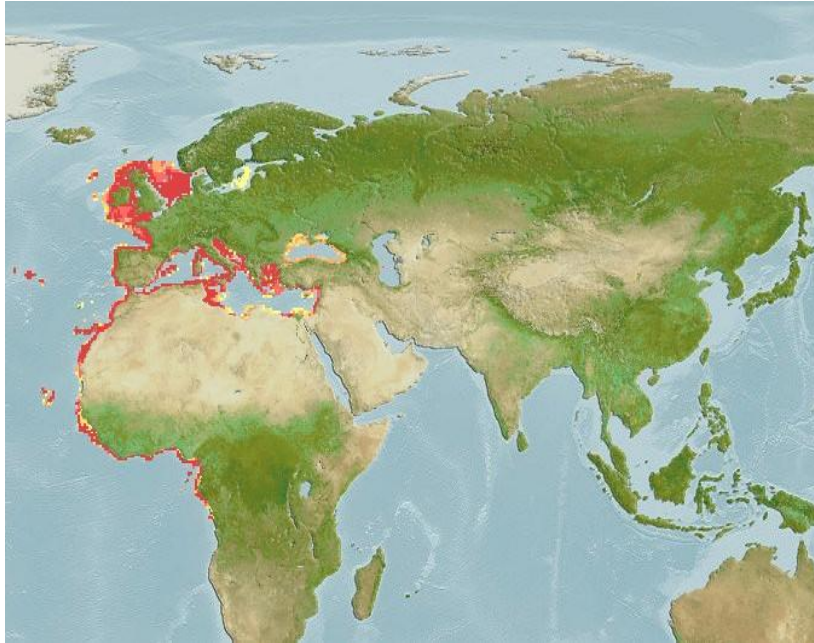


Fig. 8. Distribution géographique de *Dasyatis pastinaca* (d'après Bauchot, 1987).

II.1.2. *Aporhynchus menezesi* Noever *et al.*, 2010

a. **Hôte** : le sagre commun, *Etmopterus spinax* (Linnaeus, 1758) (Elasmobranchii, Etmopteridae) (Fig. 9)



Fig. 9. *Etmopterus spinax*

b. **Localité de capture de l'hôte** : île de Faial (38°31'N, 28°37'W) (Archipel des Açores, Portugal)

c. **Localisation dans l'hôte** : valvule spirale

d. **Systematique**

- Embranchement : Plathelminthes
- Super-classe : Cercomeromorphae Bychowsky, 1937
- Classe : Cestoda Rudolphi, 1808
- Sous-classe : Eucestoda Southwell, 1930
- Ordre : Trypanorhyncha Diesing 1863
- Famille : Aporhynchidae Poche, 1926
- Genre : *Aporhynchus* Nybelin, 1918
- *Aporhynchus menezesi* Noever *et al.*, 2010

L'ordre Trypanorhyncha Diesing, 1863 est répandu dans le monde entier. Les espèces de l'ordre occupent un pourcentage relevant parmi les parasites d'organismes marins. Ils infestent l'estomac et l'intestin de leurs hôtes définitifs qui sont des élaémobranches. Leur abondance dans la musculature des poissons hôtes intermédiaires, plus particulièrement ceux d'intérêt économique, rend l'étude de ce groupe important pour le secteur de la pêche.

L'ordre des trypanorhynques fait partie de ceux qui posent le plus de problèmes de systématique (Wardle & McLeod, 1952). En effet, selon Palm (2004) ce groupe n'est pas très bien connu et les descriptions faites sont souvent incomplètes. Les descriptions originales, le plus souvent, manquent d'illustrations détaillées de l'armature tentaculaire, nécessaire à l'identification des espèces. Ainsi d'après la dernière révision de Palm (2004) l'ordre comporterait 5 super-familles, 15 familles, 66 genres et 254 espèces. Depuis Palm (2004), 5 nouveaux genres et 21 nouvelles espèces furent décrits (Beveridge & Campbell, 2005 ; Friggens & Duszynski, 2005 ; Beveridge & Justine, 2006 ; 2007a,b ; 2010 ; Campbell & Beveridge, 2006, 2007a,b ; Beveridge, 2008 ; Palm, 2010 ; Caira *et al.*, 2010 ; Noever *et al.*, 2010 ; Beveridge *et al.*, 2010). Ainsi, l'ordre compterait actuellement 71 genres et 275 espèces considérés comme valides.

e. Morpho-anatomie

Le corps d'un trypanorhynque adulte comprend un scolex (Fig. 10A), suivi d'une zone de croissance et d'un strobile (Fig. 10B,C). Chez la plupart des cestodes, l'anatomie du proglottis mûr permet d'identifier l'espèce. Cependant chez les trypanorhynques, les caractères du scolex, seuls, peuvent permettre d'identifier les espèces.

Le scolex des trypanorhynques présente quatre tentacules garnis de crochets, arrangés de façon assez complexe.

Aporhynchus menezesi a été récemment décrite par Noever *et al.* (2010). Elle appartient à la famille des Aporhynchidae qui ne contient que le genre *Aporhynchus*. Les vers entiers mesurent entre 23 à 51 mm de long et 1,75 à 3 mm de large. Leur scolex présente quatre bothridies pédonculées, de forme ovale. Les proglottis dont le nombre

varie entre 26 et 42 sont acraspédotes. Le nombre de proglottis immatures varie entre 17 et 27, celui des proglottis mûrs entre 1 et 3 et celui des proglottis gravides entre 5 et 21 (Noever *et al.*, 2010). Les proglottis mûrs sont plus longs que larges (Fig. 10D). Leurs pores génitaux sont marginaux et irrégulièrement alternés. La poche du cirre, légèrement développée, a une forme ovale. Le cirre est papilliforme et non armé. La vésicule séminale est tripartite et présente une partie interne large et une partie externe oblongue (Fig. 10E,F) ; tandis que la partie accessoire est large et de position ventrale par rapport à la vésicule séminale externe et au vagin (Fig. 10E).

Le canal déférent est enroulé et en position parallèle au vagin. Les testicules, au nombre de 154 à 203, sont ovales et forment deux rangées latérales (Fig. 10D). Le vagin est légèrement sinueux et en position dorsale. Il s'étend de l'ootype à la poche du cirre. Le réceptacle séminale est présent. L'ovaire est bilobé et légèrement lobulé. La glande de Mehlis est postérieure à l'isthme ovarien. Les follicules vitellins sont ovales et s'étendent tout au long des proglottis (Fig. 10D). L'utérus est ventral, sacciforme et s'étend antérieurement vers le pore génital. Il débouche à l'extérieur par un pore situé près de la marge antérieure des proglottis mûrs et gravides. Ces derniers sont anapolytiques. Les cocons sont fusiformes.

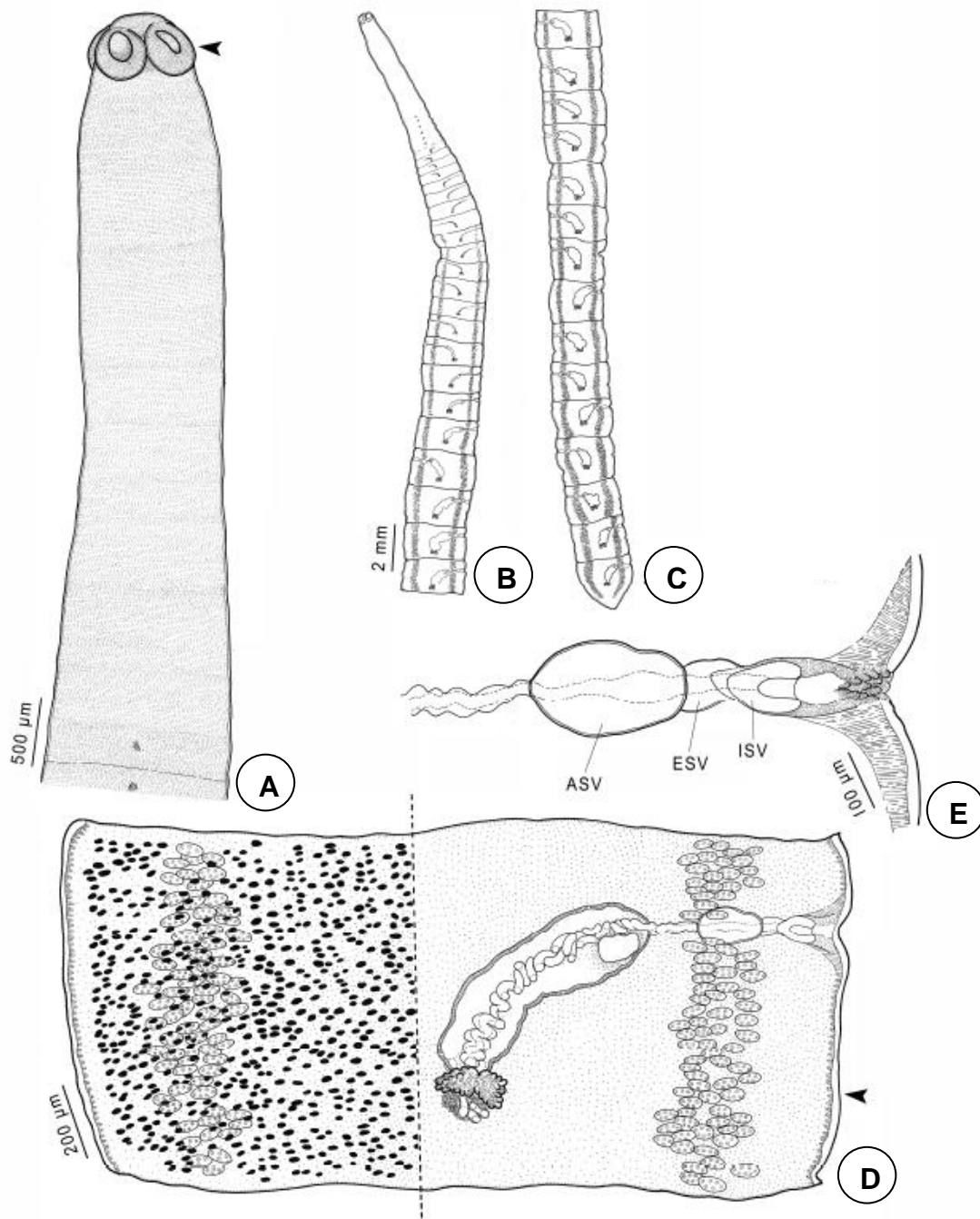


Fig. 10. Morphologie de *Aporhynchus menezesi* Noever *et al.*, 2010.
 A : Scolex. B : Vers entier, partie antérieure. C : Vers entier, partie postérieure. D : Organisation d'un proglottis mûr. E : Détail de la partie terminale de l'appareil génital mâle (ASV : vésicule séminale accessoire ; ESV : vésicule séminale externe ; ISV : vésicule séminale interne)
 (d'après Noever *et al.*, 2010)

f. Cycle biologique

Les trypanorhynques ont un cycle indirect, très complexe. Ils peuvent être rencontrés dans tous les niveaux trophiques marins. Leur avantage par rapport aux autres parasites hétéroxènes est que, chez les trypanorhynques la phase larvaire présente plusieurs caractères morphologiques communs avec le stade adulte ce qui facilite son identification.

Le cycle biologique de *Aporhynchus menezesi* n'est pas encore connu dû à la récente description de cette espèce (Noever *et al.*, 2010). Cependant, selon Palm (2004) le cycle biologique d'une autre espèce appartenant au même genre (*Aporhynchus norvegicus*) comprendrait : (a) une larve hexacanthé, souvent enveloppée par une membrane ciliaire, qui donnerait un coracidium qui peut être libre ou non, (b) une larve procercoïde, (c) une larve plérocercioïde et (d) une forme adulte.

Le cycle de développement général des trypanorhynques est hétéroxène et comporte des invertébrés et des vertébrés marins. Il se déroulerait comme suit :

Selon les espèces, les proglottis gravides se détachent ou non du strobile. Dans les deux cas, les œufs, contenus dans l'utérus, continuent leur développement dans l'intestin de l'hôte et sont libérés avec les fèces dans le milieu extérieur. Les œufs operculés contiennent une larve hexacanthé, entourée d'une membrane ciliaire, appelée coracidium. Après l'éclosion des œufs, les coracidium se libèrent et nagent continuellement durant quelques jours grâce à leurs cils. Une fois ingérés par un copépode (premier hôte intermédiaire connu), ils se transforment en larves procercoïdes dans l'hémocœle du copépode. Chez les procercoïdes, le développement cesse après 5 à 7 jours avec la formation d'une larve cylindrique indifférenciée qui porte un cercomère terminal, une structure dérivant de l'hexacanthé et qui renferme 6 crochets larvaires. Quand le copépode est consommé par un autre invertébré (euphauside) ou un petit poisson, le procercoïde se transforme en plérocercioïde, forme infestante. Ce deuxième hôte peut soit être ingéré, directement par un hôte définitif (élasmobranche) ou passer par un hôte intermédiaire additionnel ou hôte paraténique qui est, le plus souvent, un grand poisson qui puisse assurer le transfert. Dans le premier cas, le plérocercioïde se

transformera en adulte et dans le second cas, il restera sous la forme de plérocercioïde (Fig. 11).

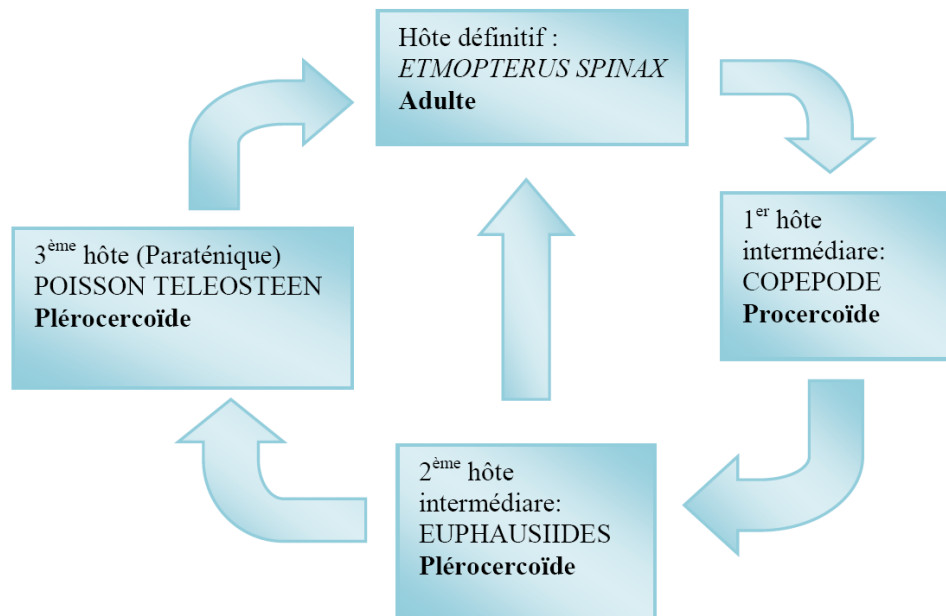


Fig. 11. Cycle évolutif de *Aporhynchus menezesi*, modifié du cycle de *Aporhynchus norvegicus* selon Palm (2004)

g. Biogéographie

Aporhynchus menezesi est une espèce nouvellement décrite par Noever *et al.* (2010) en Horta et Lisbonne, au Portugal (Fig. 12).

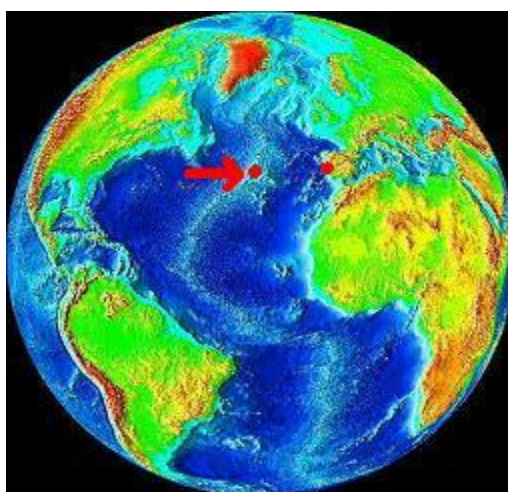


Fig. 12. Horta et Lisbonne, localités portugaises où a été récoltée *Aporhynchus menezesi* (extrait de la page de Sophie Querouil : http://www.horta.uac.pt/pp1/sophie_querouil/)

II.1.3. *Barsonella lafoni* de Chambrier *et al.*, 2009

a. **Hôte** : le poisson chat, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Siluriformes, Clariidae)
(Fig. 13)



Fig. 13. *Clarias gariepinus*

b. **Localité de capture de l'hôte** : Lac Tana (11°36'N, 37°25'E), Bahir Dar, Ethiopie

c. **Localisation dans l'hôte** : portion antérieure de l'intestin

d. **Systématique**

- Embranchement : Plathelminthes
- Super-classe : Cercomeromorphae Bychowsky, 1937
- Classe : Cestoda Rudolphi, 1808
- Sous-classe : Eucestoda Southwell, 1930
- Ordre : Proteocephalidea Mola, 1928
- Famille : Proteocephalidae La Rue, 1911
- Sous-famille : Proteocephalinae Mola, 1929
- Genre : *Barsonella* de Chambrier *et al.*, 2009
- *Barsonella lafoni* de Chambrier *et al.*, 2009

Les espèces de l'ordre des Proteocephalidea Mola, 1928 sont largement distribuées dans les régions néotropicales et parasitent fréquemment les poissons siluriformes (de Chambrier & Vaucher, 1999 ; Rego *et al.*, 1999 ; de Chambrier *et al.*, 2006a,b,c). Ces espèces sont classées en deux familles, mais ce schéma bien qu'accepté par la plupart des auteurs (Rego, 1994 ; Scholz & de Chambrier, 2003 ; de Chambrier *et al.*, 2004, 2009 ; Arredondo & Gil de Pertierra, 2010) reste cependant très controversé. Ces deux familles seraient divisées en 12 sous-familles, 46 genres et environ 400 espèces (Rego, 1998 ; Hypša *et al.*, 2005). Depuis 2005, quatre nouveaux genres et seize nouvelles espèces ont été décrites (de Chambrier *et al.*, 2005, 2006a,b,c, 2008, 2009, 2010 ; Cheng *et al.*, 2007 ; Chandra & Gupta, 2007 ; Ammann & de Chambrier, 2008 ; Bursey *et al.*, 2006, 2008 ; Coquille & de Chambrier, 2008 ; Marsella & de Chambrier, 2008 ; Gil de Pertierra, 2009 ; Arredondo & Gil de Pertierra, 2010).

Le genre *Barsonella* a été récemment créé par de Chambrier *et al.* (2009). Il renferme des espèces parasites des poissons chats, *Clarias gariepinus* (hôte type) et *C. anguillaris* (Siluriformes, Clariidae).

e. Morpho-anatomie

Barsonella lafoni est un vers long avec un cou massif. Le strobile est acraspédote, avec au total, entre 99 et 190 proglottis dont 67 à 120 immatures, 7 à 11 mârs et 25 à 89 prégravides et gravides. Le scolex est grand, subsphérique et dépourvu de métascolex. Les ventouses sont profondément enfoncées et pourvues d'une petite fente additionnelle (ou orifice transversal), située à côté de l'ouverture de la ventouse. La partie antérieure de la ventouse est garnie d'une musculature circulaire servant de sphincter (Fig. 14A). Les testicules, au nombre de 160 à 189, forment une ou deux rangées. La poche du cirre est pyriforme et présente une paroi fine. Le canal déférent est fortement enroulé (Fig. 14B-D). Les pores génitaux alternent irrégulièrement et ont une position pré-équatoriale. L'atrium génital est de petite taille. L'ovaire est bilobé. Le vagin, antérieur ou postérieur à la poche du cirre, est doté d'un sphincter vaginal, de petite taille, situé près de l'atrium génital (Fig. 14C). Les follicules vitellins forment deux rangées latérales, légèrement plus développées, au niveau de l'ovaire (Fig. 14B,D). Les œufs sont sphériques et présentent une membrane hyaline, l'embryophore. Celle-ci, entoure

l'oncosphère de forme sphérique ou ovale avec trois paires de crochets embryonnaires (Fig. 14E).

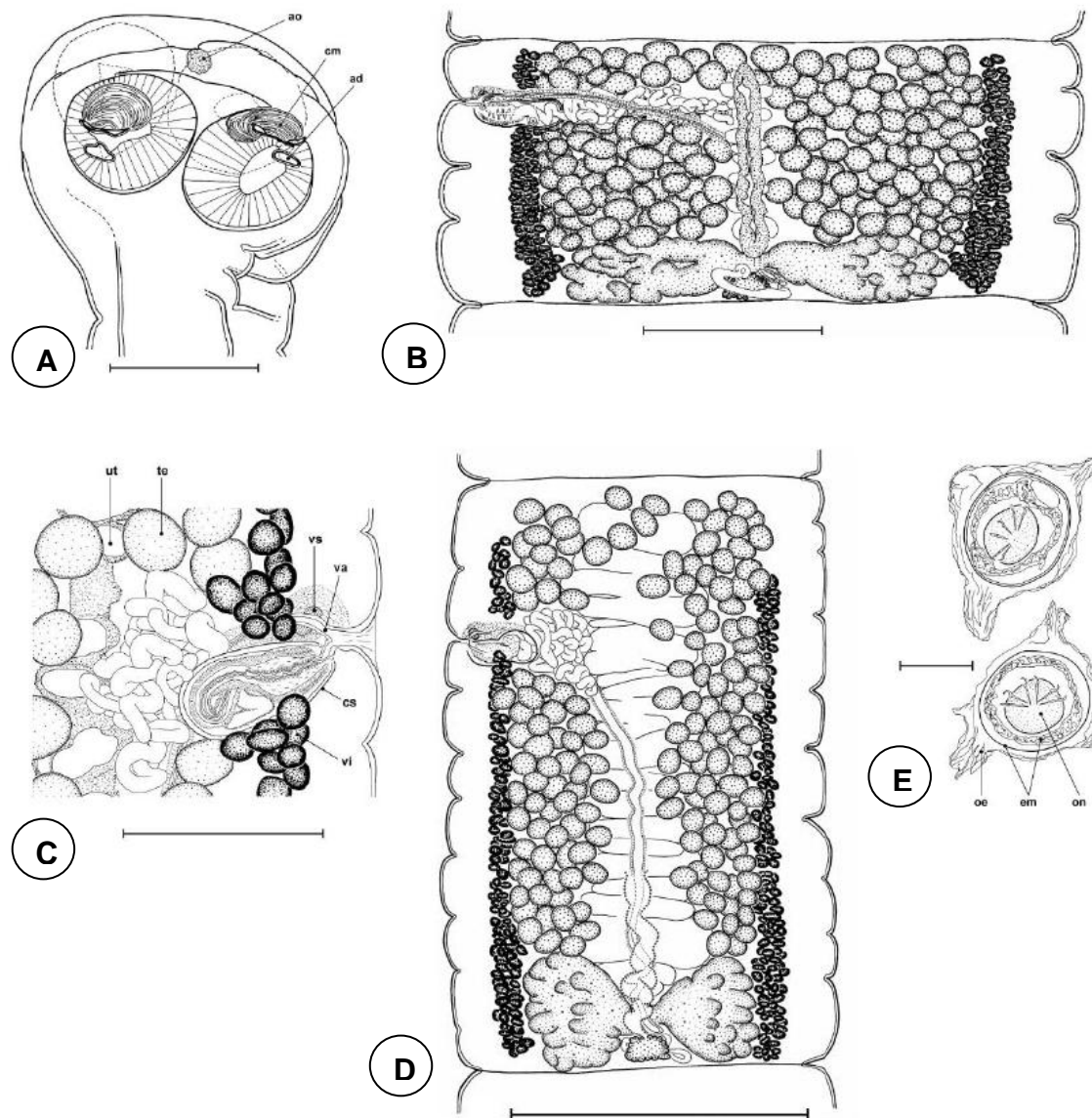


Fig. 14. Morpho-anatomie de *Barsonella lafoni* de Chambrier *et al.*, 2009.

A : Vue dorso-ventrale du scolex. B : Holotype. Vue ventrale d'un proglottis mûr.
 C : Vue dorsale de la partie terminale de l'appareil génital mâle. D : Holotype. Vue dorsale d'un proglottis gravide. E : Œuf enveloppé dans sa membrane hyaline.
 ad : ouverture additionnelle ; ao : organe apical ; cm : musculature circulaire ; cs : poche du cirre ; em : embryophore ; oe : enveloppe externe ; on : onchosphère ; ut : utérus ;
 te : testicules ; va : vagin ; vi : follicules vitellins ; vs : sphincter vaginal
 (d'après de Chambrier *et al.*, 2009).

f. Cycle biologique

Barsonella lafoni a été récoltée chez deux espèces de poisson chat (Siluriformes : Clariidae) du genre *Clarias*, *C. gariepinus* et *C. anguillaris*. Dû à sa récente description, son cycle de développement est encore inconnu.

Cependant, selon Falavigna *et al.* (2003) le développement ontogénique des Proteocephalidea débute par la dissémination des œufs dans l'eau. Quand ceux-ci sont ingérés par un hôte intermédiaire, généralement un copépode aquatique, l'oncosphère se libère et pénètre dans la paroi du tube digestif de l'hôte où elle se transforme en plérocercœide, puis en mérocercœide (Chervy, 2002). Lorsque le copépode est ingéré par un poisson, la larve peut s'encapsuler ou non, ou peut se transformer en adulte si elle pénètre dans la cavité intestinale de ce dernier.

g. Biogéographie

Barsonella lafoni a été récoltée chez *Clarias gariepinus* et *C. anguillaris* dans de nombreuses localités africaines (de Chambrier *et al.*, 2009), à savoir, l'Ethiopie (lacs Langano et Zeway), le Soudan (Khartoum et barrage de Nubia), la Tanzanie (lac Victoria) et le Zimbabwe (lac Chirero).

II.1.4. *Cleistobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819)

a. **Hôte** : le merlu commun, *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758) (Gadiformes, Merlucciidae) (Fig. 15)



Fig. 15. *Merluccius merluccius*

b. **Localité de capture de l'hôte** : côte de Roses (Gironne, Espagne)

c. **Localisation dans l'hôte** : intestin

d. **Systématique**

- Embranchement : Plathelminthes
- Super-classe : Cercomeromorphae Bychowsky, 1937
- Classe : Cestoda Rudolphi, 1808
- Sous-classe : Eucestoda Southwell, 1930
- Ordre : Bothriocephalidea Kuchta *et al.*, 2008
- Famille : Bothriocephalidae Blanchard, 1849
- Genre : *Cleistobothrium* Lühe, 1899
- *Cleistobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819)

Les bothriocéphalidés sont parasites de vertébrés poïkilothermes, spécialement de poisson téléostéens (Kuchta & Scholz, 2007 ; Kuchta *et al.*, 2008a). Cet ordre érigé par Kuchta *et al.* (2008a), a été proposé pour classer une partie des Plathelminthes qui appartenaient initialement à l'ordre des « Pseudophyllidea ». Ainsi l'ancien ordre « Pseudophyllidea » fut dissout et deux nouveaux ordres, Bothriocephalidea et Diphylobothriidea, furent érigés. Ces deux nouveaux ordres seraient différents aussi bien du point de vue moléculaire, morphologique, qu'écologique (Brabec *et al.*, 2006 ; Kuchta, 2007 ; Kuchta & Scholz, 2007 ; Waeschenbach *et al.*, 2007 ; Kuchta *et al.*, 2008a,b). L'ordre des Bothriocephalidea comporte 4 familles (Bothriocephalidae, Echinophallidae, Philobythiidae and Triaenophoridae) et 46 genres (Kuchta *et al.*, 2008b) répartis comme suit : 14 Bothriocephalidae, 8 Echinophallidae, 2 Philobythiidae et 22 Triaenophoridae.

Clestobothrium crassiceps est l'espèce type du genre et appartient à la famille des Bothriocephalidae. Le genre *Clestobothrium* a été traditionnellement caractérisé, entre autres aspects, par la présence d'un scolex ovale ou sphérique dépourvu de disque apical et doté de deux bothries profondes (Kuchta *et al.*, 2008b). Cependant, nos observations par microscopie électronique à balayage montrent la présence de ce disque apical. En outre, la description récente de deux nouvelles espèces du genre *Clestobothrium* (*C. cristinae* et *C. splendidum*) montre aussi la présence de cette structure apicale (Gil de Perterra *et al.*, 2011).

e. Morpho-anatomie

Les « Pseudophyllidea » sont caractérisés par la présence de deux bothries (Schmidt, 1986 ; Khalil *et al.*, 1994). La bothrie est un organe d'attachement formé par des sillons (ou dépressions) longitudinaux de différentes formes et profondeurs, situés sur les faces dorsale et ventrale du scolex (Figs. 16A, 17A).

Chez *Clestobothrium crassiceps*, le strobile est craspédote avec des proglottis plus larges que longs (Figs. 16D, 17B). Le scolex, de forme ovale à sphérique, est globuleux. Il présente des bothries profondes et un disque apical (Fig. 16A,B). Le cou est absent. Les testicules sont médullaires et disposés en deux rangées latérales, continues entre les

proglottis. La poche du cirre est petite, ovale et contient une vésicule séminale interne. Le cirre est inerme. Le pore génital est médian. L'ovaire est allongé, transversal et bilobé. Le vagin est postérieur à la poche du cirre. Les follicules vitellins sont corticaux et continus autour des marges latérales du proglottis (Fig. 17B). L'utérus est ovale. Le conduit utérin est sinueux ou élargi au niveau des proglottis gravides et le pore utérin est légèrement sub-médian (Figs. 16D, 17B). Au moment de la ponte, les œufs ne sont ni embryonnés ni operculés. Ils mesurent 70,14 μm de long et 42,95 μm de diamètre. Ils deviennent operculés, 3 à 4 jours avant l'éclosion qui a lieu entre le 11^e et le 13^e jour après la ponte. Ensuite est libéré le coracidium (larve ciliée arrondie d'environ 46,2 μm de diamètre).

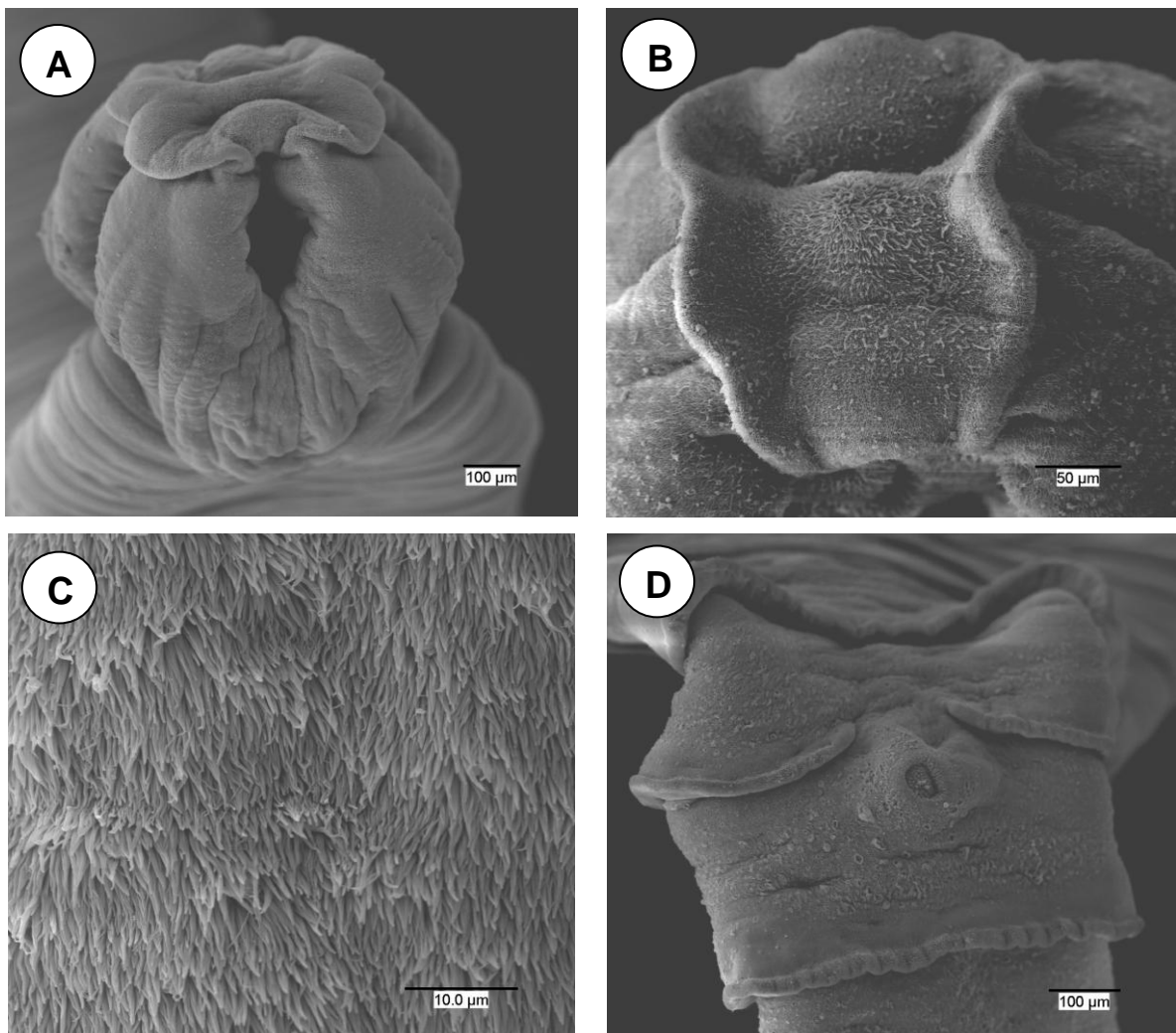


Fig. 16. Microscopie électronique à balayage de *Clestobothrium crassiceps* Rudolphi, 1819.

A : Scolex. B : Détail du disque apical.

C : Détail des microtriches au niveau du scolex. D : Proglottis mûr

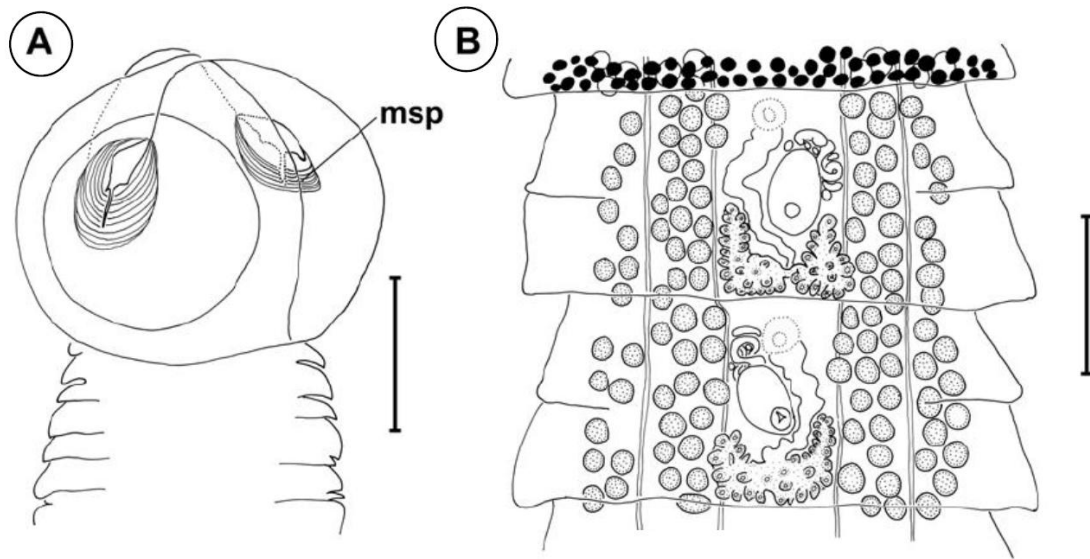


Fig. 17. Morphologie de *Clestobothrium crassiceps* Rudolphi, 1819.

A : Scolex. B : Proglottis mûr.

msp : musculature du sphincter

(d'après Gil de Pertierra *et al.*, 2011).

f. Cycle biologique

Clestobothrium crassiceps a été récoltée chez de nombreuses espèces de poissons téléostéens du genre *Merluccius* (Azzouz Draoui & Maamouri, 1997 ; Gil de Pertierra *et al.*, 2011).

Le cycle biologique est encore inconnu. On sait seulement que les œufs se développent dans l'eau et qu'ils libèrent des coracidiums (larves hexacanthes) (Azzouz Draoui & Maamouri, 1997).

g. Biogéographie

La distribution géographique de *Clestobothrium crassiceps* n'est pas très bien connue. Cependant, la présence de l'espèce a été signalée dans l'Atlantique nord et sud, dans l'Océan Pacifique (Chilie), sur la côte Atlantique de la France, mais aussi sur les côtes méditerranéennes de l'Espagne (Girona) et du golf de Tunis (Tunisie) (Azzouz Draoui & Maamouri, 1997 ; Kuchta *et al.*, 2008b ; Gil de Pertierra *et al.*, 2011).

II.1.5. *Echinobothrium euterpes* (Neifar *et al.*, 2001)

a. **Hôte** : la raie guitare, *Rhinobatos rhinobatos* (Linnaeus, 1758) (Rajiformes, Rhinobatidae) (Fig. 18)



Fig. 18. *Rhinobatos rhinobatos*

b. **Localité de capture de l'hôte** : côte de Zarzis, Tunisie

c. **Localisation dans l'hôte** : valvule spirale

d. **Systematique**

- Embranchement : Plathelminthes
- Super-classe : Cercomeromorphae Bychowsky, 1937
- Classe : Cestoda Rudolphi, 1808
- Sous-classe : Eucestoda Southwell, 1930
- Ordre : Diphyllidea van Beneden dans Carus, 1863
- Famille : Echinobothriidae Perrier, 1897
- Genre : *Echinobothrium* van Beneden, 1849
- *Echinobothrium euterpes* (Neifar *et al.*, 2001)

La phylogénie de l'ordre des Diphyllidea a été très controversée pendant de longues années. Selon l'œuvre de Khalil *et al.* (1994), l'ordre des Diphyllidea compterait trois familles : Echinobothriidae, Ditrachybothridae et Macrobothriidiidae. Cette division taxonomique fût assez stable et était acceptée par la majorité des systématiciens (Hoberg *et al.*, 1997, 1999, 2001 ; Mariaux, 1998 ; Caira *et al.*, 1999 ; Olson *et al.*, 2001). Cependant, Tyler (2006) fit une réorganisation des espèces de l'ordre et proposa dans sa monographie la suppression de la famille Macrobothriidiidae, considérant comme valide les deux autres familles. Ainsi toutes les espèces de Macrobothriidiidae furent transférées dans la famille des Echinobothriidae. Par conséquent, selon Tyler (2006) l'ordre des Diphyllidea renferme deux familles, deux genres et 38 espèces (Tyler, 2006 ; Ivanov & Lipshitz, 2006). Parmi les 38 espèces décrites, 36 appartiennent au genre *Echinobothrium*, dont cinq sont parasites de requins et 31 sont parasites de raies. Depuis la révision de Tyler (2006), six espèces additionnelles ont été décrites (Ivanov & Lipshitz, 2006 ; Li & Wang, 2007 ; Twohig *et al.*, 2008 ; Kuchta & Caira, 2010).

Echinobothrium euterpes, a été précédemment décrite sous le nom de *Macrobothridium euterpes* par Neifar *et al.* (2001). Elle parasite la valvule spirale de la raie guitare, *Rhinobatos rhinobatos*.

e. Morpho-anatomie

Chez les Diphyllidea, le scolex présente deux bothridies (une ventrale et une dorsale), un rostre et un pédoncule céphalique (Caira *et al.*, 1999 ; Faliex *et al.*, 2000 ; Neifar *et al.*, 2001).

Echinobothrium euterpes présente un scolex bipartite dont l'apex est couvert de longs filitrices (Fig. 19A). Les crochets forment deux rangées, de 16 à 20 unités. Leur taille augmente graduellement vers le centre des bothridies. Les testicules (27 à 46) sont disposés en 2 à 3 colonnes, en avant de la poche du cirre. Le canal déférent est antérieur à la poche du cirre piriforme (Fig. 19B). La glande de Mehlis est en position dorsale par rapport à l'ovaire. Le vagin est situé en arrière du pore génital, en position médio-

ventrale. L'utérus est sacciforme et présente une paroi épaisse durant les premiers stades de développement. Le vitellus forme sur les deux bords latéraux des proglottis, une couche continue qui s'interrompt au niveau de l'ovaire en forme de « H » (Fig. 19B). Les œufs sont arrondis et mesurent 24 à 30 mm de diamètre.

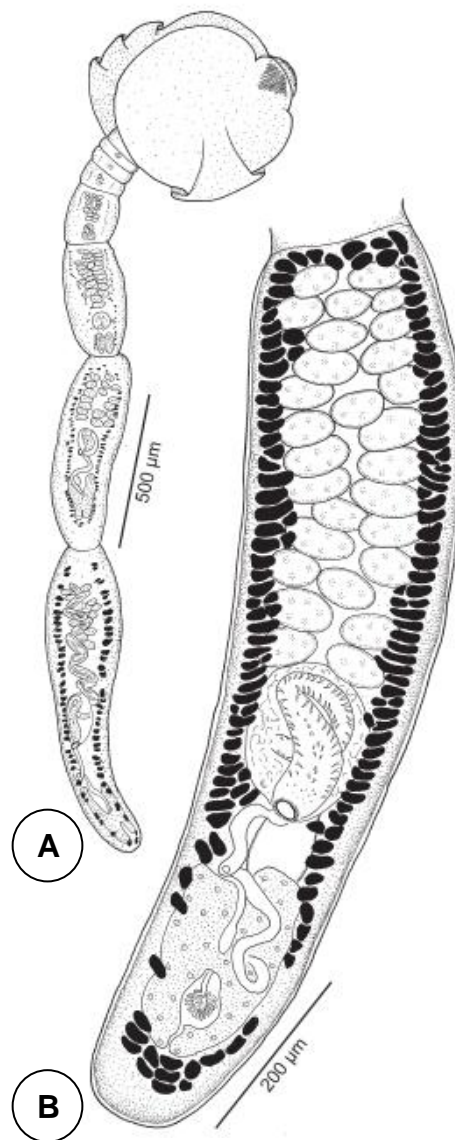


Fig. 19. Morphologie de *Echinobothrium euterpes* (Neifar *et al.*, 2001).
A : Ver entier. B : Proglottis mûr (d'après Neifar *et al.*, 2001)

f. Cycle biologique

Les Diphyllidea sont parasites d'élasmobranches. Leurs larves se développent dans des invertébrés marins. Leur cycle est encore inconnu. On pense qu'il se déroulerait comme suit :

L'œuf embryonné, évacué avec les déjections de l'hôte définitif, puis, ingéré par un amphipode ou un copépode marin, donne naissance à une larve procercoïde. L'amphipode ou le copépode infesté est consommé par un second hôte intermédiaire qui peut être un crabe ou une crevette. Les procercoïdes se transforment alors en larves plérocercoides. Le second hôte intermédiaire est ingéré, soit par un téléostéen (troisième hôte, dans ce cas paraténique), soit directement par un élasmobranch (hôte définitif) (Fig 20).

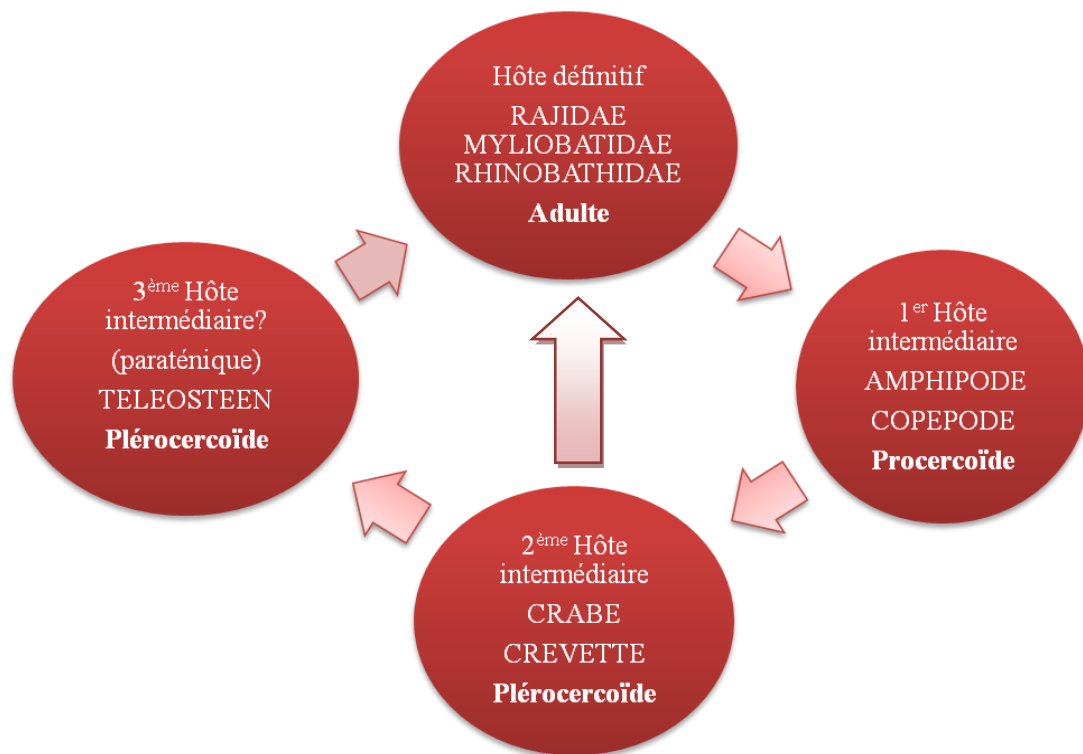


Fig. 20. Cycle hypothétique d'un Diphyllidea (d'après Tyler, 2006)

g. Biogéographie

Echinobothrium euterpes a été signalée uniquement dans deux localités, Zarzis et Sfax, en Tunisie, lors de sa description originale par Neifar *et al.* (2001) (Fig. 21).

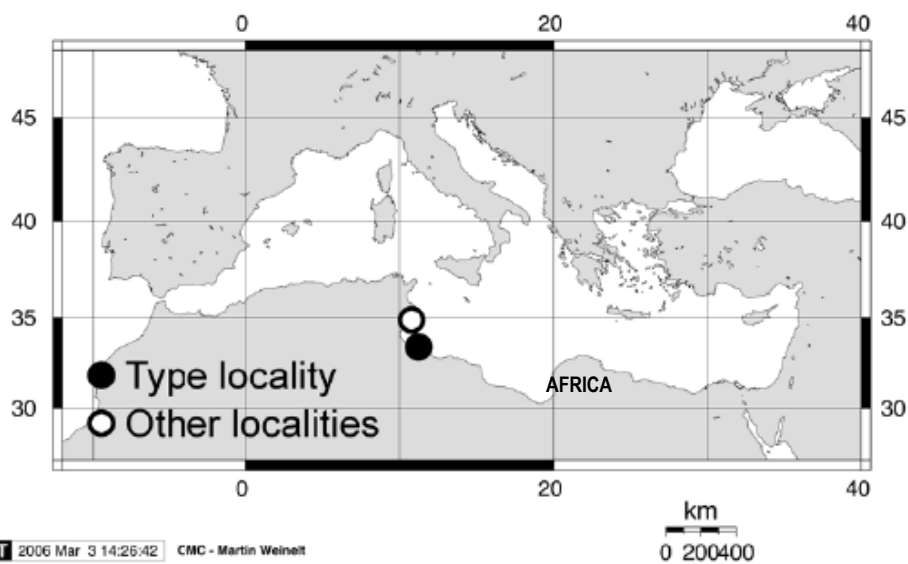


Fig. 21. Distribution géographique de *Echinobothrium euterpes* sur les côtes tunisiennes. (d'après Tyler, 2006)

II.1.6. *Molluscotaenia crassiscolex* (von Linstow, 1890)

a. Hôte : la musaraigne carrelet ou musaraigne commune, *Sorex araneus* Linnaeus, 1758 (Soricomorpha, Soricidae) (Fig. 22)



Fig. 22. *Sorex araneus*

b. Localité de capture de l'hôte : Réserve Naturelle de Py (Pyrénées françaises)

c. Localisation dans l'hôte : intestin

d. Systématique

- Embranchement : Plathelminthes
- Super-classe : Cercomeromorphae Bychowsky, 1937
- Classe : Cestoda Rudolphi, 1808
- Sous-classe : Eucestoda Southwell, 1930
- Ordre : Cyclophyllidea van Beneden dans Braun, 1900
- Famille : Dilepididae Railliet & Henry, 1909
- Genre : *Molluscotaenia* Spasskii & Andreiko, 1971
- *Molluscotaenia crassiscolex* von Linstow, 1890

De tous les groupes de cestodes parasites, l'ordre des Cyclophyllidea représente le plus diversifié (plus de 3000 espèces, environ 380 genres et 18 familles) (Georgiev, 2003). Il renferme un grand nombre d'espèces essentiellement parasites d'hôtes terrestres et aquatiques. Les espèces de l'ordre sont rencontrées dans le système intestinal de presque tous les taxons hormis les poissons téléostéens et chondrichthyens. Plusieurs cyclophyllidés ont un cycle totalement terrestre, néanmoins les membres de quelques familles peuvent être rencontrés en milieu d'eau douce, et ils sont presque absents de l'écosystème marin (Hoberg, 1986). Cet ordre présente un grand intérêt économique et sanitaire car non seulement renferme des espèces parasites d'humains, mais aussi d'oiseaux et de mammifères d'intérêt agricole. La famille des Dilepididae présente également une grande diversité taxonomique. Elle renferme environ 100 genres (Bona, 1994) et 500 espèces (Matevosyan, 1963 ; Schmidt, 1986). Cependant, ils sont plus répandus chez les oiseaux et très peu se rencontrent chez les petits mammifères (Insectivora, Chiroptera, Lagomorpha et Rodentia) (Georgiev *et al.*, 2006).

e. Morpho-anatomie

Les membres de la famille sont généralement caractérisés par leur complexe rostellaire constitué par un rostre, une poche rostellaire et deux rangées de 16 à 20 crochets. Le scolex présente 4 ventouses (Fig. 23A,B). Le strobile est réduit et contient des proglottis fortement craspédotes.

Chez *Molluscotaenia crassiscolex*, le nombre de testicules peut atteindre 300. Ils sont disposés, dans les proglottis mûrs, en arrière de l'ovaire. Les proglottis mûrs sont dépourvus de vésicule séminale. Le canal déférent est transversal et très pelotonné. La poche du cirre est petite et de situation antérieure. Le cirre présente de nombreuses petites épines. L'ovaire est bilobé et situé dans la partie antérieure de la médulle, sous la poche du cirre. L'utérus est ventral ; au début très réticulé, elle devient sacciforme et profondément lobulé.

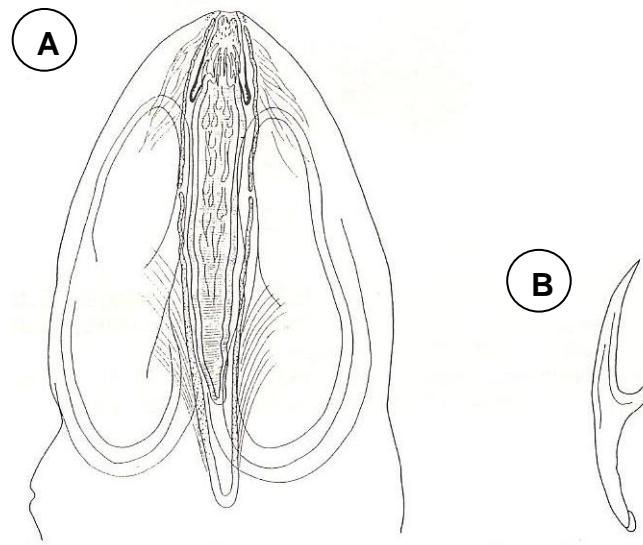


Fig. 23. Morphologie de *Molluscotaenia crassiscolex* (von Linstow, 1890).
A : Scolex. B : Crochet (d'après Khalil *et al.*, 1994)

f. Cycle biologique

Les Dilepididae sont généralement parasites intestinaux d'oiseaux, mais quelques genres peuvent parasiter de petits mammifères sylvestres. Ils sont dihéteroxyènes. Leur cycle inclut un hôte intermédiaire qui peut être un annélide, un mollusque ou un arthropode (Georgiev *et al.*, 2006). *Molluscotaenia crassiscolex* parasite les musaraignes du genre *Sorex*.

Le cycle débute par l'élimination des œufs avec les fèces de la musaraigne dans le milieu extérieur. Ingérés par un gastéropode terrestre du genre *Arion* (Kisielewska, 1958 ; Jourdane, 1972 ; Genov, 1984), les œufs poursuivent leur développement et donnent des métacestodes. Ces derniers deviennent des adultes dans l'intestin de la musaraigne (Fig. 24).

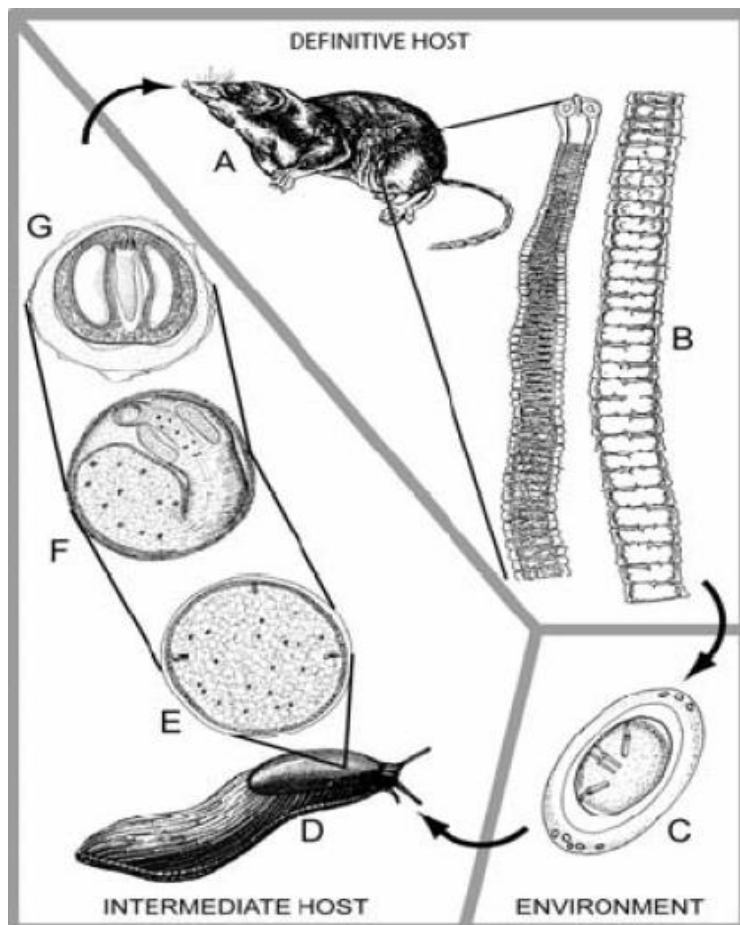


Fig. 24. Cycle évolutif de *Molluscotaenia crassiscolex*.

A : musaraigne commune, *Sorex araneus* (hôte définitif). B : cestode adulte. C : œuf.
D : gastéropode terrestre *Arion lusitanicus* (hôte intermédiaire). E-G : étapes consécutives du développement du métacéstode chez l'hôte intermédiaire.
G : monocysticercoïde infestant (d'après Georgiev *et al.*, 2006)

g. Biogéographie

Les espèces du genre *Molluscotaenia* sont cosmopolites, mais, elles sont surtout rencontrées dans le centre ouest de l'Eurasie, en coïncidence avec la répartition de son hôte définitif, *Sorex araneus* (Fig. 25).



Fig. 25. Distribution géographique de la musaraigne commune,
Sorex araneus
(extrait de la page de l'IUCN (International Union for
Conservation of Nature)
<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/29661/0/rangemap>)

II.2. Préparation des cestodes pour leur étude ultrastructurale au microscope électronique à transmission

La préparation du matériel pour l'étude ultrastructurale est un procédé qui requiert une précaution particulière. Il est important que les hôtes soient fraîchement morts et qu'ils soient traités avec la plus grande rapidité possible, pour extraire les helminthes encore vivants. Ce facteur est indispensable pour éviter une altération des structures internes du dit parasite. Pour cela, dans la zone de capture on établit un laboratoire provisoire avec les éléments essentiels à la dissection des hôtes et à l'extraction des cestodes : loupes binoculaires, boîtes de Pétri, matériel de dissection élémentaire (pincés, bistouris, ciseaux, aiguilles à manche, gants...), tubes et divers réactifs utilisés généralement en helminthologie (solution saline, alcool 70°, 100°, eau distillée...), mais aussi spécifiques pour la microscopie électronique à transmission (cacodylate de sodium, glutaraldéhyde, paraformaldéhyde...).

Une fois que les hôtes arrivent au laboratoire improvisé, ils sont rapidement disséqués. Par la suite, les parasites extraits sont soumis à un traitement caractérisé par plusieurs phases allant de la fixation à l'observation des coupes au microscope électronique à transmission en passant par la déshydratation, l'inclusion, l'ultramicrotomie et le contraste des coupes.

II.2.1. Fixation

Il s'agit d'une étape essentielle qui nécessite de travailler sur du matériel biologique vivant. La méthode de fixation dépend du matériel à étudier et il est souvent nécessaire de développer une technique spéciale pour s'assurer que le fixateur atteigne le tissu le plus rapidement possible.

Les altérations de la structure fine débutent juste après la mort d'un organisme. Il est ainsi indispensable d'utiliser des fixateurs dont la pénétration est rapide. En outre, il faut aussi 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 avoisinant 0,25 mm. Ce qui signifie qu'il faut un volume de tissu inférieur ou égal à 0,5 mm³ pour avoir une fixation uniforme et une postérieure inclusion correcte du matériel.

Les fixateurs chimiques utilisés, généralement les aldéhydes et le tétr oxyde d'osmium pénètrent les tissus très lentement. Il est donc nécessaire d'observer préalablement le parasite afin de sélectionner et séparer les proglottis mûrs qui feront l'objet de notre étude.

La fixation proprement dite comprend deux étapes : la première fixation ou préfixation et la post-fixation.

a. Préfixation

La préfixation est réalisée avec une solution de glutaraldéhyde ou un mélange de glutaraldéhyde et de paraformaldéhyde. Ces aldéhydes ont pour rôle de stabiliser les composants protéiques. Pour notre étude, le fixateur choisi est le glutaraldéhyde.

La première fixation est donc faite avec une solution froide (4°C) de glutaraldéhyde à 2,5% dans du tampon cacodylate de sodium 0,1M à un pH de 7,4 pendant deux heures minimum. Le matériel préfixé peut être maintenu pendant de longues périodes.

b. Post-fixation

Avant de passer à la post-fixation, il est nécessaire de procéder à plusieurs rinçages (3 de 15 minutes chacun) avec du tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,4.

Pour la post-fixation, on utilise du tétr oxyde d'osmium OsO₄ à 1% dans du tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,4 pendant une heure.

L'osmium est considéré comme le fixateur idéal, car il colore les composés lipidiques (acides gras insaturés), stabilise les protéines et apporte un léger contraste en densifiant les membranes. Cependant, c'est un produit toxique et très dangereux. Ses vapeurs sont nocives et peuvent provoquer des irritations. Son utilisation doit donc se faire avec une extrême prudence sous une hotte aspirante (Fig. 26).

Comme pour la première fixation, après la post-fixation, il est nécessaire de procéder à plusieurs rinçages (3 de 15 minutes chacun) avec du tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,4 pour enlever l'excès d'osmium.



Fig. 26. Hotte aspirante pour la manipulation de l'osmium

Il est important de noter que les deux fixateurs sont de préparation extemporanée, et peuvent se conserver un certain temps à 4°C.

Le glutaraldéhyde se prépare à partir d'une solution originale de glutaraldéhyde à 25% et le tétroxyde d'osmium à partir d'une solution originale à 4% dans de l'eau bidistillée. Ces deux solutions mères sont ensuite mélangées à de l'eau bidistillée et à une solution de cacodylate sodique 0,2 M ajustée à un pH 7,4 tel qu'il est détaillé dans les deux tableaux qui suivent :

Glutaraldéhyde à 2,5 % dans du cacodylate 0,1 M à pH 7,4
1 ml de glutaraldéhyde à 25%
4 ml d'eau bidistillée
5 ml de tampon cacodylate 0,2M à pH 7,4

Tableau III. Préparation du fixateur

Tétroxyde d'osmium à 1% dans du cacodylate 0,1M à pH 7,4
1 ml de tétroxyde d'osmium à 4% dans de l'eau bidistillée
2 ml d'eau bidistillée
4 ml de tampon cacodylate 0,2 M à pH 7,4

Tableau IV. Préparation du post-fixateur

II.2.2. Déshydratation

Cette étape est essentielle. Elle permet d'éliminer toutes traces d'eau dans les cellules. Ainsi une fois le matériel fixé, on procède à la déshydratation. Cette dernière consiste à soumettre les échantillons à des bains successifs d'éthanol de concentration croissante. Elle se termine par un passage dans un bain d'une heure dans de l'oxyde de propylène.

Le protocole de déshydratation suivi figure dans le Tableau V qui suit :

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 V. Protocole de déshydratation

II.2.3. Inclusion

L'observation des coupes en microscopie électronique requiert la confection de coupes ultrafines. Pour avoir de bonnes coupes il est nécessaire que les spécimens soient imprégnés et inclus dans un milieu de densité similaire et que les tissus ne se séparent pas durant les coupes. L'inclusion est donc le résultat d'un processus de déshydratation et de substitution de l'oxyde de propylène des tissus par une résine monomère dont la polymérisation permet d'obtenir un support adéquat pour réaliser des coupes semifines et ultrafines.

Dans notre travail nous utilisons la résine Spurr (Spurr, 1969). Cependant, il existe d'autres types de résines telles que l'Araldite ou l'Epon. Néanmoins, la résine Spurr est très appropriée pour les études en microscopie électronique car elle n'est pas miscible à l'eau, ne change pas de volume au cours de la polymérisation, offre une faible viscosité (60 cP à 25°C) et est stable sous les faisceaux d'électrons.

Toutefois, elle a l'inconvénient d'être extrêmement toxique et volatil, ce qui nécessite une attention spéciale durant sa manipulation.

La composition de la résine Spurr est la suivante :

Monomère :

Vinyl cyclohexene dioxide (ERL 4206)..... 10 g

SIGMA V-3630

Additif :

Polypropylene glycol diglycid ether (DER Resin 736)..... 6 g

SIGMA D-8165

Durcisseur :

(2-nonen-1-yl) succinic anhydride (NSA)..... 26 g

SIGMA N-7644

Accélérateur :

2-diméthylaminoéthanol (DMAE S-1)..... 0,4 g

SIGMA D-4256

Plastifiant :

Dibutyl phthalate (DBP)..... 0,8 g

Durcupan ACM FLUKA 44614

Les composants ainsi listés sont soumis à une légère agitation avec un agitateur magnétique pour éviter l'incorporation de bulles d'air.

Le but de l'infiltration étant de permettre une parfaite pénétration de la résine dans les tissus du cestode et de manière homogène, elle doit être faite progressivement, avec des concentrations croissantes de résine selon le processus suivant :

- 1 volume de résine Spurr et 3 volumes d'oxyde de propylène en agitation pendant 2 h
- 1 volume de résine Spurr et 1 volume d'oxyde de propylène en agitation pendant 3 h
- 3 volumes de résine Spurr et 1 volume d'oxyde de propylène en agitation pendant 3 h
- Résine Spurr pure pendant 4-5 h
- Résine Spurr pure pendant 10 h

Ce processus d'infiltration se réalise dans une capsule embryonnaire avec une légère agitation qui peut être orbitale ou tangentielle (Fig. 27).



Fig. 27. Agitateur orbital

Une fois l'infiltration terminée on procède à l'inclusion dans la résine Spurr. Pour cela, on utilise des moules de caoutchouc (Fig. 28). Chaque moule est dotée de petites poches plates dans lesquelles sont d'abord placées des étiquettes portant chacune un numéro identifiant. Les échantillons sont ensuite déposés un à un dans les poches préalablement remplies de résine, tout en veillant à bien orienter le matériel afin de pouvoir gagner du temps lors des coupes.

Les moules sont ensuite mis à polymériser à 60°C pendant 48 heures. On obtient ainsi de petits blocs durs de résine dans lesquels le matériel biologique apparaît fortement coloré en noir par le tétraoxyde d'osmium (Fig. 29).

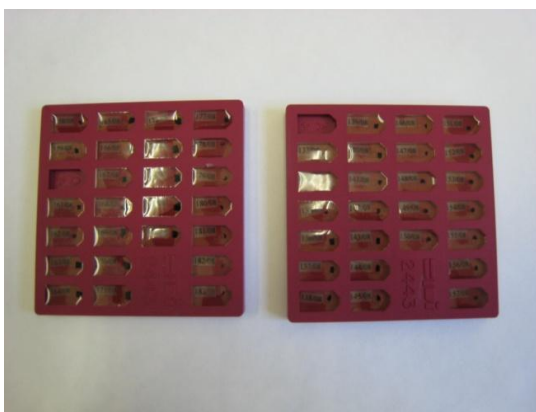


Fig. 28. Moules de caoutchouc, après polymérisation des blocs de résine



Fig. 29. Blocs de résine

II.2.4. Microtomie et ultramicrotomie

Afin de préparer l'extrémité par où se feront les coupes semifines, les blocs polymérisés sont taillés en pyramide grâce au pyramitome Reichert TM-60 (Fig. 30).

Ce procédé vise à quitter l'excès de résine entourant l'échantillon afin de faciliter les coupes semifines. Les blocs ainsi préparés sont placés dans le porte objet de l'ultramicrotome (Reichert-Jung Ultracut E) (Fig. 31).

Pour les coupes semifines ($1\mu\text{m}$ d'épaisseur), on utilise des couteaux de verre, confectionnés à partir de barre de verre qui sont taillés avec un brise-verre (Glass Knifemaker Leica EM KMR2) (Fig. 32).



Fig. 30. Pyramitome (Reichert TM-60)



Fig. 31. Ultramicrotome (Reichert-Jung Ultracut E)



Fig. 32. Brise-verre (Glass Knifemaker Leica EM KMR2)

Il est nécessaire de monter sur chaque couteau de verre une petite alvéole grâce à un ruban métallique, adhésif et imperméable et de la paraffine. Cette dernière permet de bien colmater l'alvéole qui ultérieurement sera remplie d'eau. On pourra ainsi recueillir les coupes qui flotteront à la surface de l'eau.

Les coupes semifines obtenues sont fixées sur une lame, se teignent avec un mélange de bleu de méthylène à 0,5% et du borax à 0,5% et s'observent au microscope photonique, afin de localiser la zone d'intérêt (testicules, canal déférent) (Fig. 33). Une fois la zone

désirée localisée, il est parfois nécessaire de repyramider le bloc afin d'amoindrir la surface de coupe avant de procéder aux coupes ultrafines.

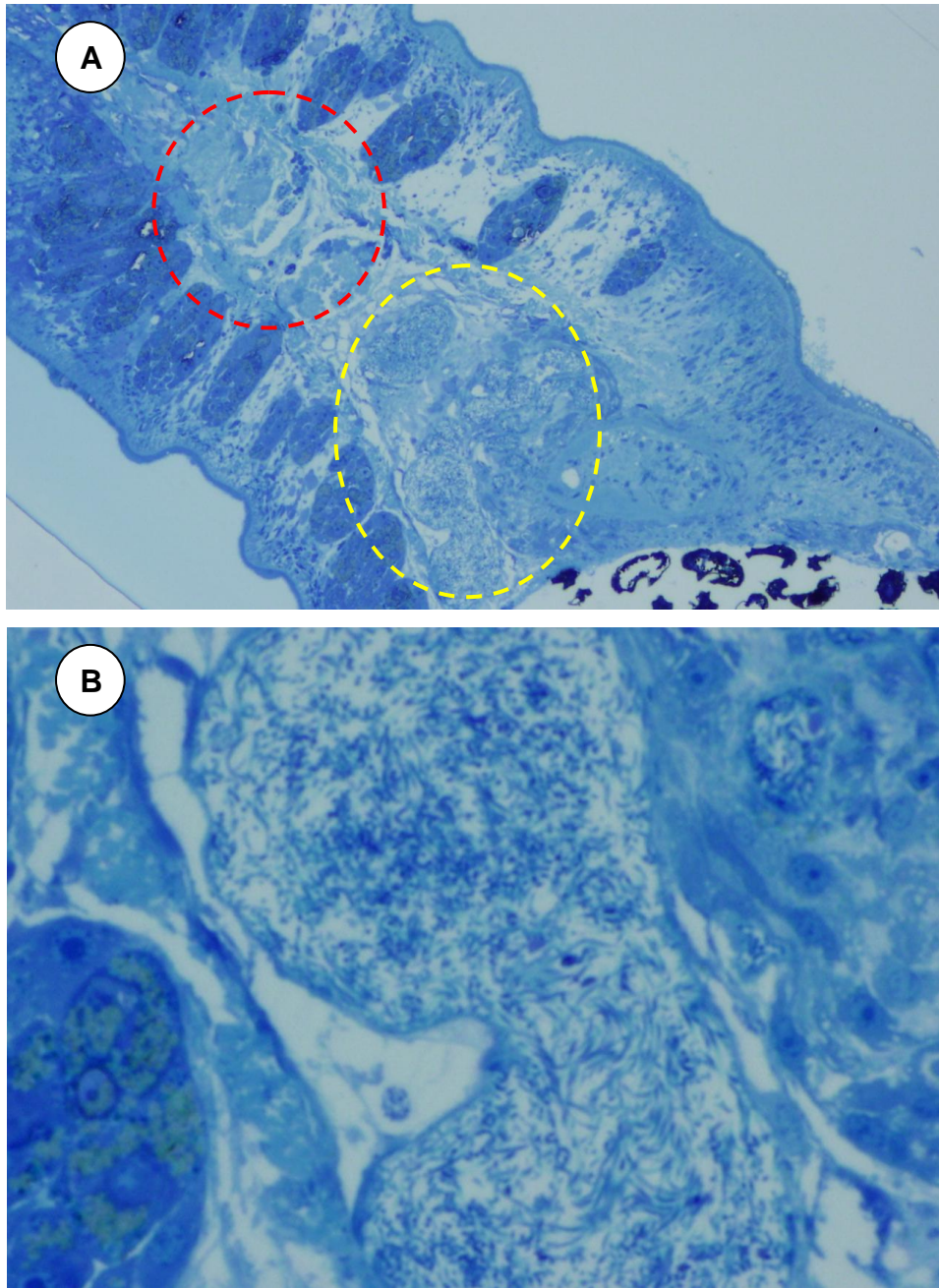


Fig. 33. Exemples de coupes semifines (cas de *Clestobothrium crassiceps*) après coloration, montrant les zones testiculaire (en rouge) et vésiculaire (en jaune).

A : Coupe semifine montrant des testicules et la vésicule séminale en coupe.

B : Agrandissement de la zone vésiculaire montrant les spermatozoïdes sous forme de filaments

Les coupes ultrafines de l'ordre de 60-90 nm d'épaisseur sont effectuées avec le même ultramicrotome, mais cette fois ci en utilisant un couteau de diamant. Cependant, le principe de base reste le même. Les coupes ultrafines sont recueillies sur une petite grille circulaire en cuivre de 200 mesh. Dans le cas où le matériel est très fragile, les grilles en cuivre sont substituées par des grilles en or recouvertes d'une membrane de carbone ou de plastique. Ces grilles servent de support aux coupes pour leur observation au microscope électronique à transmission.

II.2.5. Contraste des coupes ultrafines

Avant leur observation au microscope, les coupes ultrafines doivent être contrastées afin de mettre en exergue les différents composants des tissus. Ainsi, les divers constituants des cellules apparaîtront avec différents gradients de contraste en fonction de leur intensité d'imprégnation. Pour cela, on utilise des sels de métaux lourds (acétate d'uranyle et citrate de plomb) selon la méthode de Reynolds (1963) :

- 30 minutes dans de l'acétate d'uranyle (solution aqueuse à 2%) à l'obscurité
- rinçage des grilles avec de l'eau ultrapure
- 10 minutes sur une goutte de citrate de plomb dans une boîte hermétique et avec des pastilles de soude
- rinçage des grilles avec de l'eau ultrapure

Cependant, il faut faire très attention quant à la manipulation de ces produits, surtout l'acétate d'uranyle qui est une substance toxique et faiblement radioactive. De plus, cette technique est souvent délicate à mettre en œuvre car l'acétate d'uranyle précipite très rapidement à la lumière et le citrate de plomb se transforme en carbonate en présence du dioxyde de carbone.

Une fois les grilles contrastées, on peut passer à leur observation au microscope électronique à transmission. Dans notre cas on utilise le microscope électronique à transmission JEOL 1010 (Fig. 34) avec un voltage de 80 Kv.

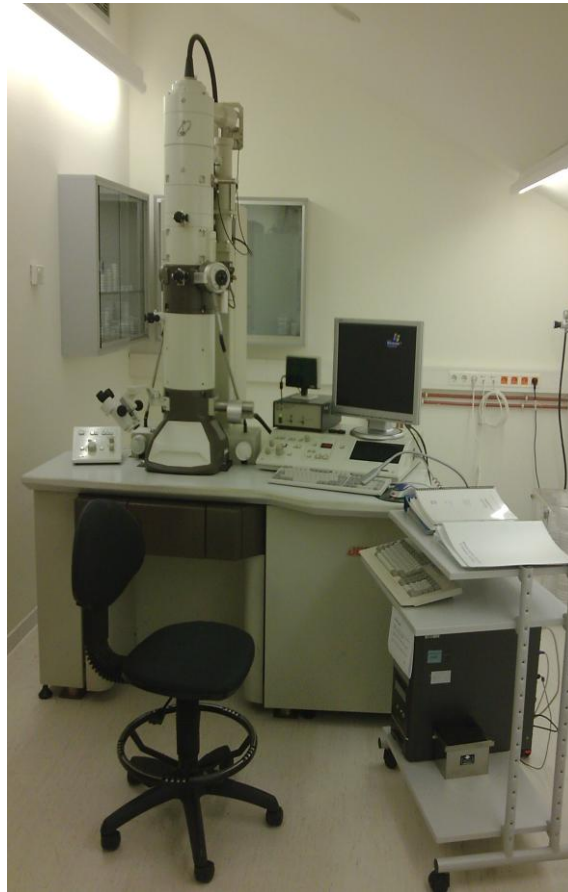


Fig. 34. Microscope électronique à transmission JEOL 1010

Les grilles sont placées sur un porte objet qui est introduit dans le microscope en respectant les vides d'air. Le filament est alors allumé et on obtient un faisceau d'électrons qui traverse les coupes ultrafines. En ce moment, il est donc possible de reconnaître les différents constituants cellulaires.

Le microscope est relié à un écran où apparaissent les photos prises en format TIFF.

II.2.6. Mise en évidence des polysaccharides : technique de Thiéry

La technique de Thiéry (1967) permet le marquage du glycogène, des mucopolysaccharides et des glycoprotéines intracellulaires. Elle est donc très indiquée pour détecter ou identifier le glycogène contenu dans les spermatozoïdes. Dans ce cas, les coupes ultrafines doivent être recueillies sur des grilles en or. Cependant, il est

important de remarquer que la méthodologie appliquée dans ce présent mémoire est une légère modification de la technique de Thiéry.

Les grilles sont d'abord mises dans une solution d'acide périodique à 10% (dans de l'eau bidistillée) pendant 30 minutes. Ensuite, elles subissent 3 lavages successifs de 10 minutes avec de l'eau bidistillée. Après les lavages, les grilles sont ensuite mises dans une solution de thiocarbohydrazide (TCH) à 0,2% en acide acétique à 20% pendant 24 heures. Nous avons appliqué cette durée afin de pouvoir mettre en évidence les mucopolysaccharides et le glycogène. Une durée de 30-45 minutes aurait permis de mettre en évidence seulement la présence de glycogène ; et une durée de 48-72 heures aurait permis de mettre en évidence la présence des glycoprotéines.

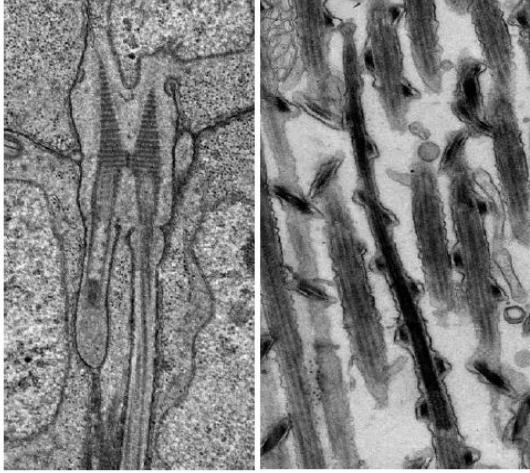
Après le TCH, les grilles sont lavées à nouveau dans de l'acide acétique à différentes concentrations, puis dans de l'eau bidistillée suivant les détails indiqués dans le Tableau VI :

Lavages	Durée
Acide acétique à 10%	2 rapides (moins d'une minute)
Acide acétique à 10%	2 x 15 minutes
Acide acétique à 5%	2 x 5 minutes
Acide acétique à 1%	2 x 5 minutes
Eau bidistillée	3 x 10 minutes
Lavage goutte à goutte avec de l'eau bidistillée	1 rapide (moins d'une minute)

Tableau VI. Détails des différents lavages après le TCH

Ensuite, elles sont placées dans une solution de protéinate d'argent à 1% (dans de l'eau bidistillée) durant 30 minutes et à l'obscurité. Il est important de noter que la solution de protéinate d'argent à 1% doit être préparée 20 à 30 minutes avant son utilisation et que 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.

Les grilles sont finalement rincées à l'eau bidistillée (6 x 10 minutes), pour éviter la précipitation de la solution de protéinate d'argent, et finalement séchées à l'aide d'un papier filtre avant de procéder à leur observation.



CHAPITRE III :

RESULTATS

CHAPITRE III : RESULTATS

Les principaux résultats obtenus sur l'étude ultrastructurale de la spermiogenèse et/ou du spermatozoïde de six espèces de cestodes appartenant à six ordres sont réunis dans six publications, parues ou à paraître dans des revues internationales.

Chaque article en anglais est précédé de son résumé détaillé en français. Les six articles sont les suivants :

Marigo A.M., Eira C., Bâ C.T. & Miquel J. (2011). Spermatological characters of *Acanthobothrium crassicolle* Wedl, 1855 (Tetraphyllidea, Onchobothriidae), a parasite of the common stingray *Dasyatis pastinaca*. *Acta Parasitologica*, **56**(2) : 191-201.

Marigo A.M., Caira J., Świdorski Z., Bâ C.T. & Miquel J. (2011). Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of the trypanorhynch cestode *Aporhynchus menezesi* (Aporhynchidae), a parasite of the velvet belly lanternshark *Etmopterus spinax* (Elasmobranchii : Etmopteridae). *Folia Parasitologica*, **58**(1) : 69-78.

Marigo A.M., Levron C., Bâ C.T. & Miquel J. (2011). Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon of the proteocephalidean cestode *Barsonella lafoni* de Chambrier *et al.*, 2009, a parasite of the catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Siluriformes, Clariidae). *Zoologischer Anzeiger* (sous presse).

Marigo A.M., Delgado E., Torres J., Bâ C.T. & Miquel J. (2011). Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the bothriocephalidean cestode *Clestobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819), a parasite of the teleost fish *Merluccius merluccius* (Gadiformes : Merlucciidae). *Parasitology Research*, **109** (sous presse).

Marigo A.M., Eira C., Bâ C.T. & Miquel J. (2011). Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the diphyllidean cestode *Echinobothrium euterpes* (Neifar, Tyler and Euzet 2001) Tyler 2006, a parasite of the common guitarfish *Rhinobatos rhinobatos*. *Parasitology Research*, **109**(3) : 809-821.

Marigo A.M., Bâ C.T. & Miquel J. (2011). Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the dilepidid cestode *Molluscotaenia crassiscolex* (von Linstow, 1890), an intestinal parasite of the common shrew *Sorex araneus*. *Acta Zoologica (Stockholm)*, **92**(2) : 116-125.

III.1. Caractères spermatologiques de *Acanthobothrium crassicolle* Wedl, 1855 (Tetraphyllidea, Onchobothriidae), parasite de la raie commune, *Dasyatis pastinaca*

Résumé

Le processus de la spermiogenèse chez *Acanthobothrium crassicolle* débute par la formation d'une zone de différenciation contenant deux centrioles, associés chacun à une racine striée et séparés par un corps intercentriolaire. Ce dernier est constitué d'une seule bande opaque aux électrons. Les deux centrioles donnent naissance à deux flagelles libres qui croissent orthogonalement à l'expansion cytoplasmique médiane. Ultérieurement, ils entament une rotation flagellaire et finissent par être en position parallèle à l'expansion cytoplasmique. Après la rotation, seul un des flagelles continue à croître, ce qui donne un flagelle court et un long. Les flagelles vont finalement fusionner avec l'expansion cytoplasmique médiane. Durant les stades terminaux de la spermiogenèse, le noyau devient filiforme et migre dans le corps spermatique. Finalement, l'anneau de membranes arquées s'étrangle et le spermatozoïde se libère du cytoplasme résiduel. L'organisation ultrastructurale du spermatozoïde de *A. crassicolle* suit le modèle général décrit chez les Tetraphyllidea-Onchobothriidae, mais présente quelques différences. Le spermatozoïde mûr de *A. crassicolle* est filiforme, effilé aux deux extrémités et dépourvu de mitochondrie. Il contient deux axonèmes de longueur inégale, de type 9+1', un noyau, des microtubules corticaux parallèles et des granules de glycogène. L'extrémité antérieure contient un seul corps en crête, enroulé autour d'un long et fin cône apical. Un tel cône apical n'a jamais été décrit dans un spermatozoïde de Tetraphyllidea. Une autre particularité est la présence d'un microtubule dense aux électrons dans le sommet externe du corps en crête.

Mots clés : *Acanthobothrium crassicolle*, Onchobothriidae, Tetraphyllidea, Cestoda, ultrastructure, spermiogenèse, spermatozoïde

Spermatological characters of *Acanthobothrium crassicolle* Wedl, 1855 (Tetraphyllidea, Onchobothriidae), a parasite of the common stingray *Dasyatis pastinaca*

Adjí Mama Marigo^{1,2}, Catarina Eira^{3,4}, Cheikh Tidiane Bâ⁵ and Jordi Miquel^{1,2*}

¹Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, sn, E-08028 Barcelona, Spain; ²Institut de Recerca de la Biodiversitat, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 645, E-08028 Barcelona, Spain; ³CESAM & Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Campus de Santiago 3810-193 Aveiro, Portugal; ⁴Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem, Estação de Campo de Quiaios, Apartado 16 EC Quiaios 3081-101 Figueira da Foz, Portugal; ⁵Département de Biologie Animale, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar, Senegal

Abstract

We describe the spermiogenesis process and the ultrastructural characters of the spermatozoon of *Acanthobothrium crassicolle* by means of transmission electron microscopy, including cytochemical analysis for glycogen. Spermiogenesis in *A. crassicolle* begins with the formation of the differentiation zone that contains two centrioles associated with striated rootlets and an inter-centriolar body. The latter is formed by one electron-dense layer. The centrioles develop into two free flagella that first grow orthogonally to a median cytoplasmic process and then undergo flagellar rotation becoming parallel to that median cytoplasmic process. After flagellar rotation only one of the flagella completes its growth and both short and long flagella undergo proximodistal fusion with the median cytoplasmic process. In the final stages of spermiogenesis, the nucleus becomes filiform and migrates into the spermatid body. Later, the ring of arched membranes constricts and the spermatozoon is liberated from the residual cytoplasm. The ultrastructural organization of the spermatozoon of *A. crassicolle* follows the general pattern of spermatozoa of the other Tetraphyllidea-Onchobothriidae species, but exhibits some differences. It is filiform, tapered at both extremities and lacks mitochondrion. It contains two axonemes of unequal length showing the 9 + “1” pattern of Trepaxonemata, a nucleus, parallel cortical microtubules and electron-dense granules of glycogen. The anterior extremity of the male gamete contains a single crested body surrounding a thin and long apical cone. This type of apical cone has never been described in a tetraphyllidean spermatozoon. Another particularity is the presence of a single electron-dense microtubule at the vertex of the crested body.

Keywords

Acanthobothrium crassicolle, Onchobothriidae, Tetraphyllidea, Cestoda, ultrastructure, spermiogenesis, spermatozoon

Introduction

The order Tetraphyllidea includes species that live essentially in the spiral valve of Elasmobranchs (i.e., sharks and rays) but also in their sister group, the Holocephali (chimaeras). Euzet (1994) recognized eight families (Cathetocephalidae, Litobothriidae, Disculicipitidae, Prosobothriidae, Dioecotaeniidae, Onchobothriidae, Phyllobothriidae and Chimaerocestidae), all monogeneric except for the Phyllobothriidae and the Onchobothriidae. A phylogenetic analysis (Caira *et al.* 1999) revealed that tetraphyllideans are not monophyletic. In fact, while the family Onchobothriidae is a monophyletic group the family Phyllobothriidae is not monophyletic. Also according to the

same analysis the uniloculate species are basal to the multiloculate, so the genus *Acanthobothrium* represents a basal onchobothriid lineage. Concerning the monogeneric families, the analysis of Caira *et al.* (1999) corroborates the recognition of the Litobothriidae although the validity and correct placement of Prosobothriidae, Dioecotaeniidae and Chimaerocestidae are not resolved for these authors. Finally, Caira *et al.* (1999) questioned whether the Cathetocephalidae and the Disculicipitidae represented two different families. More recent molecular data (Caira *et al.* 2005) corroborated the recognition of the order Cathetocephalidea erected by Schmidt and Beveridge (1990). According to the molecular analysis of Olson *et al.* (2001) the Tetraphyllidea are separated in four groups: the Rhinebothri-

*Corresponding author: jordimiquel@ub.edu

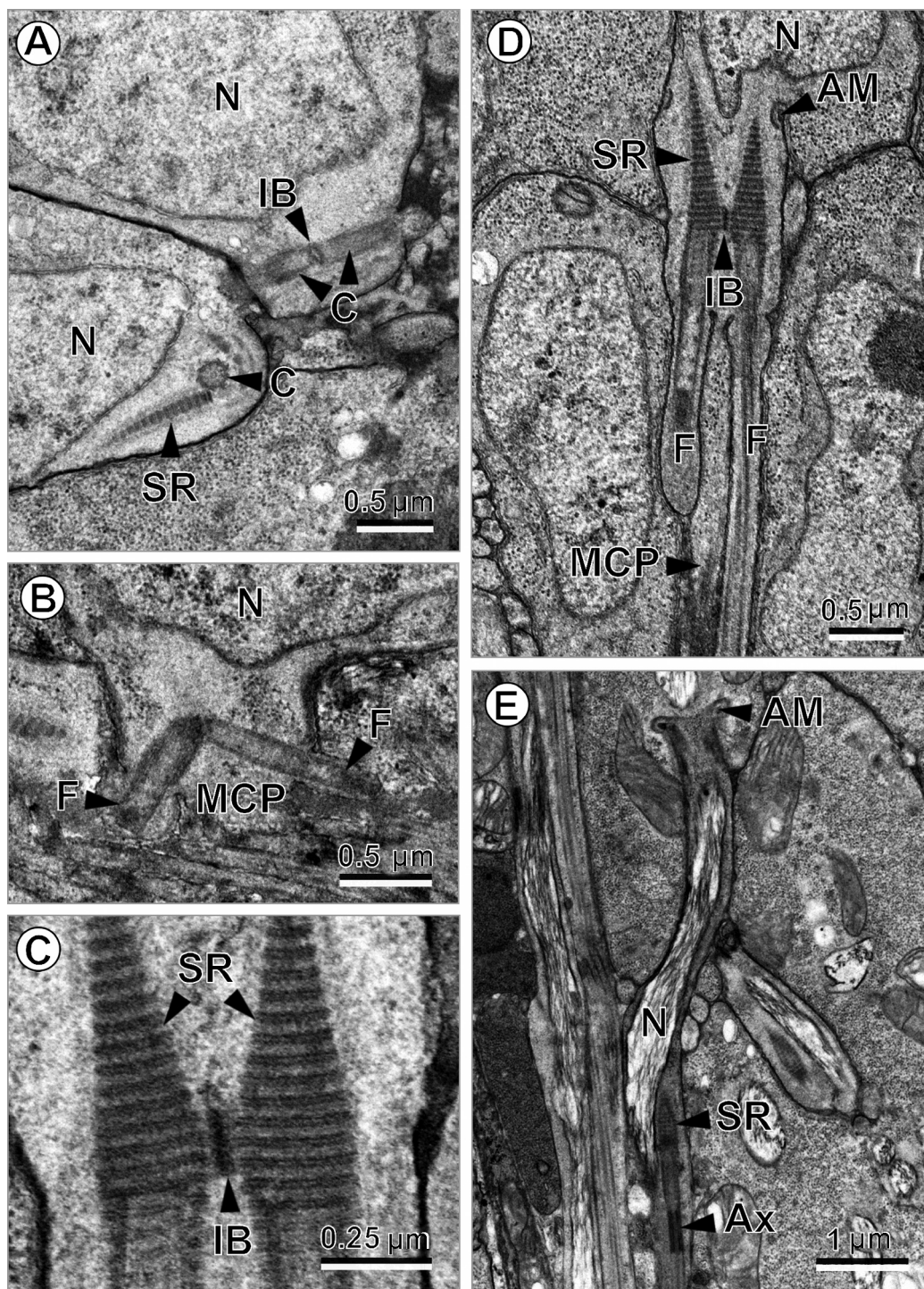


Fig. 1. TEM micrographs of the spermiogenesis of *Acanthobothrium crassicolle*. **A.** Longitudinal sections of the zone of differentiation showing the centrioles, the intercentriolar body and the striated rootlets. **B.** Longitudinal section of the zone of differentiation showing the flagellar rotation of the flagella towards the median cytoplasmic process. **C.** Detail of the intercentriolar body showing the single electrondense plate. **D.** Longitudinal section of the spermatid showing the parallel flagella, before the proximodistal fusion. **E.** Longitudinal section of a spermatid during the penetration of the nucleus and after the flagellar fusion showing the striated rootlets and one of the axonemes in an advanced stage of spermiogenesis. **Abbreviations to all figures:** AC – apical cone, AM – arched membranes, ASE – anterior spermatozoon extremity, Ax – axoneme, Ax1 – first axoneme, Ax2 – second axoneme, C – centrioles, C1 – first centriole, C2 – second centriole, CB – crested body, CM – cortical microtubules, D – doublets, F – flagellum, F1 – first flagellum, F2 – second flagellum, G – granules of glycogen, IB – intercentriolar body, MCP – median cytoplasmic process, N – nucleus, PM – plasma membrane, PSE – posterior spermatozoon extremity, S – singlets, SR – striated rootlets

inae, the Phyllobothriidae, the Onchobothriidae and the genus *Acanthobothrium*. Moreover, it is interesting to remark the close relationships between *Acanthobothrium* and the Proteocephalidea (see Olson *et al.* 2001 and Waeschenbach *et al.* 2007).

In the last decades there is an important increase in the ultrastructural studies on spermatology of Platyhelminthes in general and cestodes in particular (see the review papers of Justine 1998, 2001; Levron *et al.* 2010). It is now widely accepted that ultrastructural spermatological characters contribute to a better understanding of relationships within the Platyhelminthes (Euzet *et al.* 1981; Justine 1991, 1995, 1998, 2001; Hoberg *et al.* 1997, 2001; Olson *et al.* 2001; Bruňanská 2010; Levron *et al.* 2010). To our knowledge, there are ultra-

structural data on the spermiogenesis and/or spermatozoon of four onchobothriids. These are *Acanthobothrium filicolle* var. *filicolle*, *Acanthobothrium filicolle* var. *benedeni*, *Onchobothrium uncinatum* and *Calliobothrium verticillatum* (Mokhtar-Maamouri and Świderski 1975, Mokhtar-Maamouri 1982, Quilichini *et al.* 2007). Considering the phyllobothriids, there are data on another four species namely *Phyllobothrium gracile*, *Trilocularia acanthiaevulgaris*, *Pseudanthobothrium hanseni* and *Phyllobothrium lactuca* (Mokhtar-Maamouri 1979, MacKinnon and Burt 1984, Mahendrasingam *et al.* 1989, Sène *et al.* 1999).

In the present paper, ultrastructural characters of spermiogenesis and those of the mature spermatozoon of the onchobothriid *Acanthobothrium crassicolle*, an intestinal para-

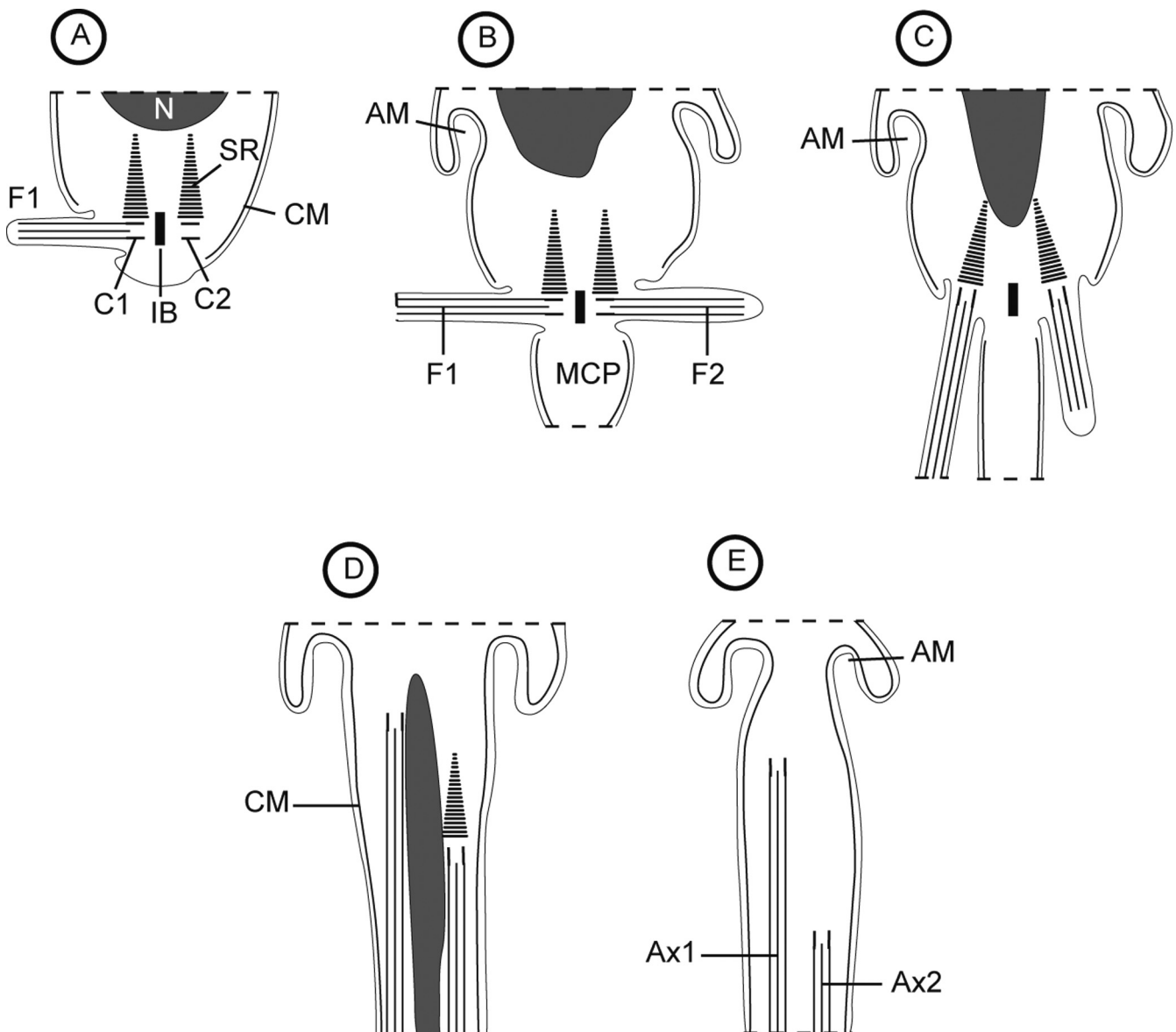


Fig. 2. Schematic drawing showing the main stages of spermiogenesis of *Acanthobothrium crassicolle*

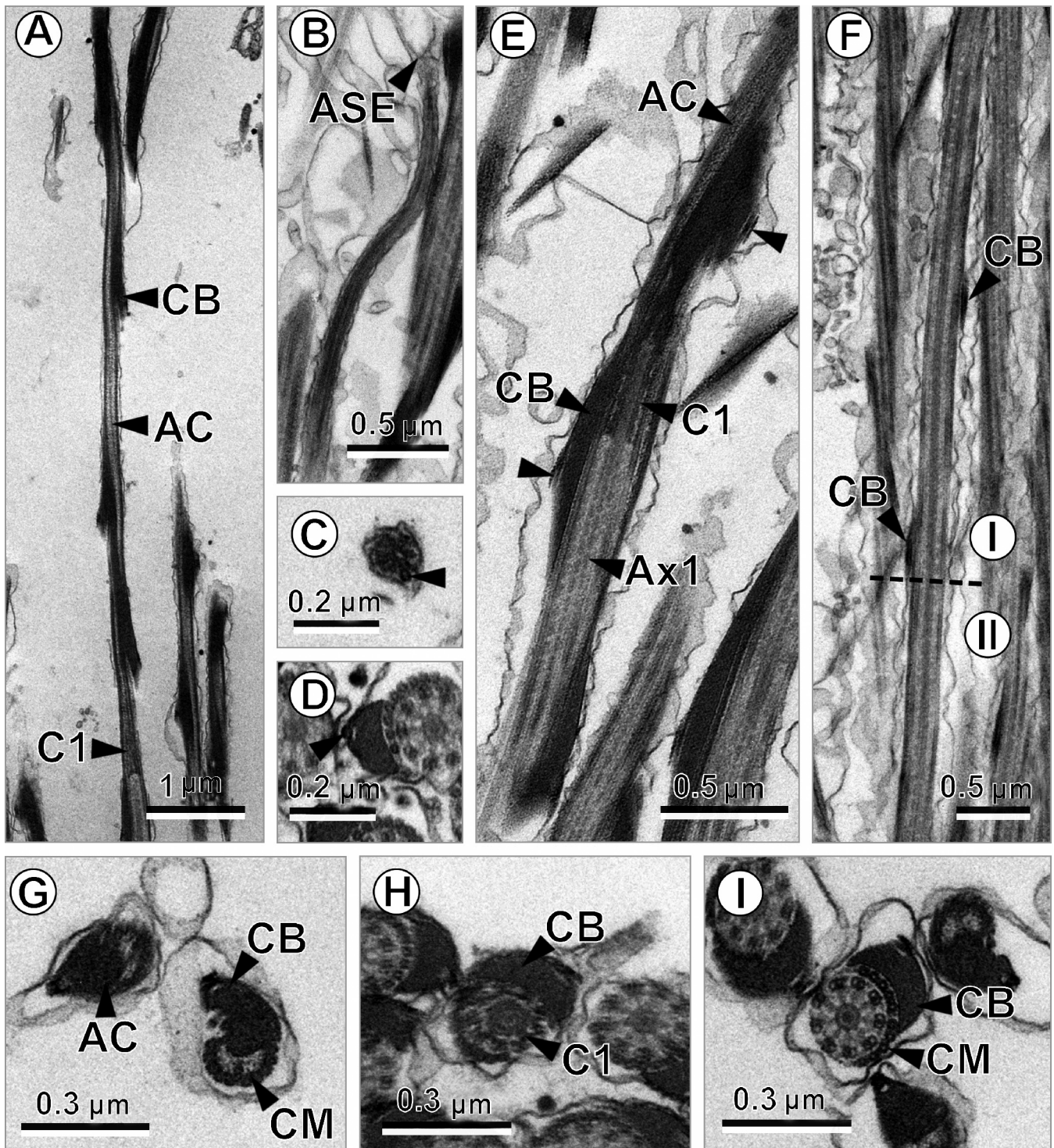


Fig. 3. TEM micrographs of the Region I of the spermatozoon of *Acanthobothrium crassicolle*. **A.** Longitudinal section showing the apical cone surrounded by the crested body. **B.** Detail of the anterior spermatozoon extremity in a longitudinal section. **C.** Cross-section at the level of the apical cone before the appearance of the crested body showing the presence of microtubules (arrowhead). **D.** Cross-section showing a detail of the crested body containing a cortical microtubule (arrowhead) in the exterior vertex. **E.** Longitudinal section at the level of the first centriole showing the apical cone, the crested body, the first axoneme and the cortical microtubule (arrowheads) in the exterior vertex of the crested body. **F.** Longitudinal section showing the transition area between Regions I and II. **G.** Two cross-sections at the level of the apical cone showing a row of electron-dense cortical microtubules and the crested body. **H.** Cross-section at the level of the first centriole. **I.** Cross-section showing the first axoneme and the arc-like row of 10 electron-dense cortical microtubules

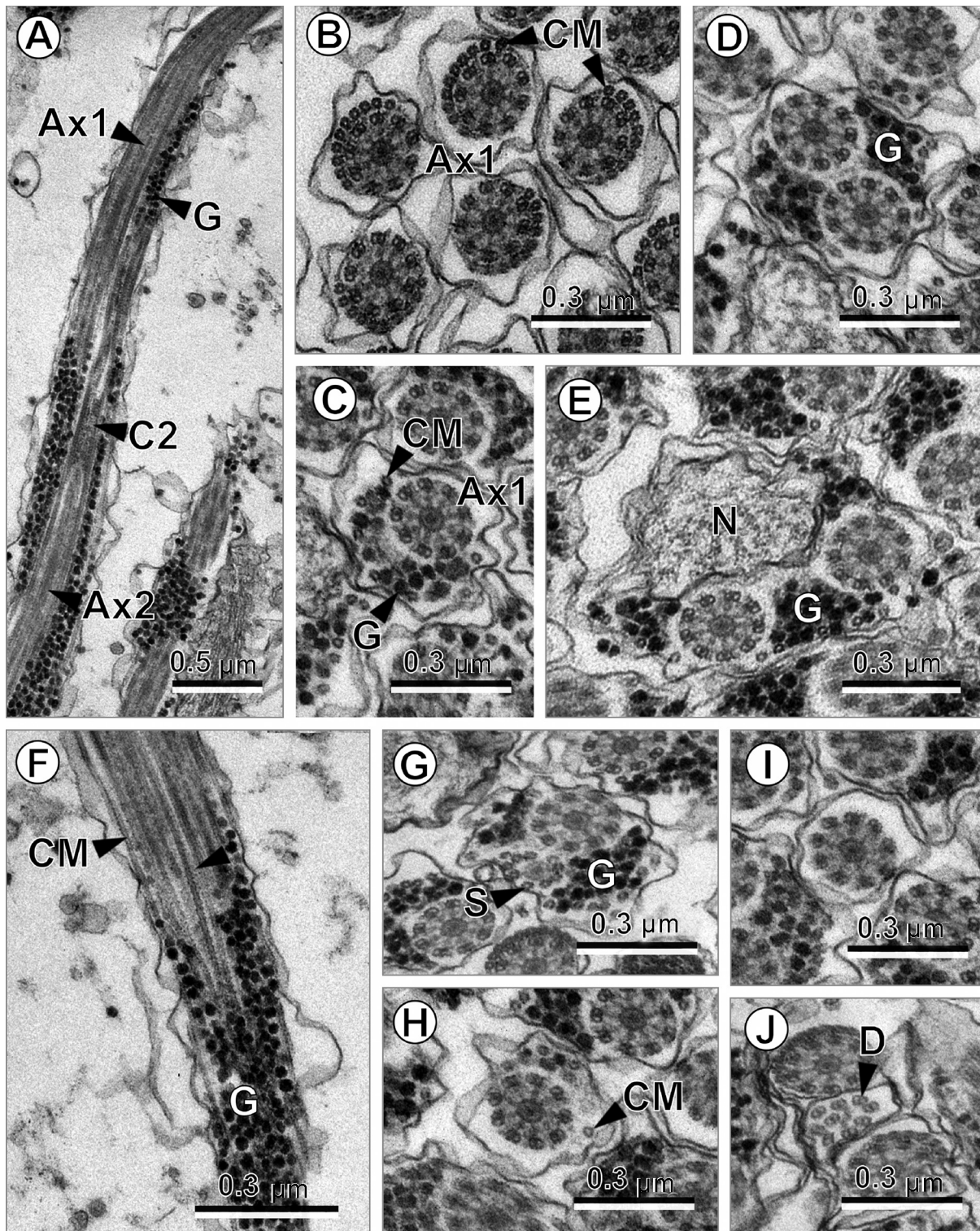


Fig. 4. TEM micrographs of the Regions II, III and IV of the spermatozoon of *Acanthobothrium crassicolle*. **A.** Longitudinal section of Region II showing the transition area between the region with one axoneme and the region with two axonemes. Remark the appearance of the second axoneme. **B.** Cross-sections of Region II showing the first axoneme coiled by the arc-like row of 10 electron-lucent cortical microtubules. **C.** Cross-section of Region II showing the appearance of granules of glycogen. **D.** Cross-section of Region II showing two axonemes. **E.** Cross-section of the nuclear region (Region III). **F.** Longitudinal section of Region IV showing the disorganization of the first axoneme (arrowhead). **G.** Cross-section of Region IV showing the disorganization of the first axoneme. **H.** Cross-section at the end of Region IV after the disappearance of the first axoneme. **I.** Cross-section of the posterior area of Region IV showing the axoneme surrounded by the plasma membrane. **J.** Cross-section at the posterior end of the spermatozoon showing the disorganisation of the last axoneme

site of the common stingray (*Dasyatis pastinaca*) are compared with those of previously studied species belonging to the order Tetraphyllidea.

Materials and methods

Adult specimens of *Acanthobothrium crassicolle* were removed from the spiral valve of the common stingray *Dasyatis pastinaca*, caught off Sidi Mansour (Tunisia) in October 2007.

Living worms were cooled in 0.9% NaCl solution and then the mature proglottids were processed for TEM examination: fixed at 4°C in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer at pH = 7.4, for 2 h, rinsed in the same buffer, postfixed at 4°C in 1% osmium tetroxide for 1 h, rinsed in the same buffer, dehydrated in an ethanol series and propylene oxide, and finally embedded in Spurr. Ultrathin sections were cut using a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome, placed on copper grids and double-stained with uranyl acetate and lead citrate. The grids were examined in a JEOL 1010 transmission electron microscope operated at an accelerating voltage of 80 kV.

The Thiéry (1967) technique was applied for detection of glycogen. Ultrathin sections, collected on gold grids, were treated in periodic acid, thiocarbonylhydrazide and silver proteinate (PA-TCH-SP) as follows: 30 min in 10% of PA, rinsed in distilled water, 24 h in TCH, rinsed in acetic solutions and distilled water, 30 min in 1% SP in the dark, and rinsed in distilled water.

Results

Spermiogenesis

Spermiogenesis in *A. crassicolle* is illustrated in Figures 1A-E and 2A-E. The beginning of spermiogenesis is characterized by the formation of small protrusions that appear at the periphery of the common cytoplasmic mass of spermatids. These areas, named zones of differentiation, are bordered by a field of cortical microtubules and contain two centrioles situated in the same plane (Fig. 1A). These centrioles are associated to striated rootlets and initially they are oriented perpendicularly to the intercentriolar body, which is formed by one electron-dense layer (Fig. 1A, C). The centrioles develop two flagella that soon initiate their flagellar rotation (Fig. 1B), becoming parallel to the median cytoplasmic process. One of the flagella completes its growth only in later stages of spermiogenesis after flagellar rotation (Fig. 1D). After the proximodistal fusion of the flagella with the median cytoplasmic process, a cone-like expansion of the nucleus extends towards the striated rootlets (Fig. 1D). The nucleus becomes filiform and initiates its migration pushing the striated rootlets beyond the ring of arched membranes (Fig. 1E). It is interesting to note that these striated rootlets are absent in the spermatozoon liberated after the constriction of the ring of arched membranes.

Spermatozoon

The ultrastructural organization of the mature spermatozoon of *A. crassicolle* is illustrated in Figures 3A-I, 4A-J, 5 and 6I-IV. The male gamete is a filiform cell that lacks mitochondrion. From the anterior to posterior extremities, we have distinguished four regions (I to IV) with distinctive ultrastructural characters.

Region I (Figs 3A-I, 6I) constitutes the anterior extremity of the mature spermatozoon. The main characteristics of this area are the presence of a long electron-dense apical cone and a single electron-dense helical crested body with a maximum thickness around 200 nm (Fig. 3A). The anterior part of this area begins with a thin region without crested body (Figs 3B, C) corresponding to the anterior spermatozoon extremity. Later, the helical crested body appears, surrounding a part of the apical cone and the portion of the cell containing the first part of the axoneme (Fig. 3A, D-I). An incomplete row of submembranous electron-dense and parallel cortical microtubules also surrounds partially the apical cone (Fig. 3G). In cross-sections the crested body shows a triangular form with an electron-dense microtubule at the apex. This single microtubule appears in the anterior areas of the apical cone without crested body (Fig. 3C-E). The thickness of the crested body decreases progressively toward the end of region I (Fig. 3F). At the base of the apical cone, the centriole becomes visible (Fig. 3A, E, H). The axoneme, of the 9 + "1" trepaxonematan pattern, is partially bordered by an arc-like row of 10 parallel electron-dense cortical microtubules and by the crested body (Fig. 3I).

Region II (Figs 4A-D, 5, 6II) is characterised by the absence of the crested body. The anterior part of this region contains only one axoneme (Fig. 4A, B). Posteriorly, the second centriole is clearly visible showing the beginning of the second axoneme (Fig. 4A). In the area presenting only one axoneme the 10 cortical microtubules disposed in an arc-like arrangement become electron-lucent (Fig. 4B). Later, a large amount of glycogen granules appear forming a semi-circle around the axoneme (Fig. 4C). The granules of glycogen persist in the two-axoneme region but their disposition changes, becoming distributed into two groups on each side of the axonemes (Fig. 4C, D).

Region III (Figs 4E, 6III) corresponds to the nuclear area of the mature spermatozoon. The two axonemes, cortical microtubules and glycogen are still present. The nucleus is slightly electron-dense and exhibits an irregular shape (Fig. 4E).

Region IV (Figs 4F-J, 6IV) constitutes the postnuclear area of the mature spermatozoon. In the anterior zone of the region IV, one of the axonemes becomes disorganised (Fig. 4F, G):

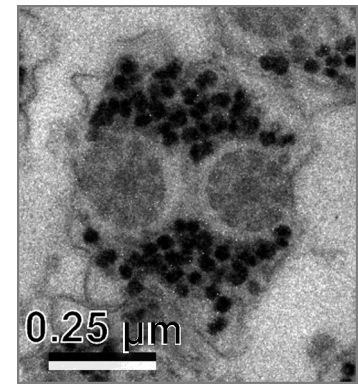


Fig. 5. Thiéry's staining to evidence the presence of glycogen

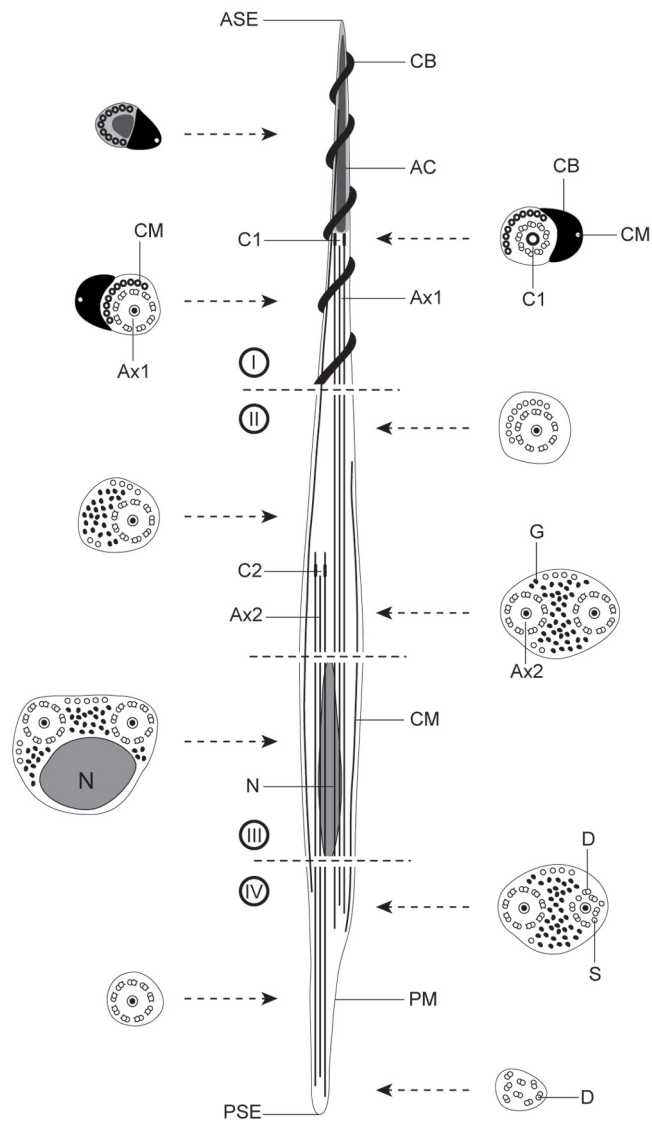


Fig. 6. Schematic drawing showing the ultrastructural organization of the mature spermatozoon of *Acanthobothrium crassicolle*

the central core subsists and the peripheral doublets are transformed into singlets (Fig. 4G). The disappearance of the first axoneme marks the gradual decrease in the amount of glycogen granules and cortical microtubules (Fig. 4H, I). The second axoneme progressively disorganizes toward the posterior extremity of the cell (Fig. 4J).

Discussion

Spermiogenesis

To date, there are ultrastructural data on the sperm of eight Tetracyllidea, although data on spermiogenesis was available for only five species (two Phyllobothriidae and three Onchobothriidae): *Phyllobothrium gracile*, *Phyllobothrium lac-*

tuca, *Acanthobothrium filicolle* var. *filicolle*, *Acanthobothrium filicolle* var. *benedeni* and *Onchobothrium uncinatum* (Mokhtar-Maamouri and Świdorski 1975; Mokhtar-Maamouri 1979, 1982; Sène *et al.* 1999).

Ultrastructural studies have shown that tetracyllideans have the particularity of possessing two patterns of spermiogenesis (I and II) according to Bâ and Marchand (1995). In fact, tetracyllideans include Phyllobothriidae species whose spermatozoa contain one axoneme (except for *P. lactuca* and *T. acanthiaevulgaris*, Mahendrasingam *et al.* 1989, Sène *et al.* 1999) and Onchobothriidae species whose spermatozoa contain two axonemes (see Table I). In view of these ultrastructural data, the order Tetracyllidea is certainly not monophyletic.

In addition, all the Onchobothriidae studied to date follow the type I spermiogenesis, with the presence of striated rootlets, intercentriolar body, flagellar rotation and proximodistal fusion, whereas in the Phyllobothriidae, *P. gracile* exhibits the type II spermiogenesis and *P. lactuca* exhibits the type I spermiogenesis. This variability in tetracyllideans (see Justine 2001 and Levron *et al.* 2010) emphasises the need for additional data to confirm the pattern of spermiogenesis in this order. The type of spermiogenesis is important in the interpretation of relationships between the different orders of cestodes (Justine 1998, 2001; Levron *et al.* 2010).

In *A. crassicolle*, as in *A. filicolle* var. *filicolle*, the intercentriolar body consists of a single central electron-dense plate with a narrow lighter plate on each side, while in *A. filicolle* var. *benedeni*, *P. lactuca* and *P. gracile* there is a higher and variable number of intercentriolar body plates (see Table I). The absence and/or the strong reduction of the intercentriolar body could represent a synapomorphic character for these species (Hoberg *et al.* 1997, 1999, 2001; Justine 1998).

A particular characteristic found in the five Tetracyllidea previously studied is the persistence of the striated rootlets in the body of the old spermatid after the proximodistal fusion (Mokhtar-Maamouri and Świdorski 1975; Mokhtar-Maamouri 1979, 1982; Sène *et al.* 1999). This aspect is also evidenced in two Proteocephalidea namely *Proteocephalus torulosus* and *Proteocephalus longicollis* (Bruňanská *et al.* 2003a, 2004a). In the present study, striated rootlets were also observed in well-developed spermatids after the proximodistal fusion and during the migration of the nucleus.

Spermatozoon

Recently, on the basis of most important characters present in the spermatozoon, Levron *et al.* (2010) have been established seven types of spermatozoa in the eucestodes. These seven types are distinguished by the following characters: (1) the number of axonemes (one or two), (2) the parallel or spiralled pattern of cortical microtubules, (3) the parallel or spiralled pattern of the nucleus, (4) the absence or presence of crested bodies, (5) the absence or presence of a periaxonemal sheath, and (6) the absence or presence of intracytoplasmic walls.

Table I. Spermatological characters in tetraphyllidean cestodes

Families and species	Spermiogenesis			Spermatozoon					References
	Type	IB	Type	AC	CB	ArcCM	G	PSE	
Onchobothriidae									
<i>Acanthobothrium crassicolle</i>	I	1	II	+	+	+	+	Ax	present paper
<i>Acanthobothrium filicolle</i> var. <i>benedeni</i>	I	5	II		+	+	+	Ax	Mokhtar-Maamouri and Świdorski (1975)
<i>Acanthobothrium filicolle</i> var. <i>filicolle</i>	I	1	II		+	+	+	Ax	Mokhtar-Maamouri (1982)
<i>Calliobothrium verticillatum</i>			II	+	+	+	+	Ax	Quilichini <i>et al.</i> (2007)
<i>Onchobothrium uncinatum</i>	I		II		+	+	+	Ax	Mokhtar-Maamouri and Świdorski (1975)
Phyllobothriidae									
<i>Phyllobothrium gracile</i>	II	4 or 5	IV		+	+	+	N	Mokhtar-Maamouri (1979)
<i>Phyllobothrium lactuca</i>	I	3							Sène <i>et al.</i> (1999)
<i>Pseudanthobothrium hanseni</i>			IV		+	+		Ax	MacKinnon and Burt (1984)
<i>Trilocularia acanthiaevulgaris</i>			II		+	+	+	N	Mahendrasingam <i>et al.</i> (1989)

AC – apical cone, ArcCM – arc-like row of cortical microtubules, CB – crested body, G – electron-dense granules, IB – intercentriolar body (number of plates), PSE – posterior spermatozoon extremity, +, presence of considered character. Spermiogenesis types are considered according to Bâ and Marchand (1995). Spermatozoa types are considered according to Levron *et al.* (2010).

Considering this classification, within the Tetraphyllidea there are two types of spermatozoon, the type II for the species belonging to the family Onchobothriidae and the type IV for the species of the family Phyllobothriidae. Type II spermatozoon exhibits two axonemes and crested bodies, and it is also characterized by the presence of parallel cortical microtubules and parallel nucleus. Type IV spermatozoon is distinguished from type II by the presence of one axoneme and by the spiralled pattern of the nucleus (see Levron *et al.* 2010). *Acanthobothrium crassicolle* presents a type II spermatozoon as all the Onchobothriidae tetraphyllideans studied to date.

In the tetraphyllidean cestodes, there is ultrastructural data on the spermatozoon of seven species: *A. filicolle* var. *benedeni*, *A. filicolle* var. *filicolle*, *C. verticillatum*, *O. uncinatum*, *P. gracile*, *P. hanseni* and *T. acanthiaevulgaris* (Mokhtar-Maamouri and Świdorski 1975; Mokhtar-Maamouri 1979, 1982; MacKinnon and Burt 1984; Mahendrasingam *et al.* 1989 and Quilichini *et al.* 2007).

In tetraphyllideans, the apical cone was previously evidenced only in *C. verticillatum* (Quilichini *et al.* 2007). In *A. crassicolle*, the anterior spermatozoon extremity is also characterized by the presence of an electron-dense apical cone. This apical cone in *A. crassicolle* appears as a long electron-dense structure surrounded by a coiled crested body. The crested body, described for the first time in the cestodes by Mokhtar-Maamouri and Świdorski (1975), in *A. filicolle benedeni*, is present in all of the tetraphyllideans studied to date (see Table I). Bâ and Marchand (1995) and posteriorly Justine (1998, 2001) have proposed that the crested body always indicates the anterior extremity of the spermatozoon and constitutes a synapomorphy for the Eucestoda or for a part of the Eucestoda (Justine 2001).

The arc-like row of cortical microtubules present in all the studied Tetraphyllidea is located in the anterior region as oc-

curs in other groups of cestodes. This is the case of four Caryophyllidea (Arafa and Hamada 2004, Gamil 2008, Bruňanská 2009 and Yoneva *et al.* 2011), three Spathebothriidea (MacKinnon and Burt 1984, Bruňanská *et al.* 2006, Bruňanská and Poddubnaya 2010), three Trypanorhyncha (Miquel and Świdorski 2006, Miquel *et al.* 2007a, Marigo *et al.* 2011), one Bothriocephalidea (Bâ *et al.* 2007), three Diphylobothriidea (Justine 1986, Levron *et al.* 2006a, 2009), five Proteocephalidea (Bâ and Marchand 1994; Bruňanská *et al.* 2003a, b, 2004b, c) and two mesocestoidid Cyclophyllidea (Miquel *et al.* 1999, 2007b). The number of cortical microtubules forming the arc-like row in all these studies varies between three and eighteen depending on the level of section. However, in all Tetraphyllidea considered the number of microtubules forming the arc is 10.

There are two types of cortical microtubules in the mature spermatozoon of *A. crassicolle*. The microtubules that form the arc-like row are observed in the anterior part of the sperm cell, presenting a hollow centre and being more electron-dense in comparison to the other type of microtubules. The transformation of microtubules from the first to the second type occurs at the end of the crested body region. The spermatozoon of the remaining studied tetraphyllideans presents an arc-like row of cortical microtubules, but unfortunately, the quality of TEM micrographs in these works are not sufficient to elucidate if two types of cortical microtubules really exists in the male gamete of these species (Mokhtar-Maamouri and Świdorski 1975; Mokhtar-Maamouri 1979, 1982; MacKinnon and Burt 1984; Mahendrasingam *et al.* 1989 and Quilichini *et al.* 2007). Considering the remaining orders of the Eucestoda, two types of cortical microtubules have been reported in all the studied Bothriocephalidea (Świdorski and Mokhtar-Maamouri 1980; Bruňanská *et al.* 2002, 2010; Levron *et al.* 2005, 2006b, c; Bâ *et al.* 2007; Šipková *et al.* 2010, 2011), in

one Diphyllbothriidea (Justine 1986), in three Trypanorhyncha (Miquel and Świdorski 2006, Miquel *et al.* 2007a, Marigo *et al.* 2011), in four Proteocephalidea (Bruňanská *et al.* 2003a, b, 2004b, c) and in two mesocestoidids (Miquel *et al.* 1999, 2007b).

The mature spermatozoon of the five Onchobothriidae studied until now presents two axonemes of the 9 + “1” trepaxonematan pattern (see Table I). However, in the Phyllobothriidae spermatozoa present one or two axonemes. In fact, Mahendrasingam *et al.* (1989) describe two axonemes in the spermatozoon of *Trilocularia acanthiaevulgaris*, while in the remaining studied Phyllobothriidae namely *Phyllobothrium gracile* (Mokhtar-Maamouri 1979) and *Pseudanthobothrium hanseni* (MacKinnon and Burt 1984) there is only one axoneme, according to the spermatozoon pattern assigned to this family (see Levron *et al.* 2010). Such differences evidenced within the same family may cause controversies for the phylogeny of this group because the presence of a single axoneme should be considered an evolved character (Euzet *et al.* 1981). Moreover, the number of axonemes in the mature spermatozoon constitutes one of the principal characters considered by Levron *et al.* (2010) for the distinction of the Eucestoda spermatozoa.

In what refers the close relationships between genus *Acanthobothrium* and the order Proteocephalidea postulated by several authors (Olson *et al.* 2001, Waeschenbach *et al.* 2007), the ultrastructure of spermiogenesis and the mature spermatozoon show great similitudes between these taxa when the most important characters are considered. However, these similitudes exist with all the Onchobothriidae and not only with the genus *Acanthobothrium*.

Conclusion

New spermatological data concerning the Tetraphyllidea are needed, particularly for the Phyllobothriidae family. Thus, the information available to date is insufficient to confirm the spermiogenesis and spermatozoon patterns attributed to this family. In what refers the Onchobothriidae, the present study has shown that this family may be a monophyletic group, because of the many analogies detected in the onchobothriid spermatozoon structure such as the type of spermatozoon, axoneme number, crested body, arc-like row of cortical microtubules and posterior tip. These observations indicate the necessity to study more tetraphyllidean species in order to provide a better knowledge of the phylogenetic relationships in this order.

Acknowledgements. We are thankful to Lassad Neifar and Hichem Kacem from the “Département des Sciences de la Vie de la Faculté des Sciences de Sfax” (Tunisia) for their valuable help in the fieldwork. We are also grateful to Núria Cortadellas and Almudena García from the “Servei de Microscòpia, Facultat de Medicina, Centre Científic i Tecnològic de la Universitat de Barcelona (CCiTUB)” for their support in the preparation of samples. This study was partially

supported by the Spanish grants from the “Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID)” of the “Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación (MAEC)” (no. A/2390/05 and no. A/6244/06). AM Marigo benefits from MAEC-AECID doctoral grants (no. 2009-10, 0000448124 and no. 2010-11, 0000538056).

References

- Arafa S.Z., Hamada S.F. 2004. Spermatogenesis and sperm ultrastructure of the caryophyllidean cestode, *Monobothrioides chalmersius* (Woodland, 1924) Hunter, 1930. *Egypt Journal of Zoology*, 43, 49–70.
- Bâ C.T., Bâ A., Marchand B. 2007. Ultrastructure of the spermatozoon of *Bothriocephalus claviceps* (Cestoda, Pseudophyllidea): a parasite of *Anguilla anguilla* (Fish, Teleostei). *Parasitology Research*, 101, 77–83. DOI: 10.1007/s00436-006-0445-z.
- Bâ C.T., Marchand B. 1994. Ultrastructure of the spermatozoon of *Sandonella sandoni* (Cestoda, Proteocephalidea, Sandonellinae). *Invertebrate Reproduction and Development*, 25, 9–17.
- Bâ C.T., Marchand B. 1995. Spermiogenesis, spermatozoa and phyletic affinities in the Cestoda. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris*, 166, 87–95.
- Bruňanská M. 2009. Spermatological characters of the caryophyllidean cestodes *Khawia sinensis* Hsü, 1935, a carp parasite. *Parasitology Research*, 105, 1603–1610. DOI: 10.1007/s00436-009-1599-2.
- Bruňanská M. 2010. Recent insights into spermatozoa development and ultrastructure in the Eucestoda. In: (Eds. T. Lejeune and P. Delvaux) *Human spermatozoa: maturation, capacitation and abnormalities*. Nova Science Publishers Inc., New York, USA, 327–354.
- Bruňanská M., Fagerholm H.-P., Nebesářová J., Kostič B. 2010. Ultrastructure of the mature spermatozoon of *Eubothrium rugosum* (Batsch, 1786) with a re-assessment of the spermatozoon ultrastructure of *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779) (Cestoda: Bothriocephalidea). *Helminthologia*, 47, 257–263. DOI: 10.2478/s11687-010-0040-9.
- Bruňanská M., Nebesářová J., Scholz T. 2003a. Ultrastructure of the spermatozoon of the proteocephalidean cestode *Proteocephalus torulosus* (Batsch, 1786). *Parasitology Research*, 89, 345–351. DOI: 10.1007/s00436-002-0757-6.
- Bruňanská M., Nebesářová J., Scholz T., Fagerholm H.-P. 2002. Ultrastructure of the spermatozoon of the pseudophyllidean cestode *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779). *Parasitology Research*, 88, 285–291. DOI: 10.1007/s00436-001-0532-0.
- Bruňanská M., Poddubnaya L.G. 2010. Spermatological characters of the spathebothriidean tapeworm *Didymobothrium rudolphii* (Monticelli, 1890). *Parasitology Research*, 106, 1435–1442. DOI: 10.1007/s00436-010-1822-1.
- Bruňanská M., Scholz T., Dezfali B.S., Poddubnaya L.G. 2006. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Cyathocephalus truncatus* (Pallas 1781) Kessler 1868 (Cestoda: Spathebothriidae). *Journal of Parasitology*, 92, 884–892. DOI: 10.1645/GE-718R1.1.
- Bruňanská M., Scholz T., Ibraheem M.H. 2004b. Ultrastructural characters of the spermatozoon of the cestode *Corallobothrium solidum* Fritsch, 1886 (Cestoda: Proteocephalidea), a parasite of the electric catfish *Malapterurus electricus*. *Parasitology Research*, 94, 421–426. DOI: 10.1007/s00436-004-1236-z.
- Bruňanská M., Scholz T., Ibraheem M.H. 2004c. Ultrastructural particularities of the spermatozoon of the cestode *Electrotaenia malopteruri* (Fritsch, 1886) (Proteocephalidae: Gangesiinae), a parasite of *Malapterurus electricus* (Siluriformes: Ma-

- lapteruridae) from the river Nile, Egypt. *Parasitology Research*, 93, 114–120. DOI: 10.1007/s00436-004-1109-5.
- Bruňanská M., Scholz T., Nebesářová J. 2003b. Reinvestigation of the spermatozoon ultrastructure of the cestode *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800), a parasite of salmonid fish. *Parasitology Research*, 91, 357–362. DOI: 10.1007/s00436-003-0977-4.
- Bruňanská M., Scholz T., Nebesářová J. 2004a. Reinvestigation of spermiogenesis in the proteocephalidean cestode *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800). *Journal of Parasitology*, 90, 23–29. DOI: 10.1645/GE-3229.
- Caira J.N., Jensen K., Healy C.J. 1999. On the phylogenetic relationships among tetraphyllidean, lecanicephalidean and diphyllidean tapeworm genera. *Systematic Parasitology*, 42, 77–151. DOI: 10.1023/A:1006192603349.
- Caira J.N., Mega J., Ruhnke T.R. 2005. An unusual blood sequestering tapeworm (*Sanguilivator yearsleyi* n. gen., n. sp.) from Borneo with description of *Cathetocephalus resendezi* n. sp. from Mexico and molecular support for the recognition of the order Cathetocephalida (Platyhelminthes: Eucestoda). *International Journal for Parasitology*, 35, 1135–1152. DOI: 10.1016/j.ijpara.2005.03.014.
- Euzet L. 1994. Order Tetraphyllida. In: (Eds. L.F. Khalil, A. Jones and R.A. Bray) *Keys to the cestode parasites of vertebrates*. CAB International, Wallingford, UK, 149–194.
- Euzet L., Świdorski Z., Mokhtar-Maamouri F. 1981. Ultrastructure comparée du spermatozoïde des Cestodes. Relations avec la phylogénèse. *Annales de Parasitologie (Paris)*, 56, 247–259.
- Gamil I.S. 2008. Ultrastructural studies of the spermatogenesis and spermiogenesis of the caryophyllidean cestode *Wenyonia virilis* (Woodland, 1923). *Parasitology Research*, 103, 777–785. DOI: 10.1007/s00436-008-1040-2.
- Hoberg E.P., Gardner S.L., Campbell R.A. 1999. Systematics of the Eucestoda: advances toward a new phylogenetic paradigm, and observations on the early diversification of tapeworms and vertebrates. *Systematic Parasitology*, 42, 1–12. DOI: 10.1023/A:1006099009495.
- Hoberg E.P., Mariaux J., Brooks D.R. 2001. Phylogeny among orders of the Eucestoda (Cercomeromorphae): Integrating morphology, molecules and total evidence. In: (Eds. D.T.J. Littlewood and R.A. Bray) *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, 112–126.
- Hoberg E.P., Mariaux J., Justine J.-L., Brooks D.R., Weekes P.J. 1997. Phylogeny of the orders of the Eucestoda (Cercomeromorphae) based on comparative morphology: historical perspectives and a new working hypothesis. *Journal of Parasitology*, 83, 1128–1147.
- Justine J.-L. 1986. Ultrastructure of the spermatozoon of the cestode *Duthiersia fimbriata* (Pseudophyllidea, Diphyllbothriidae). *Canadian Journal of Zoology*, 64, 1545–1548.
- Justine J.-L. 1991. Phylogeny of parasitic Platyhelminthes: a critical study of synapomorphies proposed on the basis of the ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 1421–1440.
- Justine J.-L. 1995. Spermatozoal ultrastructure and phylogeny of the parasitic Platyhelminthes. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris*, 166, 55–86.
- Justine J.-L. 1998. Spermatozoa as phylogenetic characters for the Eucestoda. *Journal of Parasitology*, 84, 385–408. DOI: 10.2307/3284502.
- Justine J.-L. 2001. Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes. In: (Eds. D.T.J. Littlewood and R.A. Bray) *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, 231–238.
- Levron C., Bruňanská M., Kuchta R., Freeman M., Scholz T. 2006b. Spermatozoon ultrastructure of the pseudophyllidean cestode *Paraechinophallus japonicus*, a parasite of deep-sea fish *Pseneopsis anomala* (Perciformes, Centrolophidae). *Parasitology Research*, 100, 115–121. DOI: 10.1007/s00436-006-0224-x.
- Levron C., Bruňanská M., Marchand B. 2005. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the pseudophyllidean cestode *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781). *Parasitology Research*, 98, 26–33. DOI: 10.1007/s00436-005-0009-7.
- Levron C., Bruňanská M., Poddubnaya L.G. 2006a. Spermatological characters in *Diphyllbothrium latum* (Cestoda, Pseudophyllidea). *Journal of Morphology*, 267, 1110–1119. DOI: 10.1002/jmor.10460.
- Levron C., Bruňanská M., Poddubnaya L.G. 2006c. Spermatological characters of the pseudophyllidean cestode *Bothriocephalus scorpii* (Muller, 1781). *Parasitology International*, 55, 113–120. DOI: 10.1016/j.parint.2005.11.055.
- Levron C., Miquel J., Oros M., Scholz T. 2010. Spermatozoa of tapeworms (Platyhelminthes, Eucestoda): advances in ultrastructural and phylogenetic studies. *Biological Reviews*, 85, 523–543. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2009.00114.x.
- Levron C., Sítko J., Scholz T. 2009. Spermiogenesis and spermatozoon of the tapeworm *Ligula intestinalis* (Diphyllbothriidae): phylogenetic implications. *Journal of Parasitology*, 95, 1–9. DOI: 10.1645/GE-1646.1.
- MacKinnon B.M., Burt M.D.B. 1984. The comparative ultrastructure of spermatozoa from *Bothrimonus sturionis* Duv. 1842 (Pseudophyllidea), *Pseudanthobothrium hanseni* Baer, 1956 (Tetraphyllidea), and *Monoecocestus americanus* Stiles, 1895 (Cyclophyllidea). *Canadian Journal of Zoology*, 62, 1059–1066.
- Mahendrasingam S., Fairweather I., Halton D.W. 1989. Spermatogenesis and the fine structure of the mature spermatozoon in the free proglottis of *Trilocularia acanthiaevulgaris* (Cestoda, Tetraphyllidea). *Parasitology Research*, 75, 287–298. DOI: 10.1007/BF00931813.
- Marigo A.M., Świdorski Z., Bâ C.T., Miquel J. 2011. Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of the trypanorhynch cestode *Aporhynchus menezesi* (Aporhynchidae), a parasite of the velvet belly lanternshark *Etmopterus spinax* (Elasmobranchii: Etmopteridae). *Folia Parasitologica*, in press.
- Miquel J., Eira C., Świdorski Z., Conn D.B. 2007b. *Mesocestoides lineatus* (Goetze, 1782) (Mesocestoididae): new data on sperm ultrastructure. *Journal of Parasitology*, 93, 545–552. DOI: 10.1645/GE-1008R.1.
- Miquel J., Feliu C., Marchand B. 1999. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Mesocestoides litteratus* (Cestoda, Mesocestoididae). *International Journal for Parasitology*, 29, 499–510. DOI: 10.1016/S0020-7519(98)00202-1.
- Miquel J., Świdorski Z. 2006. Ultrastructure of the spermatozoon of *Dollfusiella spinulifera* (Beveridge and Jones, 2000) Beveridge, Neifar and Euzet, 2004 (Trypanorhyncha, Eutetrarhynchidae). *Parasitology Research*, 99, 37–44. DOI: 10.1007/s00436-005-0094-7.
- Miquel J., Świdorski Z., Neifar L., Eira C. 2007a. Ultrastructure of the spermatozoon of *Parachristianella trygonis* Dollfus, 1946 (Trypanorhyncha, Eutetrarhynchidae). *Journal of Parasitology*, 93, 1296–1302. DOI: 10.1645/GE-1193.1.
- Mokhtar-Maamouri F. 1979. Étude en microscopie électronique de la spermiogénèse et du spermatozoïde de *Phyllobothrium gracile* Wedl, 1855 (Cestoda, Tetraphyllidea, Phyllobothriidae). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 59, 245–258. DOI: 10.1007/BF00927519.
- Mokhtar-Maamouri F. 1982. Étude ultrastructurale de la spermiogénèse de *Acanthobothrium filicollae* var. *filicollae* Zschokke, 1888 (Cestoda, Tetraphyllidea, Onchobothriidae). *Annales de Parasitologie (Paris)*, 57, 429–442.

- Mokhtar-Maamouri F., Świderski Z. 1975. Étude en microscopie électronique de la spermatogénèse de deux Cestodes *Acanthobothrium filicolle benedeni* Loennberg, 1889 et *Onchobothrium uncinatum* (Rud., 1819) (Tetraphyllidea, Onchobothriidae). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 47, 269–281. DOI: 10.1007/BF00389886.
- Olson P.D., Littlewood D.T.J., Bray R.A., Mariaux J. 2001. Interrelationships and Evolution of the Tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19, 443–467. DOI: 10.1006/mpev.2001.0930.
- Quilichini Y., Foata J., Bâ C.T., Marchand B. 2007. Ultrastructure of the spermatozoon of *Calliobothrium verticillatum* (Cestoda, Tetraphyllidea, Oncobothriidae). *Acta Parasitologica*, 52, 219–224. DOI: 10.2478/s11686-007-0037-9.
- Schmidt G.D., Beveridge I. 1990. *Cathetocephalus australis* n. sp. (Cestoidea: Cathetocephalidae) from Australia, with a proposal for Cathetocephalidea n. ord. *Journal of Parasitology*, 76, 337–339.
- Sène A., Bâ C.T., Marchand B. 1999. Ultrastructure of spermiogenesis of *Phyllobothrium lactuca* (Cestoda, Tetraphyllidea, Phyllobothriidae). *Folia Parasitologica (Praha)*, 46, 191–198.
- Šípková L., Levron C., Freeman M., Scholz T. 2010. Spermiogenesis and spermatozoon of the tapeworm *Parabothriocephalus gracilis* (Bothriocephalidea): Ultrastructural and cytochemical studies. *Acta Parasitologica*, 55, 58–65. DOI: 10.2478/s11686-010-0003-9.
- Šípková L., Levron C., Oros M., Justine J.-L. 2011. Spermatological characters of bothriocephalideans (Cestoda) inferred from an ultrastructural study on *Oncodiscus sauridae* and *Senga* sp. *Parasitology Research*, in press. DOI: 10.1007/s00436-010-2215-1.
- Świderski Z., Mokhtar-Maamouri F. 1980. Étude de la spermatogénèse de *Bothriocephalus clavibothrium* Ariola, 1899 (Cestoda: Pseudophyllidea). *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 57, 323–347.
- Thiéry J.P. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *Journal of Microscopy*, 6, 987–1018.
- Waeschenbach A., Webster B.L., Bray R.A., Littlewood D.T.J. 2007. Added resolution among ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with complete small and large subunit nuclear ribosomal RNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45, 311–325. DOI: 10.1016/j.ympev.2007.03.019.
- Yoneva A., Levron C., Oros M., Orosová M., Scholz T. 2011. Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Breviscolex orientalis* (Cestoda: Caryophyllidea). *Parasitology Research*, in press. DOI: 10.1007/s00436-010-2144-z.

(Accepted March 03, 2011)

III.2. Etude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde du cestode *Aporhynchus menezesi* (Trypanorhyncha : Aporhynchidae), parasite du sagre commun, *Etmopterus spinax* (Elasmobranchii : Etmopteridae)

Résumé

La spermiogenèse et l'organisation ultrastructurale du spermatozoïde du trypanorhynque *Aporhynchus menezesi* Noever, Caira, Kuchta et Desjardins, 2010 ont été étudiées au microscope électronique à transmission. La spermiogenèse, de type I, décrite chez *A. menezesi* débute par la formation d'une zone de différenciation contenant deux centrioles, séparés par un corps intercentriolaire constitué de cinq bandes opaques aux électrons. Chaque centriole donne naissance à un flagelle libre qui croît, formant un angle de 90° avec l'expansion cytoplasmique médiane. Le noyau et les microtubules corticaux s'allongent dans le corps spermatique. Ultérieurement, les deux flagelles pivotent et fusionnent avec l'expansion cytoplasmique. A la fin de la spermiogenèse, le jeune spermatozoïde se détache du cytoplasme résiduel par un processus d'étranglement de l'anneau des membranes arquées. Le spermatozoïde mûr est filiforme, effilé à ses deux extrémités et dépourvu de mitochondrie. Il est caractérisé par la présence de deux axonèmes de type 9+1', spécifique aux Trepaxonemata, l'absence de corps en crête et la présence de microtubules corticaux et de noyau parallèles. Ce modèle correspond au type I de spermatozoïde décrit chez les eucestodes. L'extrémité antérieure du spermatozoïde est caractérisée par la présence d'un arc de sept microtubules corticaux parallèles entre eux entourant partiellement le premier axonème. Ces microtubules corticaux sont plus épais que ceux localisés dans les parties postérieures et, conséquemment, le spermatozoïde de *A. menezesi* présente deux types de microtubules corticaux. Un autre aspect intéressant est la présence de rosettes de α -glycogène. Le modèle spermatologique décrit chez *A. menezesi* est très similaire à celui observé chez les cestodes spathébothriidés et diphyllbothriidés.

Mots clés : *Aporhynchus menezesi*, Cestoda, Trypanorhyncha, Gymnorhynchoidea, Aporhynchidae, ultrastructure, spermiogenèse, spermatozoïde

Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of the trypanorhynch cestode *Aporhynchus menezesi* (Aporhynchidae), a parasite of the velvet belly lanternshark *Etmopterus spinax* (Elasmobranchii: Etmopteridae)

Adji Mama Marigo^{1,2}, Zdzisław Świdorski^{3,4}, Cheikh Tidiane Bâ⁵ and Jordi Miquel^{1,2}

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

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

³W. Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, 51/55 Twarda Street, Warsaw, Poland;

⁴Department of General Biology and Parasitology, Warsaw Medical University, Warsaw, Poland;

⁵Laboratoire de Parasitologie, Département de Biologie Animale, Faculté des Sciences, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar, Senegal

Abstract: Spermiogenesis and the ultrastructural organisation of the spermatozoon of the trypanorhynch cestode *Aporhynchus menezesi* Noever, Caira, Kuchta et Desjardins, 2010 are described by means of transmission electron microscopy. Type I spermiogenesis of *A. menezesi* starts with the formation of a differentiation zone containing two centrioles separated by an intercentriolar body constituted by five electron-dense plates. Each centriole gives rise to a free flagellum, which grows at an angle of 90° in relation to a median cytoplasmic process. The nucleus and cortical microtubules elongate along the spermatid body. Later, both flagella rotate and fuse with the median cytoplasmic process. At the final stage of spermiogenesis, the young spermatozoon is detached from the residual cytoplasm by a narrowing of the ring of arched membranes. The mature spermatozoon is a long and filiform cell, tapered at both ends, lacking mitochondria. It is characterized by the presence of two axonemes of the 9+1 trepaxonematan pattern, the absence of crested bodies, the presence of parallel cortical microtubules and nucleus. This pattern corresponds to the type I spermatozoon of the eucestodes. The anterior extremity of the spermatozoon is characterized by the presence of an arc-like row of up to seven parallel cortical microtubules that partially surrounds the first axoneme. These anterior cortical microtubules are thicker than the posterior microtubules and, consequently, the sperm cell of *A. menezesi* exhibits two types of cortical microtubules. Another interesting aspect is the presence of α -glycogen rosettes. This spermatological pattern is similar to that observed in the spathebothriidean and diphyllbothriidean cestodes.

Keywords: *Aporhynchus menezesi*, Cestoda, Trypanorhyncha, Gymnorhynchoidea, Aporhynchidae, ultrastructure, spermiogenesis, spermatozoon

Trypanorhynch cestodes are amongst the most common metazoan parasites of marine fish. Whilst adults are typically found in the stomach and intestine of sharks and rays, larval forms infect a wide variety of marine invertebrates and teleosts. This order includes marine polyzoic cestodes, which are unique in the possession of a rhyncheal apparatus. The Trypanorhyncha Diesing, 1863 is characterized by a scolex bearing two or four bothria (Jones et al. 2004) and a tentacular apparatus consisting of four retractile tentacles adorned with hooks as extensions of tentacle sheaths that are attached to four bulbs (Dollfus 1942). This complex attachment appara-

tus is unique within the cestodes, and provides a strong synapomorphy that supports the monophyly of this order (see Palm et al. 2009).

Palm (2004) recognized 254 trypanorhynch species. However, in the last years, several authors have added 25 more species to the order (see Palm et al. 2009, Noever et al. 2010). Thus, a total of 279 trypanorhynch species can be considered valid, with additional species and genera being described every year.

All these species were previously inserted into four different superfamilies (see Campbell and Beveridge 1994), namely Homeacanthoidea Dollfus, 1942, Hetera-

canthoidea Dollfus, 1942, Obothrioidea Dollfus, 1942, and Poecilacanthoidea Dollfus, 1942. However, considering characters other than the patterns of tentacle hook organisation, Palm (2004) reorganized the order Trypanorhyncha into five superfamilies and created a new family (Progrillotiidae Palm, 2004). These superfamilies are the Tentacularioidea Poche, 1926, Gymnorhynchoidea Dollfus, 1935, Lacistorhynchoidea Guiart, 1927, Obothrioidea and Eutetrarhynchoidea Guiart, 1927. The cladistic analysis also presented by Palm (2004) and based on a matrix of morphological data shows the Trypanorhyncha as a polyphyletic order. In this sense, the molecular study of Palm et al. (2009) is congruent with this condition and demonstrates that the trypanorhynchs consist of two well-supported major clades. The first clade groups the superfamily Eutetrarhynchoidea and the Tentacularioidea while the second clade groups the Gymnorhynchoidea, the Lacistorhynchoidea and the Obothrioidea.

Although the genus *Aporhynchus* Nybelin, 1918 was first placed within the family Gilquiniidae Dollfus, 1942 by Campbell and Beveridge (1994), recently this genus has been attributed to the Aporhynchidae Poche, 1926 by Palm (2004). Thus, the family Aporhynchidae contains only the genus *Aporhynchus*. However, according to Beveridge et al. (1999) a cladistic analysis of the trypanorhynch genera revealed a close relationship between the genera *Aporhynchus*, *Gilquinia* Guiart, 1927 and *Deanicola* Beveridge, 1990. Therefore the precise phylogenetic position of gilquiniid and aporhynchid species is still unclear.

In the last years the ultrastructural data on spermatology have been demonstrated to be useful to interpret the relationships of the Platyhelminthes (Euzet et al. 1981, Justine 1991, 1998, 2001, Bâ and Marchand 1995, Levron et al. 2010) and they were incorporated with morphological characters and molecular data for a better interpretation of Platyhelminthes relationships (Hoberg et al. 1997, Olson et al. 2001). There is a large amount of ultrastructural studies on eucestode species, but most of them refer to species belonging to the order Cyclophyllidea van Beneden in Braun, 1900 (see Justine 1998, 2001, Levron et al. 2010). In contrast, considering the order Trypanorhyncha, data on the ultrastructural characters of spermatozoa or spermiogenesis refer only to two lacistorhynchiids, namely *Lacistorhynchus tenuis* (van Beneden, 1858) and *Grillotia erinaceus* (van Beneden, 1858), and two eutetrarhynchids, namely *Dollfusiella spinulifera* (Beveridge et Jones, 2000) and *Parachristianella trygonis* Dollfus, 1946 (see Świdorski 1976, 1994, McKerr 1985, Miquel and Świdorski 2006, Miquel et al. 2007a). Data concerning *L. tenuis* were presented in two conferences by Świdorski (1976, 1994) while data on *G. erinaceus* were included in the unpublished PhD thesis of McKerr (1985). With respect to the eutetrarhynchids, Miquel and Świdorski (2006) and Miquel et al. (2007a) only describe

the ultrastructural organisation of the mature spermatozoon.

The aim of the present study is to describe the ultrastructure of spermiogenesis and of the mature spermatozoon of a gymnorhynchoidean trypanorhynch, *Aporhynchus menezesi* Noever, Caira, Kuchta et Desjardins, 2010, thus providing the first ultrastructural study on this superfamily and increasing the available spermatological data concerning the Trypanorhyncha.

MATERIALS AND METHODS

Live adult specimens of *A. menezesi* were collected from the spiral valve of a naturally infected velvet belly lanternshark, *Etmopterus spinax* (L.) (Elasmobranchii, Etmopteridae) captured off the Faial Island (38°31'N, 28°37'W) (Azores Archipelago, Portugal).

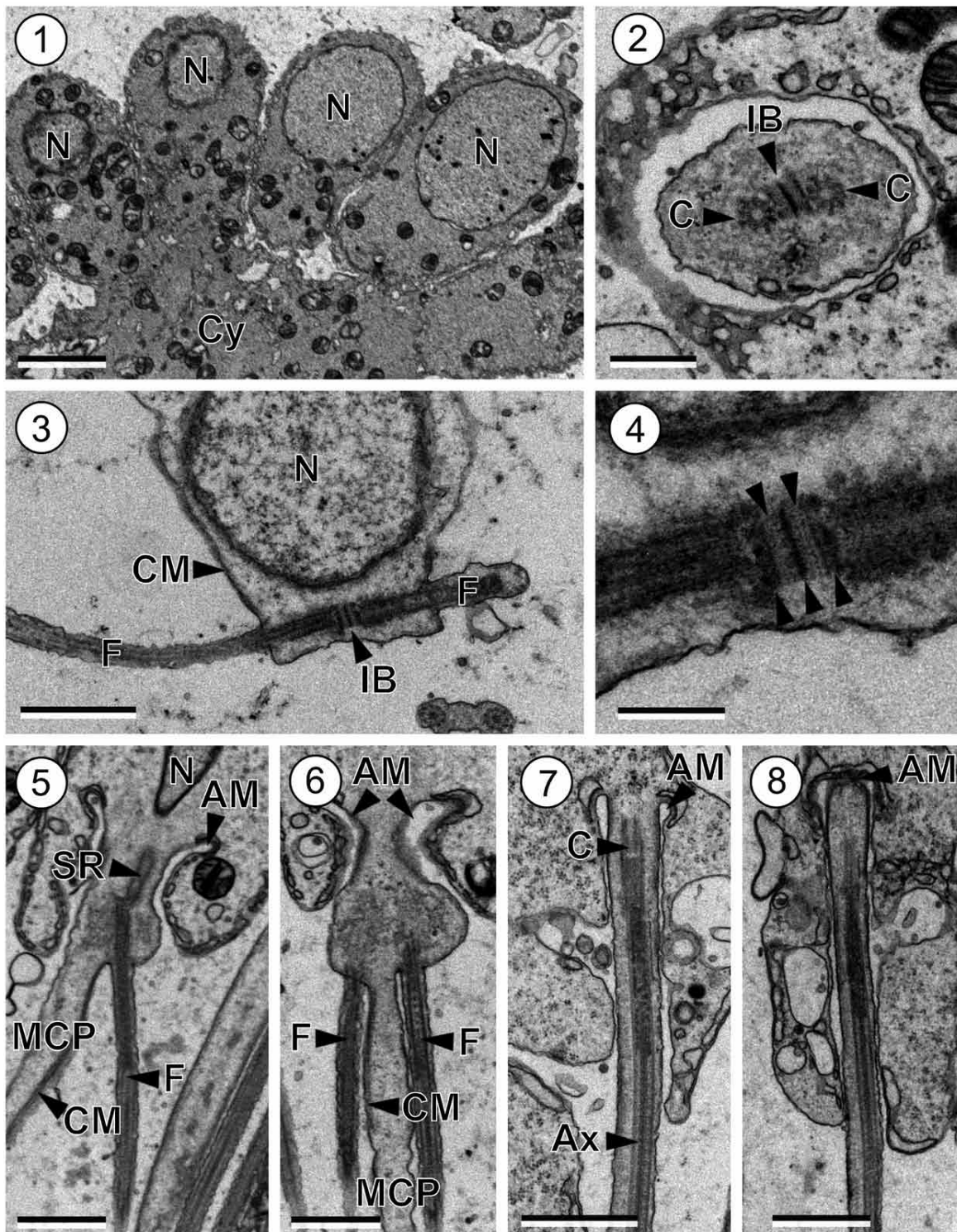
Live cestodes were first placed in a 0.9% NaCl solution and the mature proglottids were fixed in cold (4 °C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2 for a minimum of 2 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, postfixed in cold (4 °C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, dehydrated in an ethanol series and propylene oxide, and finally embedded in Spurr's resin. Ultrathin sections were obtained using a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome, placed on copper grids and double-stained with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds 1963). Ultrathin sections were examined using a JEOL 1010 TEM operated at an accelerating voltage of 80 kV.

The Thiéry (1967) technique was used for proving the presence of glycogen particles. Gold grids were treated in periodic acid, thiocarbohydrazide, and silver proteinate (PA-TCH-SP) as follows: 30 min in 10% PA, rinsed in distilled water, 24 h in TCH, rinsed in acetic solutions and distilled water, 30 min in 1% SP in the dark, and rinsed in distilled water.

RESULTS

Spermiogenesis

The sperm differentiation or spermiogenesis in *A. menezesi* starts with the formation of a rosette containing numerous peripheral spermatids attached to the central cytophore (Fig. 1). The cytoplasm of the spermatids contains a nucleus and a large, densely packed accumulation of mitochondria (Fig. 1). Later the plasma membrane of the spermatid cluster invaginates and forms the differentiation zone situated on the periphery of each spermatid (Figs. 2, 3, 9a). This is a conical protrusion bordered by cortical microtubules. It contains two centrioles interconnected by an intercentriolar body and associated with striated rootlets (Figs. 2–4, 9a). Each centriole gives rise to a flagellum, which grows externally (Figs. 3, 9b, c). The intercentriolar body is composed of five plates: a central thick electron-dense plate, one thin electron-dense plate on each side of the central plate and one thicker electron-dense plate externally on each side of the thin plates (Fig. 4). Cortical microtubules lengthen along a grow-



Figs. 1–8. Spermiogenesis of *Aporhynchus menezesi*. **Fig. 1.** Rosette showing numerous peripheral spermatids attached to the central cytophore (Cy). N – nucleus. **Fig. 2.** Cross-section of the zone of differentiation showing the two centrioles (C) and the intercentriolar body (IB). **Fig. 3.** Longitudinal section of a zone of differentiation showing the two flagella (F), the nucleus (N) and the intercentriolar body (IB). CM – cortical microtubules. **Fig. 4.** Detail of the intercentriolar body showing five electron-dense plates. **Fig. 5.** Longitudinal section of a spermatid during flagellar rotation. AM – arched membranes; CM – cortical microtubules; F – flagellum; MCP – median cytoplasmic process; N – nucleus; SR – striated roots. **Fig. 6.** Longitudinal section of a spermatid showing the two parallel flagella (F) before the proximodistal fusion. AM – arched membranes; CM – cortical microtubules; MCP – median cytoplasmic process. **Fig. 7.** Longitudinal section of a spermatid after the proximodistal fusion, showing one axoneme (Ax). AM – arched membrane; C – centriole. **Fig. 8.** Final stage of the spermiogenesis showing the strangulation of the ring of arched membranes (AM). Scale bars: Fig. 1 = 2.5 μm ; Fig. 2 = 0.5 μm ; Figs. 3, 5–8 = 1 μm ; Fig. 4 = 0.25 μm .

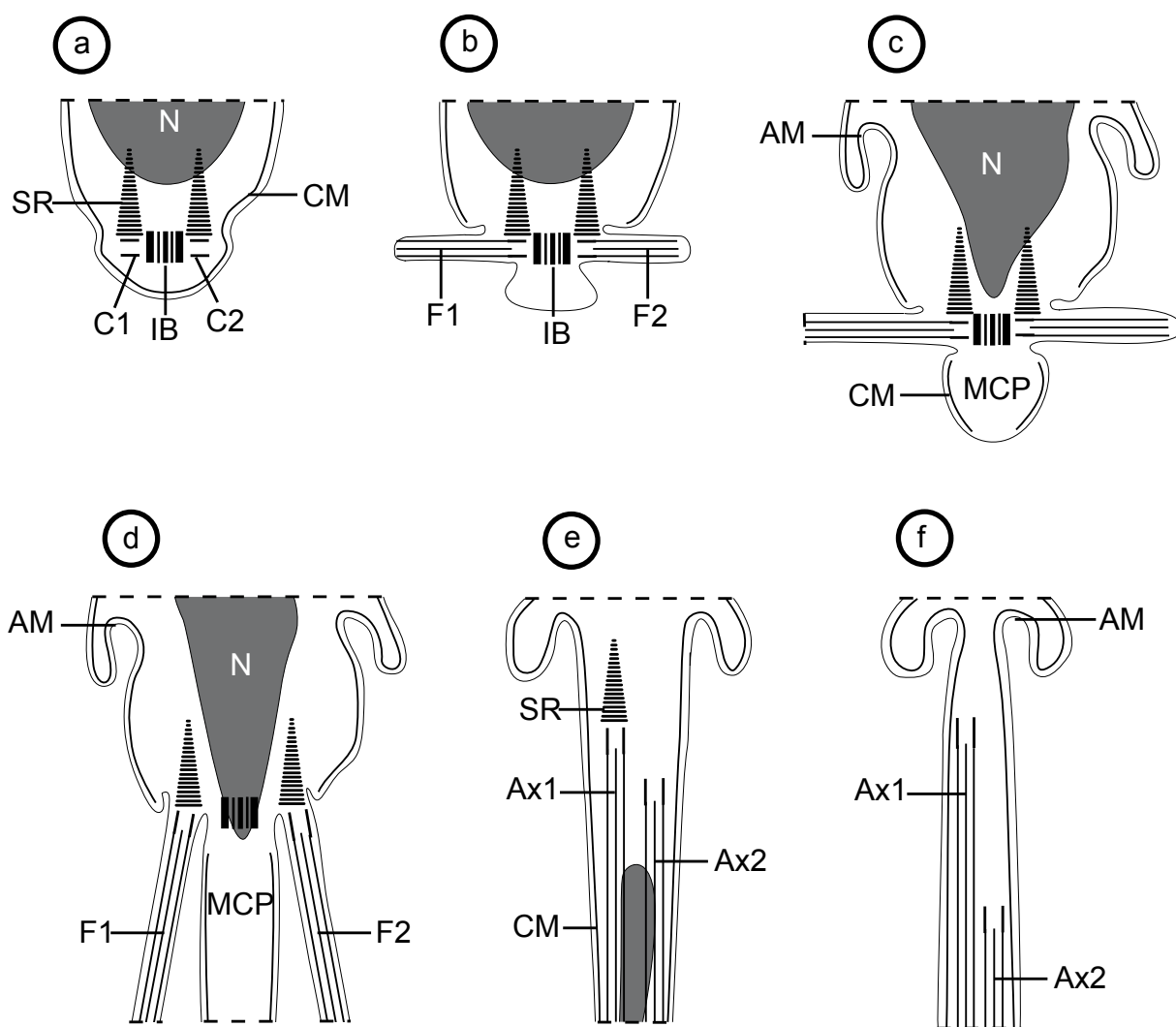


Fig. 9(a-f). Schematic drawing showing the main stages of spermiogenesis of *Aporhynchus menezesi*. AM – arched membranes; Ax1 – axoneme 1; Ax2 – axoneme 2; C1 – centriole 1; C2 – centriole 2; CM – cortical microtubules; F1 – flagellum 1; F2 – flagellum 2; IB – intercentriolar body; MCP – median cytoplasmic process; N – nucleus; SR – striated rootlets.

ing median cytoplasmic process. The nucleus initiates its elongation and the flagella undergo a 90° rotation (Figs. 3, 5, 6, 9c, d) becoming parallel to the median cytoplasmic process (Figs. 6, 9d). The flagella rotation is followed by their proximodistal fusion with the median cytoplasmic process (Figs. 7, 9e). Finally, the ring of arching membranes is strangled and the young spermatozoon is detached from the residual cytoplasm (Figs. 8, 9f).

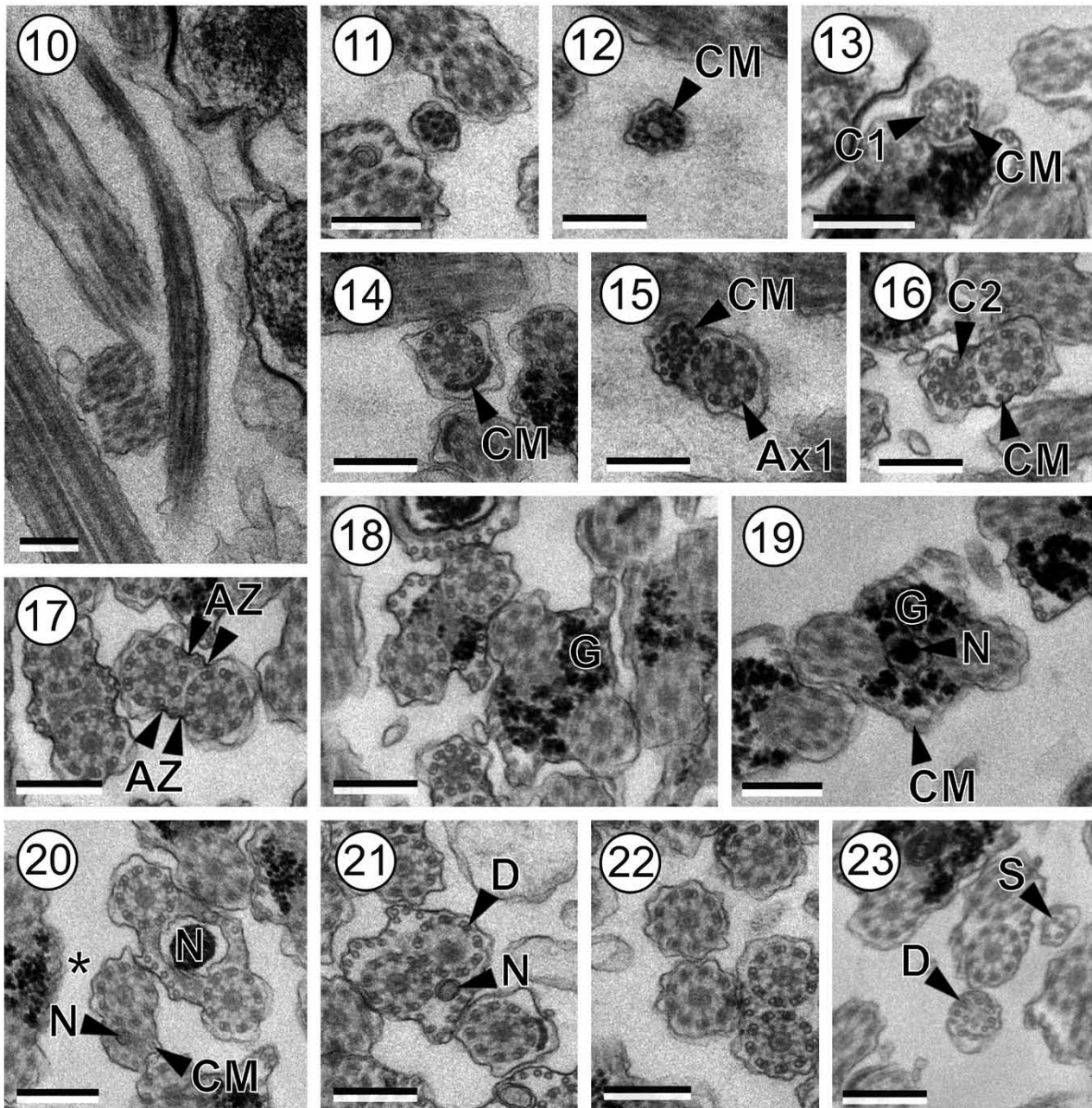
Spermatozoon

The observation of numerous longitudinal and cross-sections has enabled us to establish four (I–IV) different regions in the mature spermatozoon of *A. menezesi*. It is a long filiform cell, tapered at both ends, which lacks mitochondria and crested body. The cytoplasm contains two axonemes of different lengths of the 9+‘1’ pattern of trepaxonematan Platyhelminthes, a parallel nucleus,

α -glycogen rosettes and two types of cortical microtubules: the first type refers to microtubules that exhibit an opaque electron-dense centre and the second type refers to microtubules that exhibit a hollow centre.

Region I (Figs. 10–14, 25I) constitutes the anterior extremity of the spermatozoon. The anterior tip contains four to seven thick and electron-dense cortical microtubules (Figs. 10, 11) that later form a semi-arc beneath the plasma membrane partially surrounding the first centriole (Figs. 12, 13) and also the proximal areas of the first axoneme (Fig. 14).

Region II (Figs. 15–18, 24, 25II) constitutes the prenuclear area of the spermatozoon containing two axonemes. At the end of region I, the semicircle of electron-dense cortical microtubules is interrupted by scattered tubular elements (Fig. 15), indicating the appearance of the second axoneme. Later the second centriole emerges, mate-



Figs. 10–23. Mature spermatozoon of *Aporhynchus menezesi*. **Fig. 10.** Longitudinal section of Region I near the anterior spermatozoon extremity. **Figs. 11, 12.** Cross-sections of the anterior part of Region I showing the electron-dense microtubules (CM). **Fig. 13.** Cross-section showing the appearance of the first centriole (C1). CM – cortical microtubules. **Fig. 14.** Cross-section of Region I at the level of the first axoneme showing the arc-like row of electron-dense cortical microtubules (CM). **Figs. 15, 16.** Cross-sections of anterior areas of Region II showing the first axoneme (Ax1) and the appearance of the second centriole (C2). CM – cortical microtubules. **Fig. 17.** Cross-section of Region II illustrating the presence of two pairs of attachment zones (AZ). **Fig. 18.** Cross-sections of Region II showing the appearance of granules of glycogen (G). **Fig. 19.** Cross-section of Region III showing the nucleus (N). CM – cortical microtubules; G – granules of glycogen. **Fig. 20.** Micrograph of the nuclear area showing a cross-section located before and another cross-section located after (*) the disorganisation of one of the axonemes. CM – cortical microtubules; N – nucleus. **Fig. 21.** Cross-section of Region III at the beginning of the disappearance of the central core of one of the axonemes. D – doublets; N – nucleus. **Fig. 22.** Cross-sections of Region IV showing the axoneme surrounded by the plasma membrane. **Fig. 23.** Cross-sections of Region IV near the posterior spermatozoon extremity. D – doublets; S – singlets. Scale bars: Fig. 10 = 0.5 μm; Figs. 11–23 = 0.25 μm.

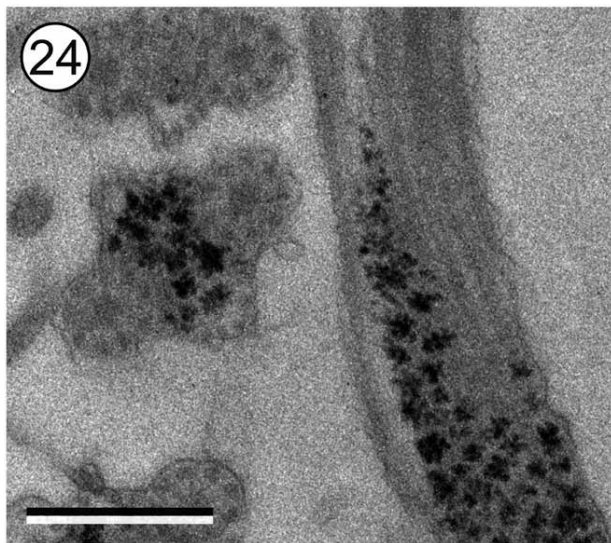


Fig. 24. Cross- and longitudinal sections of the mature spermatozoon of *Aporhynchus menezesi* showing rosettes of α -glycogen evidenced by Thiéry staining. Scale bar = 0.5 μ m.

rialized by the appearance of nine centriolar doublets in the cytoplasm (Fig. 16). At this level the presence of the hollow-centre cortical microtubules is observed (Figs. 17, 18). They are distributed in two opposite fields and their quantity progressively increases (Figs. 17, 18). A narrow cytoplasmic bridge connects the axonemes in some spermatozoa (Fig. 17) and the attachment zones are also observed at this stage (Fig. 17). Later, two opposite rows of cortical microtubules are situated under the plasma membrane (Figs. 17, 18). The granules of glycogen, in the form of α -glycogen rosettes, appear progressively as the spermatozoon section enlarges (Figs. 18, 24).

Region III (Figs. 19–21, 25III) constitutes the nuclear area of the spermatozoon. In cross-sections, the nucleus is oval to circular, situated centrally between the axonemes (Figs. 19, 20). It contains strands of fine fibrillar material and enlarges gradually towards the posterior end. In the first part, this region also encloses two axonemes, cortical microtubules, and a large amount of glycogen (Fig. 19). Later the presence of glycogen gradually decreases (Fig. 20). The nuclear region is the area of the spermatozoon that contains the maximum number of cortical microtubules arranged in two parallel fields (Figs. 19–21). Subsequently, one of the axonemes loses its central element (Fig. 21); doublets disorganize and transform into singlets, which finally disappear. The posterior part of the nuclear region contains only one axoneme, the nucleus and some cortical microtubules (Fig. 20).

Region IV (Figs. 22, 23, 25IV) constitutes the postnuclear area of the spermatozoon. This is the posterior end and contains the axoneme surrounded by cytoplasmic membrane (Fig. 22). This single axoneme later disorganizes and disappears at the level of the posterior tip of the sperm cell (Fig. 23).

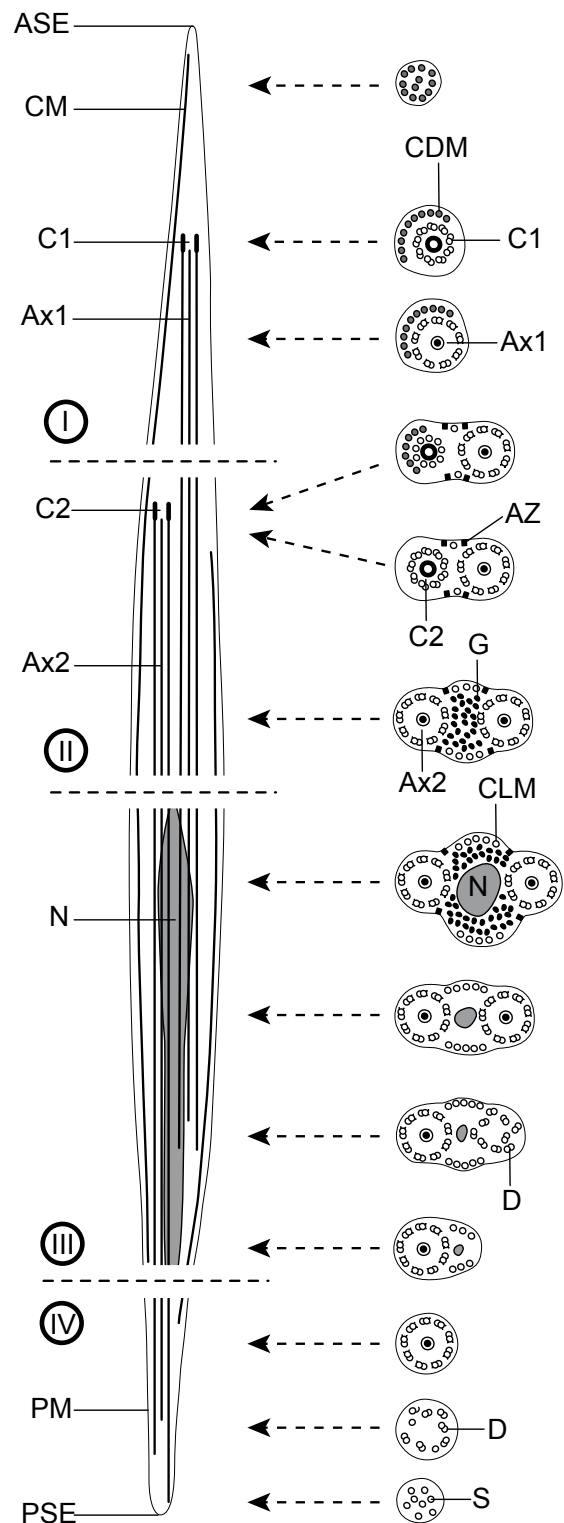


Fig. 25(I–IV). Schematic drawing showing the ultrastructural organisation of the mature spermatozoon of *Aporhynchus menezesi*. ASE – anterior spermatozoon extremity; Ax1 – axoneme 1; Ax2 – axoneme 2; AZ – attachment zone; C1 – centriole 1; C2 – centriole 2; CDM – electron-dense cortical microtubules; CLM – electron-lucent cortical microtubules; D – doublets; G – α -glycogen rosette; N – nucleus; PM – plasma membrane; PSE – posterior spermatozoon extremity; S – singlets.

Table 1. Spermatological characters in trypanorhynch cestodes.

Superfamily, family and species (reference)	Spermiogenesis					Spermatozoon							
	Type	FR	PF	IB	SR	Type	ASE	AC	CB	ArcCm	AZ	G	PSE
Eutetrarhynchoidea, Eutetrarhynchidae													
<i>Dollfusiella spinulifera</i> (Miquel and Swiderski 2006)						I	CM	-	-	10	+	α, β	1Ax
<i>Parachristianella trygonis</i> (Miquel et al. 2007a)						I	CM	-	-	10	+	α, β	1Ax
Lacistorhynchoidea, Lacistorhynchidae													
<i>Lacistorhynchus tenuis</i> (Swiderski 1976, 1994)	I	+	+	5	+			-				β	
<i>Grillotia erinaceus</i> (McKerr 1985)	I	+	+	7	+			-				α, β	
Gymnorhynchoidea, Aporhynchidae													
<i>Aporhynchus menezesi</i> (present study)	I	+	+	5	+	I	CM	-	-	7	+	α	1Ax

AC – apical cone; ArcCm – number of cortical microtubules in the arc-like row; ASE – anterior spermatozoon extremity; Ax – axoneme; AZ – attachment zone; CB – crested body; CM – cortical microtubules; FR – flagellar rotation; G – type of glycogen; IB – number of plates of the intercentriolar body; PF – proximodistal fusion; PSE – posterior spermatozoon extremity; SR – striated rootlets; +/- presence/absence of character; no marked characters correspond to unknown data or requiring confirmation. Spermiogenesis and spermatozoa types are considered according to Bâ and Marchand (1995) and Levron et al. (2010), respectively.

DISCUSSION

Spermiogenesis

The process of spermiogenesis in *Aporhynchus menezesi* includes the presence of two centrioles, an intercentriolar body and two striated rootlets in the differentiation zone, flagellar rotation and proximodistal fusion. Therefore it corresponds to the basic pattern of the pseudophyllidean type of spermiogenesis described by Świderski (1986) or the type I of Bâ and Marchand (1995). Type I spermiogenesis has been reported in species belonging to the orders Spathebothriidea Wardle et McLeod, 1952, Diphyllbothriidea Kuchta, Scholz, Brabec et Bray, 2008, Bothriocephalidea Kuchta, Scholz, Brabec et Bray, 2008, Diphyllidea van Beneden in Carus, 1863, Trypanorhyncha, Tetraphyllidea Carus, 1863, and Proteocephalidea Mola, 1928 (see the reviews of Justine 1998, 2001, Bruňanská 2010, Levron et al. 2010) and was considered to be a plesiomorphic process in the eucestodes by Justine (1998). All the studied trypanorhynch cestodes exhibit this type of spermiogenesis. However, the number of plates (five or seven) forming the intercentriolar body is variable in these species (see Table 1). In fact, the number of intercentriolar body plates is seven in *G. erinaceus* (Lacistorhynchoidea) (see McKerr 1985) and five in the remaining studied species, namely *L. tenuis* (Lacistorhynchoidea) (see Świderski 1994) and *A. menezesi* (Gymnorhynchoidea) (present study).

The number of intercentriolar plates has been used in a recent phylogenetic analysis of the Eucestoda inferred both from ultrastructural data alone and from a combination of ultrastructural and morphological data (Levron et al. 2010). Within the Eucestoda, although the intercentriolar body is absent from the Tetrabothriidea and Cyclophyllidea, it is present as a single-plate body in the Lecanicephalidea Wardle et McLeod, 1952 and Proteocephalidea and as a multiplate body in the remaining orders. However, it is interesting to remark the dual condition of mesocestoidids, presenting both single and multiplate intercentriolar bodies (see Miquel et al. 1999, 2007b).

Although the type of spermiogenesis in trypanorhynch cestodes is similar to that described in the caryophyllideans, in the spathebothriideans and in certain species of the former Pseudophyllidea Carus, 1863 (see Bruňanská et al. 2001, 2006, Levron et al. 2005, 2006a, b, 2009, Bruňanská and Poddubnaya 2006, 2010, Miquel et al. 2008, Bruňanská 2009, Šípková et al. 2010), the electron-dense material appearing in initial stages of spermiogenesis in the apical region of the differentiation zone is not observed in *A. menezesi* as in the other trypanorhynch species studied to date (McKerr 1985, Świderski 1994).

Spermatozoon

No evident differences were found in the ultrastructural organisation of the spermatozoon of *A. menezesi* in comparison with the other trypanorhynch species studied to date (Świderski 1976, McKerr 1985, Miquel and Świderski 2006, Miquel et al. 2007a). The spermatozoon possesses two axonemes of the 9+‘1’ trepaxonematan pattern (Ehlers 1984) of different lengths, a parallel nucleus, parallel cortical microtubules and lacks crested body, periaxonemal sheath and transverse intracytoplasmic walls. This type of sperm's schema corresponds to the type I of Levron et al. (2010) and is found in species of the orders Spathebothriidea, Diphyllbothriidea, Haplobothriidea Joyeux et Baer, 1961 and Trypanorhyncha.

As in *Dollfusiella spinulifera* and *Parachristianella trygonis*, the anterior extremity of the spermatozoon of *A. menezesi* contains a single axoneme partially surrounded by an arc-like layer of submembranous cortical microtubules parallel to the hypothetical spermatozoon axis. Moreover, the cortical microtubules that constitute this arc-like layer are thick and their centre is electron-dense, while posterior cortical microtubules present a hollow centre. Consequently, two types of cortical microtubules can be considered in the spermatozoon of these trypanorhynchs (Miquel and Świderski 2006, Miquel et al. 2007a, Levron et al. 2010).

This arc-like row of cortical microtubules has been observed in the anterior part of the spermatozoon of numer-

ous eucestodes, but there is variability in their aspect and number. In trypanorhynch species the number of cortical microtubules forming this arc-like layer varies from seven to ten microtubules. Thus, *D. spinulifera* and *P. trygonis* present an arc-like row constituted by ten microtubules (Miquel and Świdorski 2006, Miquel et al. 2007a) whereas in *A. menezesi* the maximal number is seven (see Table 1).

Anterior spermatozoon extremities showing a similar arrangement of cortical microtubules describing an arc-like layer were found in the Caryophyllidea (Gamil 2008, Bruňanská 2009), Spathebothriidea (Bruňanská et al. 2006, Bruňanská and Poddubnaya 2010), Diphyllbothriidea (Justine 1986, Levron et al. 2006a, 2009), Bothriocephalidea (Bruňanská et al. 2002, Levron et al. 2006c, Bâ et al. 2007), Diphyllidea (Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88), Tetrphyllidea (Mokhtar-Maamouri and Świdorski 1975, 1976, Mokhtar-Maamouri 1979, 1982, Mahendrasingam et al. 1989), Proteocephalidea (Bruňanská et al. 2003a, b, 2004a, b), and in the mesocestoidid cyclophyllideans (Miquel et al. 1999, 2007b). However, the arc-like layer of thicker cortical microtubules described in the trypanorhynchs also occurs only in the former pseudophyllideans, in the tetrphyllideans, in the proteocephalideans and in the mesocestoidids.

However, particular aspects of this character are described in the anterior spermatozoon extremity of four bothriocephalidean cestodes. These are *Bothriocephalus scorpii* (Muller, 1781), in which Levron et al. (2006b) describe up to three arc-like layers of cortical microtubules, *Triaenophorus nodulosus* Pallas, 1791 (see Levron et al. 2005), which possesses a layer of microtubules in a spiral pattern forming one and a half open circles around the axoneme, and *Bothriocephalus clavibothrium* Ariola, 1899 and *Parabothriocephalus gracilis* Yamaguti, 1934 (see Świdorski and Mokhtar-Maamouri 1980, Šípková et al. 2010), which present a complete ring of cortical microtubules. Moreover, in the Proteocephalidea, two additional species, namely *Nomimoscolex* sp. and *Sandonella sandoni* (Lynsdale, 1960), possess two arc-like layers of cortical microtubules (see Bâ and Marchand 1994, Sène et al. 1997).

The presence of crest-like body or bodies in the anterior spermatozoon extremity has been postulated as a synapomorphy for the eucestodes (Bâ and Marchand 1995). In contrast to bothriocephalideans, tetrphyllideans, proteocephalideans, tetrbothriideans and cyclophyllideans, no crested body is present in the spermatozoon of caryophyllideans, spathebothriideans, diphyllbothriideans and haplobothriideans (see Levron et al. 2010) as occurs in all the trypanorhynchs studied to date (see Table 1). Thus, the present work confirms the absence of this structure in the sperm cell of trypanorhynch cestodes and supports the idea that crest-like bodies are a synapomorphic character only for a part of the Eucestoda and not for the whole group (Justine 1998).

The two pairs of electron-dense attachment zones, visible in the median cytoplasmic process during spermiogenesis in numerous Platyhelminthes, mark the lines of proximodistal fusion between the median cytoplasmic process and the axonemes. These attachment zones persist in mature digenean spermatozoa (e.g. Miquel et al. 2006, Quilichini et al. 2010), but they are generally absent in the mature spermatozoa of the Eucestoda. To our knowledge, in the mature sperm cell of cestodes these submembranous structures have been observed only in some diphyllbothriidean, bothriocephalidean and trypanorhynch species (Bruňanská et al. 2002, Levron et al. 2006a, b, c, 2009, Miquel and Świdorski 2006, Miquel et al. 2007a). In fact, the attachment zones are also still present in the *A. menezesi* spermatozoon and their presence is probably a consequence of the proximodistal fusion.

According to the Thiéry's test, glycogen is present in the mature spermatozoon of *A. menezesi*. In the trypanorhynch species studied to date, the presence of two types of glycogen granules (α , β) has been demonstrated only in *D. spinulifera*, *P. trygonis* and *G. erinaceus* (McKerr 1985, Miquel and Świdorski 2006, Miquel et al. 2007a), while in *L. tenuis* (Świdorski 1994) and *A. menezesi* (present study) only one type of glycogen granules was found: the former species presents β -glycogen particles and the latter α -glycogen rosettes.

As in *D. spinulifera* and *P. trygonis* (see Miquel and Świdorski 2006, Miquel et al. 2007a), the posterior part of the spermatozoon of *A. menezesi* possesses one axoneme, which becomes disorganized towards the extremity of the cell. This pattern of posterior extremity is very common in the spermatozoon of the Eucestoda (e.g. Bruňanská et al. 2003b, Levron et al. 2005, 2009, Bruňanská 2009). However, in the eucestodes the posterior spermatozoon extremity may present different ultrastructural organisations: those formed by only a nucleus (e.g. Bruňanská et al. 2006, Levron et al. 2006a, b) or by a posterior electron-dense material usually containing cortical microtubules (e.g. Miquel and Marchand 1998, Miquel et al. 2009, 2010). The latter is particularly frequent in the sperm cell of cyclophyllidean cestodes.

Conclusion

The analysis of spermatological characters of all studied trypanorhynch species allowed discussing the phyletic relationships of trypanorhynchs based on molecular data. According to Palm et al. (2009), molecular evidence demonstrates that trypanorhynchs consist of two well-supported major clades (see introduction). However, considering two lacistorhynchoideans (*L. tenuis* and *G. erinaceus*) and one gymnorhynchoidean (*A. menezesi*) belonging to the same clade, their spermatological characters emphasize only a few similarities (see Table 1). On the other hand, the comparison of spermatozoa of both eutetrarhynchoideans *D. spinulifera* and *P. trygonis* with those of the gymnorhynchoidean *A. menezesi* reveals a high degree of

similarity between them, although they are placed in different clades. In conclusion, on the basis of the current spermatological knowledge, we are not able to explain the polyphyletic condition of the Trypanorhyncha. Subsequently, other spermatological studies focussing on species of different families are required to further elucidate this question.

Finally, it is interesting to reveal that spermatological features, specially the basic pattern of the spermatozoon, show resemblances between trypanorhynch, spathebothriidean and diphyllbothriidean cestodes, as recently emphasized by Levron et al. (2010) according to both spermatological and morphological characters.

Acknowledgements. This work was partially supported by funds from NSF PBI award Nos. DEB 0818696 and 0818823 to Janine N. Caira, Timothy J. Littlewood, Jean Mariaux, and Kirsten Jensen. Authors wish to thank the “Serveis Científicotècnics” of the University of Barcelona for their support in the preparation of samples. Adji Mama Marigo benefits from a MAEC-AECID doctoral grant (2009–10 0000448124).

REFERENCES

- AZZOUZ-DRAOUI N., MOKHTAR-MAAMOURI F. 1986/88: Ultrastructure comparée de la spermiogenèse et du spermatozoïde de *Echinobothrium affine* Diesing, 1863 et *E. harfordi* Mac Vicar, 1976 (Cestoda, Diphyllidae). Bull. Soc. Sci. Nat. Tunis 18: 9–20.
- BÀ C.T., BÀ A., MARCHAND B. 2007: Ultrastructure of the spermatozoon of *Bothriocephalus claviceps* (Cestoda, Pseudophyllidae): a parasite of *Anguilla anguilla* (Fish, Teleostei). Parasitol. Res. 101: 77–83.
- BÀ C.T., MARCHAND B. 1994: Ultrastructure of the spermatozoon of *Sandonella sandoni* (Cestoda, Proteocephalidae, Sandonellinae). Invertebr. Reprod. Dev. 25: 9–17.
- BÀ C.T., MARCHAND B. 1995: Spermiogenesis, spermatozoa and phyletic affinities in the Cestoda. Mém. Mus. Natl. Hist. Nat. 166: 87–95.
- BEVERIDGE I., CAMPBELL R.A., PALM H.W. 1999: Preliminary cladistic analysis of genera of the cestode order Trypanorhyncha (Diesing, 1863). Syst. Parasitol. 42: 29–49.
- BRUÑANSKÁ M. 2009: Spermatological characters of the caryophyllidean cestodes *Khawia sinensis* (Hsü, 1935), a carp parasite. Parasitol. Res. 105: 1603–1610.
- BRUÑANSKÁ M. 2010: Recent insights into spermatozoa development and ultrastructure in the Eucestoda. In: T. Lejeune and P. Delvaux (Eds.), Human Spermatozoa: Maturation, Capacitation and Abnormalities. Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 327–354.
- BRUÑANSKÁ M., NEBESÁŘOVÁ J., SCHOLZ T. 2003b: Ultrastructure of the spermatozoon of the proteocephalidean cestode *Proteocephalus torulosus* (Batsch, 1786). Parasitol. Res. 89: 345–351.
- BRUÑANSKÁ M., NEBESÁŘOVÁ J., SCHOLZ T., FAGERHOLM H.P. 2001: Spermiogenesis in the pseudophyllid cestode *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779). Parasitol. Res. 87: 579–588.
- BRUÑANSKÁ M., NEBESÁŘOVÁ J., SCHOLZ T., FAGERHOLM H.P. 2002: Ultrastructure of the spermatozoon of the pseudophyllidean cestode *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779). Parasitol. Res. 88: 285–291.
- BRUÑANSKÁ M., PODDUBNAYA L.G. 2006: Spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Khawia armeniaca* (Cholodkovski, 1915). Parasitol. Res. 99: 449–454.
- BRUÑANSKÁ M., PODDUBNAYA L.G. 2010: Spermatological characters of the spathebothriidean tapeworm *Didymobothrium rudolphii* (Monticelli, 1890). Parasitol. Res. 106: 1435–1442.
- BRUÑANSKÁ M., SCHOLZ T., DEZFULI B.S., PODDUBNAYA L.G. 2006: Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Cyathocephalus truncatus* (Pallas, 1781) Kessler, 1868 (Cestoda: Spathebothriidae). J. Parasitol. 92: 884–892.
- BRUÑANSKÁ M., SCHOLZ T., IBRAHEEM M.H. 2004a: Ultrastructural characters of the spermatozoon of the cestode *Corallobothrium solidum* Fritsch, 1886 (Cestoda: Proteocephalidae), a parasite of the electric catfish *Malapterurus electricus*. Parasitol. Res. 94: 421–426.
- BRUÑANSKÁ M., SCHOLZ T., IBRAHEEM M.H. 2004b: Ultrastructural particularities of the spermatozoon of the cestode *Electrotaenia malopteruri* (Fritsch, 1886) (Proteocephalidae: Gangesiinae), a parasites of *Malapterurus electricus* (Siluriformes: Malapteruridae) from the river Nile, Egypt. Parasitol. Res. 93: 114–120.
- BRUÑANSKÁ M., SCHOLZ T., NEBESÁŘOVÁ J. 2003a: Reinvestigation of the spermatozoon ultrastructure of the cestode *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800), a parasite of salmonid fish. Parasitol. Res. 91: 357–362.
- CAMPBELL R.A., BEVERIDGE I. 1994: Order Trypanorhyncha Diesing, 1863. In: L.F. Khalil, A. Jones and R.A. Bray (Eds.), Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates. CAB International, Wallingford, pp. 51–148.
- DOLLFUS R.P. 1942: Études critiques sur les Tétrarhynques du Muséum de Paris. Arch. Mus. Natl. Hist. Nat. 19: 1–466.
- EHLERS U. 1984: Phylogenetisches System der Plathelminthes. Verh. Naturwiss. Ver. Hamburg (NF) 27: 291–294.
- EUZET L., ŚWIDERSKI Z., MOKHTAR-MAAMOURI F. 1981: Ultrastructure comparée du spermatozoïde des Cestodes. Relations avec la phylogénèse. Ann. Parasitol. (Paris) 56: 247–259.
- FRIGGENS M.M., DUSZYNSKI D.W. 2005: Four new cestode species from the spiral intestine of the round stingray, *Urobatis halleri*, in the northern Gulf of California, Mexico. Comp. Parasitol. 72: 136–149.
- GAMIL I.S. 2008: Ultrastructural studies of the spermatogenesis and spermiogenesis of the caryophyllidean cestode *Wenyonia virilis* (Woodland, 1923). Parasitol. Res. 103: 777–785.
- HOBERG E.P., MARIAUX J., JUSTINE J.-L., BROOKS D.R., WEEKES P.J. 1997: Phylogeny of the orders of the Eucestoda (Cercomeromorphae) based on comparative morphology: historical perspectives and a new working hypothesis. J. Parasitol. 83: 1128–1147.
- JONES M.K., BEVERIDGE I., CAMPBELL R.A., PALM H.W. 2004: Terminology of the sucker-like organs of the scolex of trypanorhynch cestodes. Syst. Parasitol. 59: 121–126.
- JUSTINE J.-L. 1986: Ultrastructure of the spermatozoon of the cestode *Duthiersia fimbriata* (Pseudophyllidae, Diphyllbothriidae). Can. J. Zool. 64: 1545–1548.
- JUSTINE J.-L. 1991: Phylogeny of parasitic Platyhelminthes: a critical study of synapomorphies proposed on the basis of the ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa. Can. J. Zool. 69: 1421–1440.
- JUSTINE J.-L. 1998: Spermatozoa as phylogenetic characters for the Eucestoda. J. Parasitol. 84: 385–408.
- JUSTINE J.-L. 2001: Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes. In: D.T.J. Littlewood and R.A. Bray (Eds.),

- Interrelationships of the Platyhelminthes. Taylor and Francis, London, pp. 231–238.
- LEVRON C., BRUŇANSKÁ M., KUČHTA R., FREEMAN M., SCHOLZ T. 2006c: Spermatozoon ultrastructure of the pseudophyllidean cestode *Paraechinophallus japonicus*, a parasite of deep-sea fish *Psenopsis anomala* (Perciformes, Centrolophidae). Parasitol. Res. 100: 115–121.
- LEVRON C., BRUŇANSKÁ M., MARCHAND B. 2005: Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the pseudophyllidean cestode *Tri-aenophorus nodulosus* (Pallas, 1781). Parasitol. Res. 98: 26–33.
- LEVRON C., BRUŇANSKÁ M., PODDUBNAYA L.G. 2006a: Spermatological characters in *Diphyllobothrium latum* (Cestoda, Pseudophyllidea). J. Morphol. 267: 1110–1119.
- LEVRON C., BRUŇANSKÁ M., PODDUBNAYA L.G. 2006b: Spermatological characters of the pseudophyllidean cestode *Bothriocephalus scorpis* (Muller, 1781). Parasitol. Int. 55: 113–120.
- LEVRON C., MIQUEL J., OROS M., SCHOLZ T. 2010: Spermatozoa of tapeworms (Platyhelminthes, Eucestoda): advances in ultrastructural and phylogenetic studies. Biol. Rev. 85: 523–543.
- LEVRON C., SITKO J., SCHOLZ T. 2009: Spermiogenesis and spermatozoon of the tapeworm *Ligula intestinalis* (Diphyllobothriidae): phylogenetic implications. J. Parasitol. 95: 1–9.
- MAHENDRASINGAM S., FAIRWEATHER I., HALTON D.W. 1989: Spermatogenesis and the fine structure of the mature spermatozoon in the free proglottis of *Trilocularia acanthiaevulgaris* (Cestoda, Tetracyphylleida). Parasitol. Res. 75: 287–298.
- MCKERR G. 1985: The fine structure and physiology of a trypanorhynch tapeworm *Grillotia erinaceus*. Unpublished PhD thesis, The Queen's University of Belfast.
- MIQUEL J., EIRA C., ŚWIDERSKI Z., CONN D.B. 2007b: *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1782) (Mesocestoididae): new data on sperm ultrastructure. J. Parasitol. 93: 545–552.
- MIQUEL J., FELIU C., MARCHAND B. 1999: Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Mesocestoides litteratus* (Cestoda, Mesocestoididae). Int. J. Parasitol. 29: 499–510.
- MIQUEL J., FORONDA P., TORRES J., ŚWIDERSKI Z., FELIU C. 2009: Ultrastructural study of the spermatozoon of *Taenia taeniiformis* (Batsch, 1786) (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae), an intestinal parasite of *Felis catus* from La Palma (Canary Islands, Spain). Parasitol. Res. 104: 1477–1483.
- MIQUEL J., FOURNIER-CHAMBRILLON C., FOURNIER P., TORRES J. 2006: Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the cranial digenean *Trogloctrema acutum* (Leuckart, 1842). J. Parasitol. 92: 441–453.
- MIQUEL J., MARCHAND B. 1998: Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Anoplocephaloides dentata* (Cestoda, Cyclophyllidea, Anoplocephalidae), an intestinal parasite of Arvicolidae rodents. J. Parasitol. 84: 1128–1136.
- MIQUEL J., ŚWIDERSKI Z. 2006: Ultrastructure of the spermatozoon of *Dollfusiella spinulifera* (Beveridge and Jones, 2000) Beveridge, Neifar and Euzet, 2004 (Trypanorhyncha, Eutetrarhynchidae). Parasitol. Res. 99: 37–44.
- MIQUEL J., ŚWIDERSKI Z., MACKIEWICZ J.S., IBRAHEEM M.H. 2008: Ultrastructure of spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Wenyonia virilis* (Woodland, 1923) with re-assessment of flagellar rotation in *Glavidacris catostomi* (Cooper, 1920). Acta Parasitol. 53: 19–29.
- MIQUEL J., ŚWIDERSKI Z., NEIFAR L., EIRA C. 2007a: Ultrastructure of the spermatozoon of *Parachristianella trygonis* Dollfus, 1946 (Trypanorhyncha, Eutetrarhynchidae). J. Parasitol. 93: 1296–1302.
- MIQUEL J., TORRES J., FORONDA P., FELIU C. 2010: Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the davaineid cestode *Raillietina micracantha* (Fuhrmann, 1909). Acta Zool. (Stocckh.) 91: 212–221.
- MOKHTAR-MAAMOURI F. 1979: Étude en microscopie électronique de la spermiogenèse et du spermatozoïde de *Phyllobothrium gracile* Weld, 1855 (Cestoda, Tetracyphylleida, Phyllobothriidae). Z. Parasitenkd. 59: 245–258.
- MOKHTAR-MAAMOURI F. 1982: Étude ultrastructurale de la spermiogenèse de *Acanthobothrium filicolle* var. *filicolle* Zschokke, 1888 (Cestoda, Tetracyphylleida, Onchobothriidae). Ann. Parasitol. (Paris) 57: 429–442.
- MOKHTAR-MAAMOURI F., ŚWIDERSKI Z. 1975: Étude en microscopie électronique de la spermatogénèse de deux Cestodes *Acanthobothrium filicolle benedenii* Loennberg, 1889 et *Onchobothrium uncinatum* (Rud., 1819) (Tetracyphylleida, Onchobothriidae). Z. Parasitenkd. 47: 269–281.
- MOKHTAR-MAAMOURI F., ŚWIDERSKI Z. 1976: Ultrastructure du spermatozoïde d'un Cestode Tetracyphylleida Phyllobothriidae, *Echeneibothrium beauchampi* Euzet, 1959. Ann. Parasitol. (Paris) 51: 673–674.
- NOEVER C., CAIRA J.N., KUČHTA R., DESJARDINS L. 2010: Two new species of *Aporhynchus* (Cestoda: Trypanorhyncha) from deep water lanternsharks (Squaliformes: Etmopteridae) in the Azores, Portugal. J. Parasitol. 96: 1176–1184.
- OLSON P.D., LITTLEWOOD D.T.J., BRAY R.A., MARIAUX J. 2001: Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). Mol. Phylogenet. Evol. 19: 443–467.
- PALM H.W. 2004: The Trypanorhyncha Diesing, 1863. PKSPL-IPB Press, Bogor, 710 pp.
- PALM H.W., WAESCHENBACH A., OLSON P.D., LITTLEWOOD D.T.J. 2009: Molecular phylogeny and evolution of the Trypanorhyncha Diesing, 1863 (Platyhelminthes: Cestoda). Mol. Phylogenet. Evol. 52: 351–367.
- QUILICHINI Y., FOATA J., JUSTINE J.-L., BRAY R.A., MARCHAND B. 2010: Spermatozoon ultrastructure of *Aponurus laguncula* (Digenea: Lecithasteridae), a parasite of *Aluterus monoceros* (Pisces, Teleostei). Parasitol. Int. 59: 22–28.
- REYNOLDS E.S. 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208–212.
- SÈNE A., BÀ C.T., MARCHAND B. 1997: Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Nomimoscolex* sp. (Cestoda, Proteocephalidea) intestinal parasite of *Claroetes laticeps* (Fish, Teleost) in Senegal. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 29: 1–6.
- ŠÍPKOVÁ L., LEVRON C., FREEMAN M., SCHOLZ T. 2010: Spermiogenesis and spermatozoon of the tapeworm *Parabothriocephalus gracilis* (Bothriocephalidea): Ultrastructural and cytochemical studies. Acta Parasitol. 55: 58–65.
- ŚWIDERSKI Z. 1976: Fine structure of the spermatozoon of *Lacistorhynchus tenuis* (Cestoda, Trypanorhyncha). Proc. 6th Eur. Congr. Electron Microsc., Jerusalem, pp. 309–310.
- ŚWIDERSKI Z. 1986: Three types of spermiogenesis in cestodes. Proc. 11th Int. Congr. Electron Microsc., Kyoto, pp. 2959–2960.
- ŚWIDERSKI Z. 1994: Spermiogenesis in the Trypanorhynchid cestode *Lacistorhynchus tenuis*. Proc. 13th Int. Congr. Electron Microsc., Paris, pp. 691–692.
- ŚWIDERSKI Z., MOKHTAR-MAAMOURI F. 1980: Étude de la spermatogénèse de *Bothriocephalus clavibothrium* Ariola, 1899 (Cestoda: Pseudophyllidea). Arch. Inst. Pasteur Tunis 57: 323–347.
- THIÉRY J.P. 1967: Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microsc. 6: 987–1018.

III.3. Etude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde de *Barsonella lafoni* de Chambrier *et al.*, 2009 (Cestoda : Proteocephalidea), parasite de *Clarias gariepinus* (Siluriformes : Clariidae)

Résumé

La spermiogenèse de *Barsonella lafoni* montre les caractéristiques typiques du type I de spermiogenèse. Elle débute par la formation d'une zone de différenciation, bordée de microtubules corticaux, contenant un noyau, délimitée en avant par un anneau de membranes arquées et prolongée en arrière par une expansion cytoplasmique médiane. Cette zone de différenciation présente aussi un matériel dense aux électrons, deux racines striées et deux centrioles séparés par un corps intercentriolaire constitué d'une seule bande. Des deux centrioles, naissent deux flagelles libres de taille inégale. Les flagelles subissent une croissance et une rotation asynchrones, deviennent parallèles à l'expansion cytoplasmique médiane avec laquelle ils fusionnent, d'avant en arrière. La fin de la spermiogenèse est marquée par un étranglement de l'anneau des membranes arquées et un détachement du jeune spermatozoïde du cytoplasme résiduel.

Le spermatozoïde mûr présente deux axonèmes de type 9+'1' caractéristique des Trepaxonemata, un corps en crête, un noyau et des microtubules corticaux parallèles, épais et fins, et des granules de glycogène. Ce modèle correspond au type II de spermatozoïde décrit chez presque tous les Proteocephalidea. L'extrémité antérieure du gamète est caractérisée par la présence d'un cône apical, entouré par le corps en crête. Les microtubules corticaux épais et parallèles forment, dans la région du centriole, un arc qui se prolonge jusqu'au niveau de l'axonème. Puis, ils se désorganisent au moment où apparaît le second axonème et deux rangées parallèles de microtubules corticaux fins apparaissent. L'extrémité postérieure est marquée par la présence de quelques microtubules corticaux. Une telle extrémité postérieure n'avait jamais été décrite auparavant chez un Proteocephalidea.

Les caractéristiques ultrastructurales de la spermiogenèse et du spermatozoïde des Proteocephalidea sont analysées et comparées entre elles.

Mots clés : spermiogenèse, spermatozoïde, ultrastructure, *Barsonella lafoni*,
Proteocephalinae, Proteocephalidae, Proteocephalidea, Cestoda



Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon of the proteocephalidean cestode *Barsonella lafoni* de Chambrier et al., 2009, a parasite of the catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Siluriformes, Clariidae)

Adji Mama Marigo^{a,b}, Céline Levron^c, Cheikh Tidiane Bâ^d, Jordi Miquel^{a,b,*}

^aLaboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, sn, E08028 Barcelona, Spain

^bInstitut de Recerca de la Biodiversitat, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 645, E08028 Barcelona, Spain

^cInstitute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

^dLaboratoire de Parasitologie, Département de Biologie animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar, Senegal

Received 20 June 2011; received in revised form 1 August 2011; accepted 1 August 2011

Corresponding editor: Sorensen.

Abstract

Spermiogenesis in the proteocephalidean cestode *Barsonella lafoni* de Chambrier et al., 2009 shows typical characteristics of the type I spermiogenesis. These include the formation of distal cytoplasmic protrusions forming the differentiation zones, lined by cortical microtubules and containing two centrioles. An electron-dense material is present in the apical region of the differentiation zone during the early stages of spermiogenesis. Each centriole is associated to a striated rootlet, being separated by an intercentriolar body. Two free and unequal flagella originate from the centrioles and develop on the lateral sides of the differentiation zone. A median cytoplasmic process is formed between the flagella. Later these flagella rotate, become parallel to the median cytoplasmic process and finally fuse proximodistally with the latter. It is interesting to note that both flagellar growth and rotation are asynchronous. Later, the nucleus enlarges and penetrates into the spermatid body. Finally, the ring of arching membranes is strangled and the young spermatozoon is detached from the residual cytoplasm.

The mature spermatozoon presents two axonemes of the 9+‘1’ trepaxonematan pattern, crested body, parallel nucleus and cortical microtubules, and glycogen granules. Thus, it corresponds to the type II spermatozoon, described in almost all Proteocephalidea. The anterior extremity of the gamete is characterized by the presence of an apical cone surrounded by the lateral projections of the crested body. An arc formed by some thick and parallel cortical microtubules appears at the level of the centriole. They surround the centriole and later the first axoneme. This arc of electron-dense microtubules disorganizes when the second axoneme appears, and then two parallel rows of thin cortical microtubules are observed. The posterior extremity of the male gamete exhibits some cortical microtubules. This type of posterior extremity has never been described in proteocephalidean cestodes. The ultrastructural features of the spermatozoon/spermiogenesis of the Proteocephalidea species are analyzed and compared.

© 2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Spermiogenesis; Spermatozoon; Ultrastructure; *Barsonella lafoni*; Proteocephalinae; Proteocephalidae; Proteocephalidea; Cestoda

*Corresponding author at: Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, sn, E08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 402 45 00; fax: +34 93 402 45 04.

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

0044-5231/\$ – see front matter © 2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.

doi:10.1016/j.jcz.2011.08.002

1. Introduction

The Proteocephalidea Mola, 1928 have been recognized as an interesting group from an evolutionary point of view, because it was supposed to include the closest relatives of the ancestors of the Cyclophyllidea van Beneden in Braun, 1900 (Rego, 1994, 1995). However, phylogenetically, they have also been regarded as a problematical group (Zehnder and Mariaux, 1999; Škeřková et al., 2001; Scholz and de Chambrier, 2003; de Chambrier et al., 2004). In fact, the systematics of Proteocephalidea is far from being suitably resolved (Rego, 1994, 1995; Zehnder and Mariaux, 1999; de Chambrier et al., 2004).

To date, there are two valid families, the Proteocephalidae La Rue, 1911 including six subfamilies (Gangesiinae Mola, 1929, Sandonellinae Khalil, 1960, Corallobothriinae Freze, 1965, Acanthotaeniinae Freze, 1963, Proteocephalinae Mola, 1929 and Marsypocephalinae Woodland, 1933) and the family Monticelliidae La Rue, 1911 also including six subfamilies (Monticelliinae Mola, 1929, Zygobothriinae Woodland, 1933, Nupeliinae Pavanelli & Rego, 1991, Ephedrocephalinae Mola, 1929, Peltidocotylinae Woodland, 1934 and Rudolphiellinae Woodland, 1935) (Rego, 1994).

Barsonella lafoni de Chambrier et al., 2009 is a recently described species belonging to the new genus *Barsonella* de Chambrier et al., 2009. This genus is included in the family Proteocephalidae and in the subfamily Proteocephalinae and occurs in a large area of Africa where it has been found in catfishes of the genus *Clarias* Scopoli, 1777.

Until now, only six species of Proteocephalidea (five Proteocephalidae and one Monticelliidae) have been subjected to ultrastructural spermatological studies (Świdorski, 1985, 1996; Bâ and Marchand, 1994; Sène et al., 1997; Bruňanská et al., 2003a,b,c, 2004a,b,c, 2005). Despite the small number of ultrastructural studies on the Proteocephalidea, some degree of incongruence has already been found among Proteocephalidea species such as the observation of a type IV spermatozoon of Levron et al. (2010) in *Sandonella sandoni* (Bâ and Marchand, 1994), contrasting with the type II spermatozoa of Levron et al. (2010) observed in the remaining species (Sène et al., 1997; Bruňanská et al., 2003a,c, 2004a,b). Therefore, further studies on the spermatology of this group are necessary in order to clarify which types of characters are representative of this group.

The present study presents new data concerning the ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of another Proteocephalidea, *B. lafoni*.

2. Materials and methods

Adult tapeworms of *B. lafoni* were collected from the intestine of the catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) caught in Tana Lake at Bahir Dar (Ethiopia). Living cestodes were placed in 0.9% NaCl solution and then fixed in

glutaraldehyde (2.5%) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, for a minimum of 2 h at 4 °C. After dissection, different portions of mature proglottids were separated, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, postfixed in cold (4 °C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, dehydrated in an ethanol series and propylene oxide, embedded in Epon, and then polymerised at 60 °C for 48 h. Ultrathin sections were obtained using a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome, placed on copper grids and double-stained with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds (1963). Ultrathin sections were examined using a Jeol 1010 transmission electron microscope in the “Centres Científics i Tecnològics” of the University of Barcelona.

The Thiéry (1967) technique was used to emphasize the presence of glycogen particles. Gold grids were treated in periodic acid, thiocarbohydrazide, and silver proteinate (PATCH-SP) as follows: 30 min in 10% PA, rinsed in distilled water, 24 h in TCH, rinsed in acetic solutions and distilled water, 30 min in 1% SP in the dark, and rinsed in distilled water.

3. Results

3.1. Spermiogenesis

Spermiogenesis in *B. lafoni* is illustrated in Figs. 1A–F, 2A–D and 3A–E.

The first clear evidence of the beginning of the spermiogenesis is the presence of the small cytoplasmic protrusion named *zone of differentiation* in the periphery of each spermatid (Fig. 1A). This zone of differentiation contains two centrioles, each associated with a pyramidal striated rootlet and separated with an intercentriolar body (Figs. 1A and B and 3A). The intercentriolar body is composed of a single electron-dense plate (Figs. 1B and 3A–C). Moreover, at this stage of spermiogenesis, the striated rootlets are situated tangentially to the long axis of the nucleus (Fig. 1A). Each centriole gives rise to a free flagellum (Figs. 1B and 3A). In the very early stage of spermiogenesis it is possible to observe an electron-dense material in the peripheral region of the zone of differentiation (Figs. 1A–C and 3A). Subsequently, a median cytoplasmic process is formed distal to the centriole region (Figs. 1D and 3B and C). In *B. lafoni*, typical striated rootlets may be occasionally accompanied by one additional striated rootlet associated to the same centriole (Fig. 1F). Both flagella grow and rotate asynchronously (Figs. 1D and E and 3B) thus becoming parallel to the longitudinal axis of the median cytoplasmic process (Fig. 2A). Arching membranes are visible at this stage of development (Fig. 2A). After the proximodistal fusion of the flagella with the median cytoplasmic process, the nucleus enlarges and begins its migration along the spermatid body (Fig. 2B). Cross-sections of late development spermatids at various levels reveal that cortical microtubules are arranged (i) as a semicircle lining the periphery in the

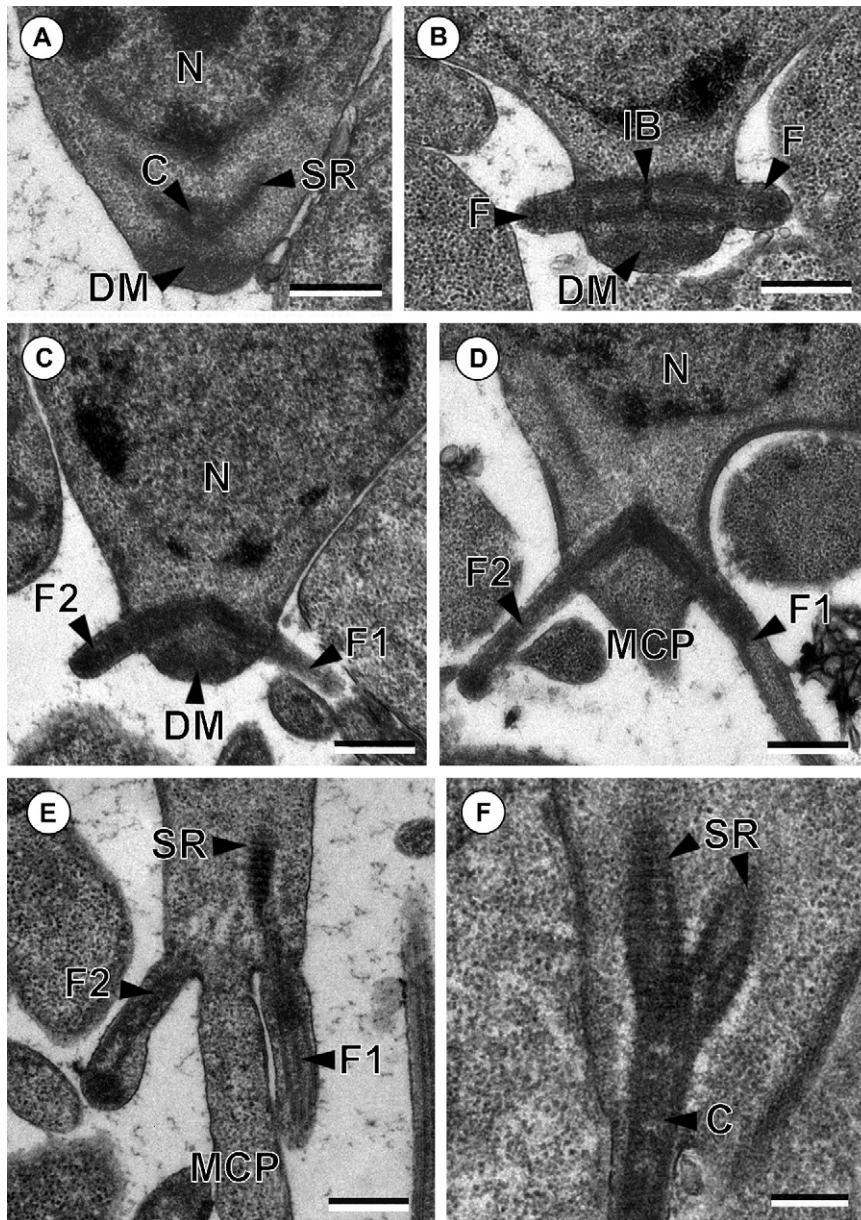


Fig. 1. (A–F) Spermiogenesis in *Barsonella lafoni*. (A) Longitudinal section of a zone of differentiation in the early stage of spermiogenesis showing the presence of a centriole (C), the nucleus (N), a striated rootlet (SR) and the dense material (DM). Scale bar = 0.5 μm . (B) Another longitudinal section of a zone of differentiation showing the growth of the two flagella (F). DM, dense material; IB, intercentriolar body. Scale bar = 0.5 μm . (C) Longitudinal section of a zone of differentiation during the flagellar rotation of the two flagella (F). DM, dense material; N, nucleus. Scale bar = 0.5 μm . (D) Longitudinal section of a zone of differentiation during the rotation of both flagella (F) showing their asynchronous growth. MCP, median cytoplasmic process; N, nucleus. Scale bar = 0.5 μm . (E) Another longitudinal section of a zone of differentiation during flagellar rotation showing the asynchronous rotation of the flagella (F). MCP, median cytoplasmic process; SR, striated rootlet. Scale bar = 0.5 μm . (F) Detail showing two striated rootlets (SR) associated to the same centriole (C). Scale bar = 0.3 μm .

proximal region containing one axoneme and (ii) in two opposite rows lining the periphery of sections with two axonemes or with one axoneme and nucleus (Fig. 2B). It is interesting to note that a striated rootlet is present in old spermatids (Fig. 2C). At the end of spermiogenesis, the ring of arching membranes narrows and the spermatid is pinched off from the residual cytoplasm (Fig. 2D).

3.2. Spermatozoon

The mature spermatozoon of *B. lafoni* is illustrated in Figs. 4A–J, 5A–E, 6I–IV and 7. It contains two axonemes of unequal length exhibiting the 9 + '1' pattern of the Trepaxonemata, a single crested body, a parallel nucleus, parallel cortical microtubules, and electron-dense granules. From the

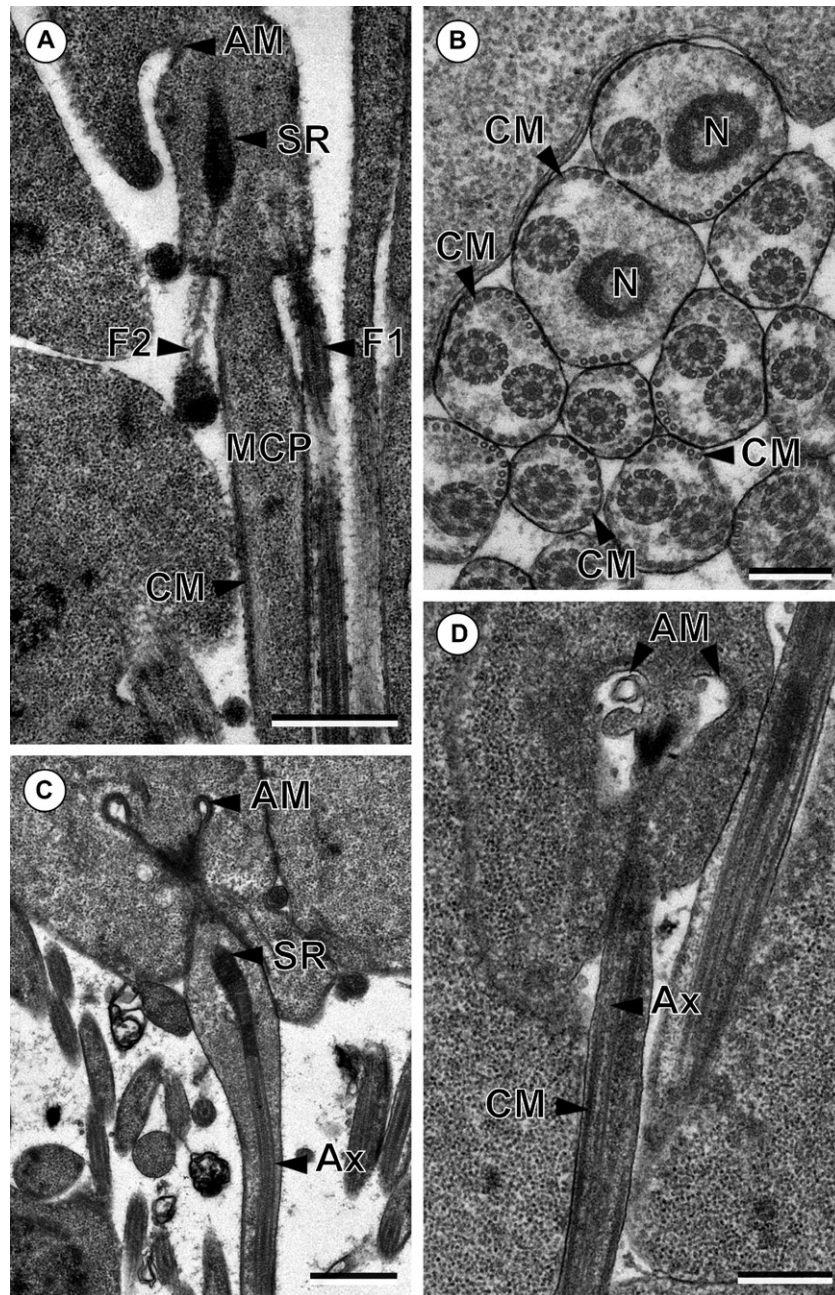


Fig. 2. (A–D) Spermiogenesis in *Barsonella lafoni*. (A) Longitudinal section of a zone of differentiation with two parallel flagella (F). Note the difference of length between the two flagella (F). AM, arched membranes; CM, cortical microtubules; MCP, median cytoplasmic process; SR, striated rootlet. Scale bar = 1 μm . (B) Several cross-sections of spermatids after proximodistal fusion showing the nucleus (N) and different types of cortical microtubules (CM). Scale bar = 0.3 μm . (C) Longitudinal section of a spermatid showing the presence of a striated rootlet (SR) in the late stage of spermiogenesis. AM, arched membranes; Ax, axoneme. Scale bar = 1 μm . (D) Longitudinal section of a spermatid in the final stage of spermiogenesis. AM, arched membrane; Ax, axoneme; CM, cortical microtubules. Scale bar = 0.5 μm .

anterior to posterior extremities of the spermatozoon, it is possible to distinguish four regions with distinctive ultrastructural characters.

Region I (Figs. 4A–G and 6I) corresponds to the anterior part of the gamete. It is characterized by the presence of an electron-dense apical cone that marks the anterior tip of the gamete (Figs. 4A and B and 6I). The apical cone is externally surrounded by a helical cord of electron-dense

material that forms a single crested body 60–90 nm thick (Fig. 4A–C). Later, the first centriole becomes visible (Fig. 4D). It marks the beginning of the first axoneme. This axoneme is surrounded by some electron-dense tubular structures arranged in an arc (Fig. 4D–F). Thus, they form the so-called arc-like row of cortical microtubules and they are thick-walled and with an electron-lucent centre (Figs. 4E and F and 6I). At the end of this region, the

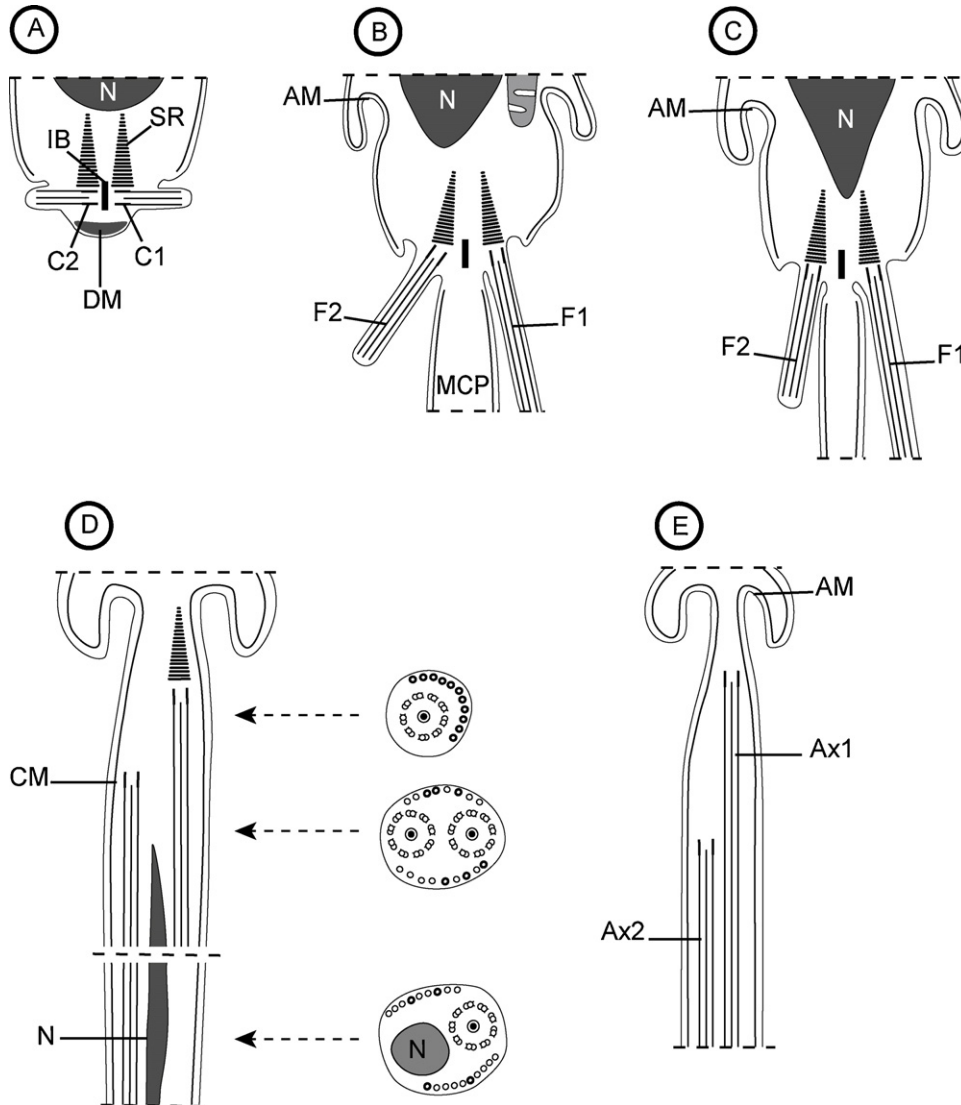


Fig. 3. (A–E) Diagram showing the main stages of spermiogenesis in *Barsonella lafoni*. (A) Early stage of spermiogenesis showing the growth of the two flagella. (B) Stage of spermiogenesis showing the asynchronous rotation of the two free flagella. (C) Stage of spermiogenesis before the proximodistal fusion of the two flagella, (D) Stage of spermiogenesis after the proximodistal fusion of the two flagella and showing the migration of nucleus. (E) Final stage of spermiogenesis. AM, arched membranes; Ax1, first axoneme; Ax2, second axoneme; C1, first centriole; C2, second centriole; CM, cortical microtubules; DM, dense material; F1, first flagellum; F2, second flagellum; IB, intercentriolar body; MCP, median cytoplasmic process; N, nucleus; SR, striated rootlet.

crested body becomes thinner and subsequently disappears (Fig. 4G).

Region II (Figs. 4H–J, 5A, 6II and 7) lacks crested body. It is characterized by the appearance of the second axoneme (Fig. 4H). At this level, nine scattered centriolar doublets are shown and the number of cortical microtubules lying beneath the plasma membrane increases (Fig. 4I). Also, it is possible to observe that cortical microtubules become thin-walled and are organized in two opposite and parallel sub-membranous layers (Figs. 4I and J and 6II). Cross-sections of this region show an increase in the width of the male gamete and the appearance of glycogen granules (Figs. 4H and J, 5A and 7).

Region III (Figs. 5A–C, 6III and 7) constitutes the nuclear region of the spermatozoon, in which two axonemes,

granules of glycogen, two fields of thin cortical microtubules and nucleus coexist. The nucleus, slightly electron-dense, exhibits a parallel disposition being localized between the two axonemes (Fig. 5A and B). This parallel disposition extends into the area with a single axoneme (Fig. 5C). Cross-sections show that the diameter of the nucleus increases towards the middle part of the region (Fig. 5B). Later one of the axonemes disorganizes and disappears (Figs. 5B and 6III) and the diameter of the nucleus decreases progressively (Fig. 5C). At the end of region III, the nucleus disappears (Fig. 6III).

Region IV (Figs. 5D–G and 6IV) contains a single axoneme, cortical microtubules, and glycogen granules. Towards the distal part of the male gamete, cross-sections

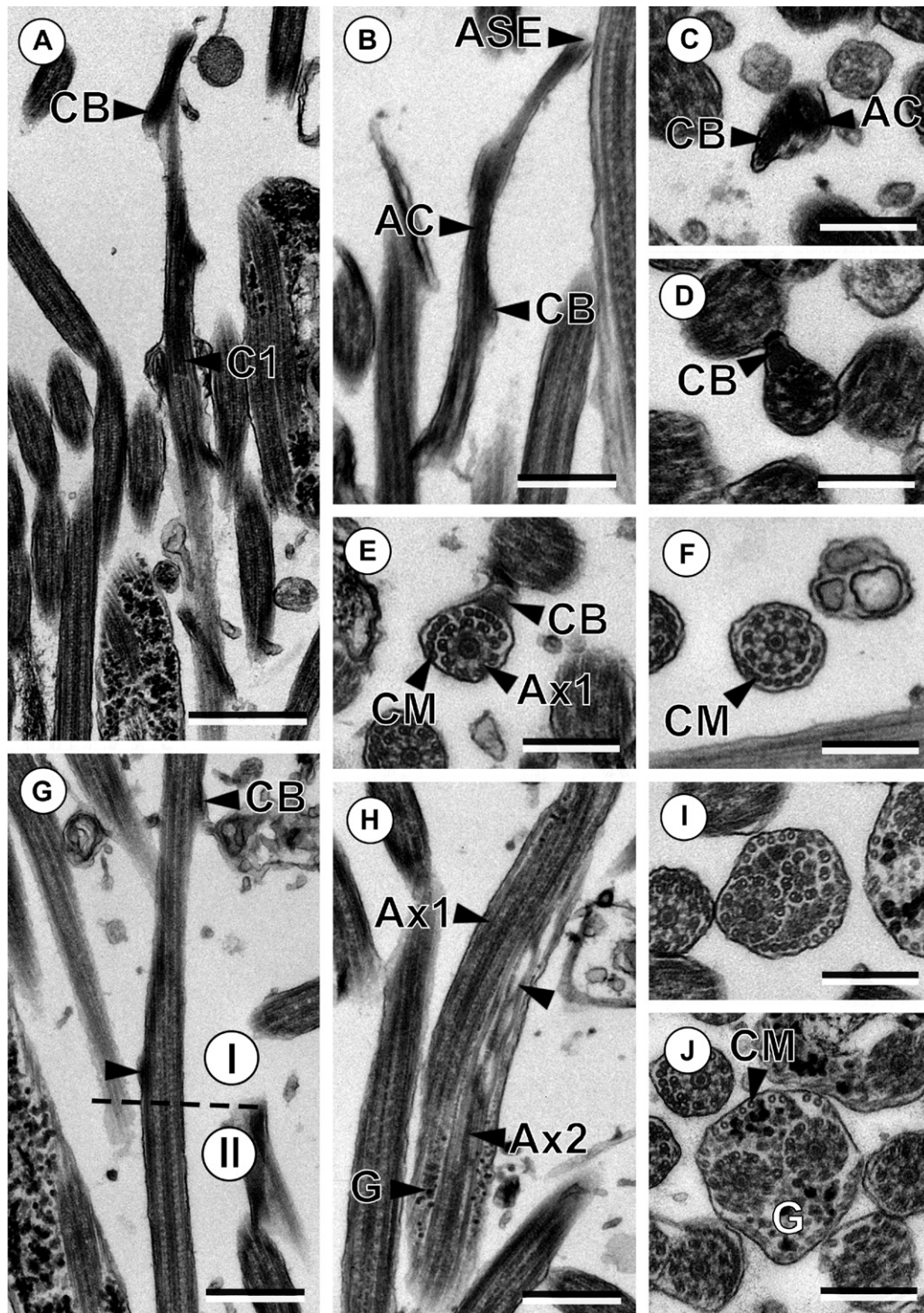


Fig. 4. (A–J) Mature spermatozoon of *Barsonella lafoni*. (A) Longitudinal section of the anterior part of the spermatozoon showing the apical cone surrounded by the crested body (CB). C1, first centriole. Scale bar = 1 μm. (B) Longitudinal section showing the anterior spermatozoon extremity (ASE). AC, apical cone; CB, crested body. Scale bar = 0.5 μm. (C–E) Consecutive cross-sections from the apical cone (AC) to the appearance of the first axoneme (Ax1). Note the presence of an arc-like row of thick cortical microtubules (CM). CB, crested body. Scale bar = 0.3 μm. (F) Cross-section of the Region II lacking crested body showing the arc-like row of cortical microtubules (CM). Scale bar = 0.3 μm. (G) Longitudinal section showing the transition area between regions I and II. Note the end of the crested body (CB) (arrowhead). Scale bar = 0.5 μm. (H) Longitudinal section showing the presence of both axonemes (Ax1 and Ax2). Note the appearance of the second axoneme (arrowhead) and the granules of glycogen (G). Scale bar = 0.5 μm. (I) Cross-section at the level of arrowhead in figure H. Scale bar = 0.3 μm. (J) Cross-sections of region II showing both axonemes, thin cortical microtubules (CM) and granules of glycogen (G). Scale bar = 0.3 μm.

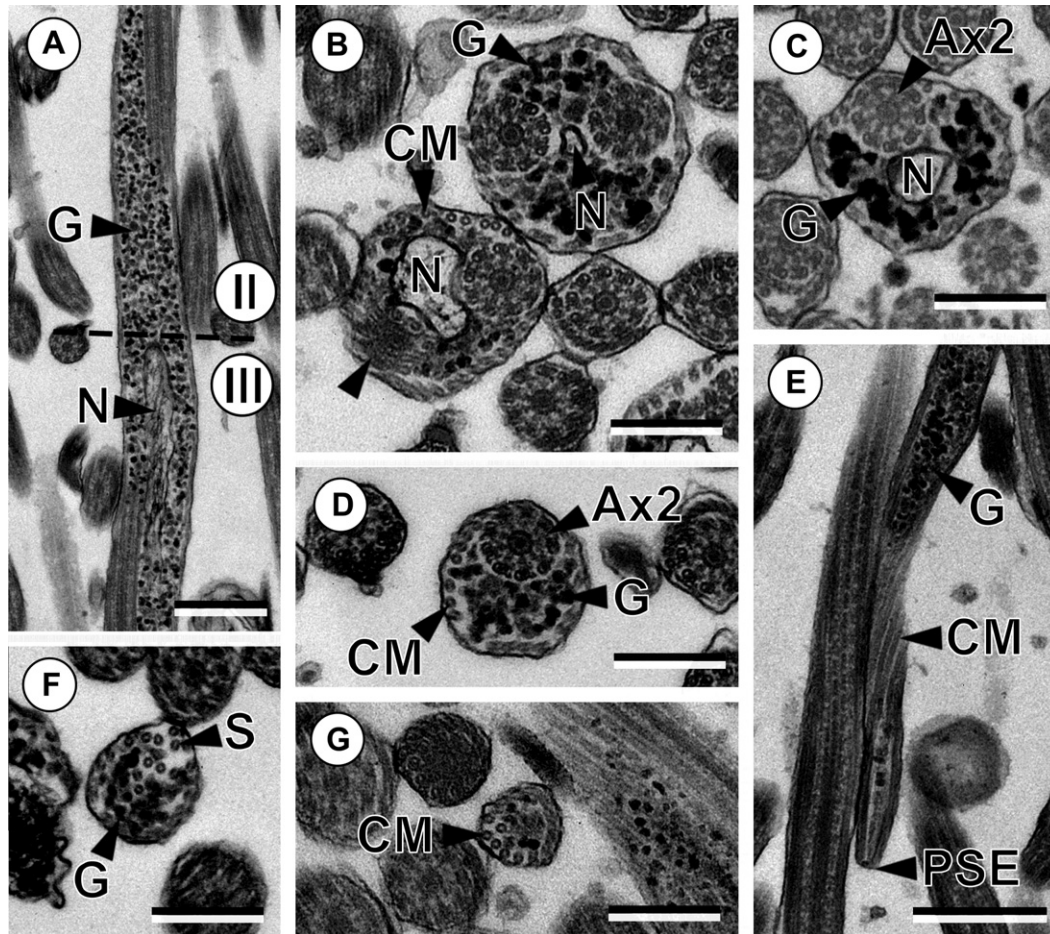


Fig. 5. (A–E) Mature spermatozoon of *Barsonella lafoni*. (A) Longitudinal section of the transition area between regions II and III. G, granules of glycogen; N, nucleus. Scale bar = 0.5 μm . (B) Two cross-sections at the nuclear area showing the increase of the nucleus (N) diameter towards the posterior end of this region. Note the disorganization of one of the axonemes in the nuclear region (arrowhead). CM, cortical microtubules; G, granules of glycogen. Scale bar = 0.3 μm . (C and D) Consecutive cross-sections of the nuclear area of region IV showing the gradual reduction of glycogen granules (G) and cortical microtubules (CM), and the disappearance of the nucleus (N) in figure D. Scale bars = 0.3 μm . (E–G) Cross and longitudinal sections of the posterior area of the male gamete. Note the progressive decrease of the glycogen amount (G) towards the posterior spermatozoon extremity (PSE) and the presence of cortical microtubules (CM) at the posterior tip. Scale bars = 0.5 μm , 0.3 μm , 0.3 μm , respectively.

show a decrease in the size of the spermatozoon (Fig. 5D). There is also a decrease in the number of cortical microtubules and granules of glycogen (Fig. 5D). In the posterior extremity of the male gamete, the axoneme becomes disorganized (Figs. 5F and G and 6IV), the number of electron-dense granules gradually decreases and only some cortical microtubules accompanied by some granules of glycogen are present in the posterior tip of the spermatozoon (Fig. 5E–G).

4. Discussion

4.1. Spermio genesis

In Proteocephalidea, spermio genesis has been studied in four species (Sène et al., 1997; Bruňanská et al., 2003b, 2004c, 2005). In the present study we verified that

spermio genesis in *B. lafoni* is in accordance with the previously described basic pattern of proteocephalideans. Spermio genesis in *B. lafoni* is characterized by the presence of two flagella, flagellar rotation, and proximo-distal fusion. This pattern corresponds to the type I spermio genesis of Bâ and Marchand (1995) and is also found in the Spathebothriidea (Bruňanská et al., 2006; Bruňanská and Poddubnaya, 2010), in the Diphyllbothriidea (Levron et al., 2006a, 2009, in press), in the Bothriocephalidea (Świdorski and Mokhtar-Maamouri, 1980; Bruňanská et al., 2001, 2010; Levron et al., 2005, 2006b; Šípková et al., 2010, 2011; Marigo et al., in press), in the Dyphyllidea (Azzouz-Draoui, 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri, 1986/88; Marigo et al., 2011a), in the Tetrphyllidea–Onchobothriidae (Mokhtar-Maamouri and Świdorski, 1975; Mokhtar-Maamouri, 1982; Marigo et al., 2011b), and in the Trypanorhyncha (Świdorski, 1976; McKerr, 1985; Marigo et al., 2011c).

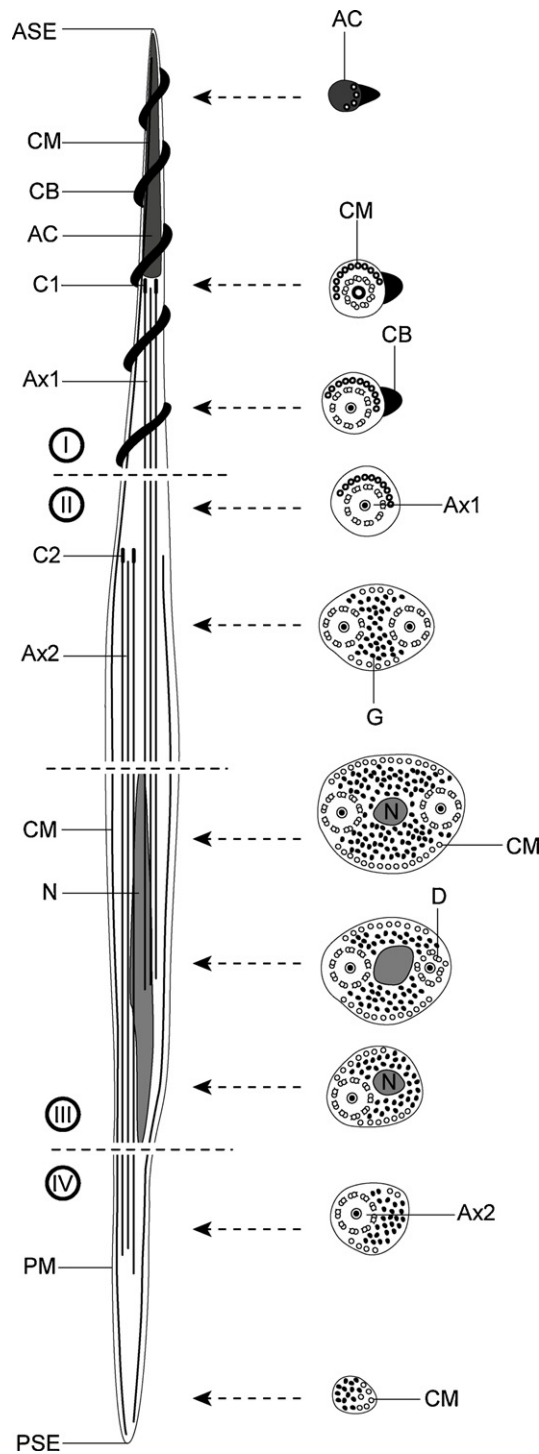


Fig. 6. (I–IV) Schematic reconstruction of the mature spermatozoon of *Barsonella lafoni*. To simplify the diagram, the granules of glycogen are not shown in the longitudinal section. (I) Anterior region of the mature spermatozoon showing the apical cone and the crested body. (II) Second region of the mature spermatozoon showing the presence of the second axoneme. (III) Nuclear region of the mature spermatozoon. (IV) Posterior region of the mature spermatozoon. AC, apical cone; ASE, anterior spermatozoon extremity; Ax1, first axoneme; Ax2, second axoneme; C1, first centriole; C2, second

In some groups exhibiting the type I spermiogenesis, a condensation of electron-dense material is observed in the apical region of the differentiation zone during the early stage of the process. This dense material was described for the first time in *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779) by Bruňanská et al. (2001) and is present in almost all the Bothriocephalidea (Bruňanská et al., 2001, 2010; Levron et al., 2005, 2006b; Šípková et al., 2010, 2011; Marigo et al., in press), in the Spathebothriidea (Bruňanská et al., 2006; Bruňanská and Poddubnaya, 2010), in the Diphyllbothriidea (Levron et al., 2006a, 2009, in press). Furthermore, electron-dense material in the apical region was also described in another group presenting type II spermiogenesis, the Caryophyllidea (Bruňanská and Poddubnaya, 2006; Miquel et al., 2008; Bruňanská, 2009; Bruňanská and Kostič, in press). The present study represents the first finding of this dense material in the spermiogenesis process of proteocephalideans. Therefore, our findings bring into question the restriction of this dense material to the basal cestodes proposed by Bruňanská and Poddubnaya (2010) on the base of available data at this time. In fact, the Proteocephalidea are considered the most closely related order to the Cyclophyllidea (Rego, 1994, 1995).

Spermiogenesis of *B. lafoni* is also characterized by the asynchronous development of the flagella resulting in the observation of two unequal flagella during spermiogenesis. A similar feature is described in other proteocephalideans such as *Nomimoscolex* sp. by Sène et al. (1997), *Proteocephalus torulosus* (Batsch, 1786) by Bruňanská et al. (2003b), and *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800) by Bruňanská et al. (2004c), in the Bothriocephalidea *E. crassum* by Bruňanská et al. (2001), in the Diphyllidea *Echinobothrium euterpes* (Neifar, Tyler and Euzet, 2001) by Marigo et al. (2011a), and in the Tetraphyllidea-Onchobothriidae *Acanthobothrium crassicolle* Weld, 1855 by Marigo et al. (2011b).

In the cestodes, the intercentriolar body usually comprises a number of parallel disc-shaped plates of different electron-densities. In *B. lafoni* as in almost all proteocephalideans the intercentriolar body consists of a single electron-dense plate (Sène et al., 1997; Bruňanská et al., 2003b, 2004c, 2005). The presence/absence of an intercentriolar body has been used as a character of phylogenetic importance in eucestodan studies (Hoberg et al., 1997; Justine, 1998, 2001). It is considered to be a plesiomorphic character within the Eucestoda (Justine, 1998).

In *B. lafoni* two striated rootlets associated to the same centriole are viewed. This feature, also mentioned in two other species belonging to the Caryophyllidea (Bruňanská and Poddubnaya, 2006) and the Diphyllbothriidea (Levron et al., 2006a), could be a character of phylogenetic importance in the future.

centriole; CB, crested body; CM, cortical microtubules; D, doublets; G, granules of glycogen; N, nucleus; PM, plasma membrane; PSE, posterior spermatozoon extremity.

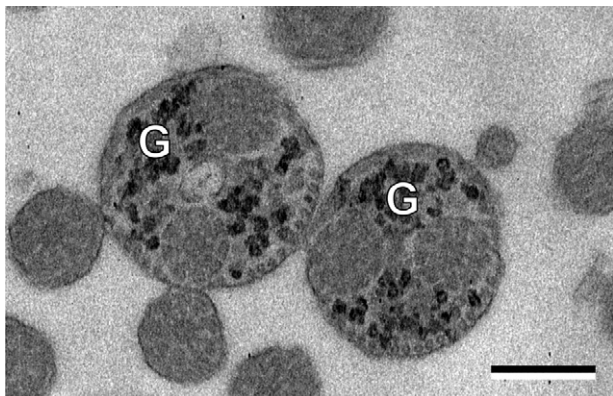


Fig. 7. Cross-sections of the spermatozoon of *Barsonella lafoni* showing the presence of glycogen evidenced by the method of Thiéry (1967). G, granules of glycogen. Scale bar = 0.3 μ m.

Another particularity in *B. lafoni* spermiogenesis is the persistence of striated rootlets in the very late spermatids. This character was already reported in other proteocephalideans such as *Corallobothrium solidum*, *P. torulosus*, *P. longicollis* and *Nomimoscolex* sp. (see Sène et al., 1997; Bruňanská et al., 2003b, 2004c, 2005). While in *C. solidum* striated rootlets disappear just after the nuclear migration into the median cytoplasmic process, in *B. lafoni* as in *P. longicollis* striated rootlets persist in old spermatids. The observation of striated rootlets during advanced stages of spermiogenesis were also reported in some Tetrphyllidea *Phyllobothrium gracile* Weld, 1855, *Acanthobothrium filicolle* Zschokke, 1887, *Phyllobothrium lactuca* van Beneden, 1850 and *A. crassicolle* Weld, 1855 (see Mokhtar-Maamouri, 1979, 1982; Sène et al., 1999; Marigo et al., 2011b) and in the Bothriocephalidea *Clestobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819) (see Marigo et al., in press). This pattern has recently been reported from an increasing number of cestode species, indicating that the power and quality of observations are improving.

4.2. Spermatozoon

The present study shows that the basic pattern of ultrastructural organization of the mature spermatozoon of *B. lafoni* is similar to that reported in other proteocephalideans (see Sène et al., 1997; Bruňanská et al., 2003a,c, 2004a,b). It exhibits the type II spermatozoon of Levron et al. (2010) that includes the presence of two axonemes, crested body, and both parallel nucleus and cortical microtubules. In spite of this classic pattern, the spermatozoon ultrastructure of *B. lafoni* presents certain remarkable aspects.

In the Proteocephalidea, ultrastructural studies have been performed on spermatozoa of only six species. These are *C. solidum*, *P. longicollis*, *P. torulosus*, *Electrotaenia malopteruri* (Fritsch, 1886), *S. sandoni* (Lynsdale, 1960) and *Nomimoscolex* sp. (see Bâ and Marchand, 1994; Sène et al., 1997; Bruňanská et al., 2003a,c, 2004a,b). Considering the six studied species, only *S. sandoni* (Bâ and Marchand, 1994)

presents a type IV spermatozoon, whereas the remaining species including *B. lafoni*, present type II spermatozoa (see Table 1).

The anterior extremity of the mature spermatozoon of *B. lafoni* is characterized by the presence of an apical cone. This electron-dense structure has previously been described in only two proteocephalideans, namely *S. sandoni* and *Nomimoscolex* sp. (Bâ and Marchand, 1994; Sène et al., 1997).

The apical cone exhibits a helical crested body, externally coiled, which describes several turns around the apical cone and reaches the level of the axoneme. The crested body represents a structure of presumed phylogenetic importance (Justine, 1998, 2001) and characterizes the anterior extremity of the spermatozoon of eucestodes (Bâ et al., 1991). According to Bâ and Marchand (1995), the presence of this structure represents a synapomorphy for the Eucestoda. However, during the last years, an increase of existing data on spermatology of eucestodes demonstrates its absence in several groups, such as caryophyllideans, spathebothriideans, diphyllbothriideans and trypanorhynch (see reviews in Bruňanská (2010), Levron et al. (2010), Bruňanská and Poddubnaya (2010), Marigo et al. (2011c) and Yoneva et al. (2011)). To date, in the Proteocephalidea, crested body or bodies have been described in all studied species (Bâ and Marchand, 1994; Sène et al., 1997; Bruňanská et al., 2003a,c, 2004a,b). Like in most proteocephalideans (see Table 1) only a single crested body was found in *B. lafoni*. The presence of this single crested body is considered a plesiomorphic condition for the Eucestoda (Justine, 1998). Nevertheless, a particular pattern has been found in *Nomimoscolex* sp., which presents three helical crested bodies in the anterior tip of the male gamete (Sène et al., 1997). The presence of several crested bodies is not commonly described in “basal” cestodes. Thus, *Nomimoscolex* sp., presents a pattern only found in Cyclophyllidea. This feature could be an interesting character to demonstrate the close relationship between Proteocephalidea and Cyclophyllidea.

One of the most interesting characteristics found in the spermatozoon of *B. lafoni* is the arrangement of tubular structures in its anterior extremity. These cortical microtubules describe a sub-membranous arc surrounding the first axoneme. This arrangement, commonly named arc-like row of cortical microtubules, has been reported in several orders of Eucestoda. These are the Caryophyllidea (Arafa and Hamada, 2004; Gamil, 2008; Bruňanská, 2009; Yoneva et al., 2011; Bruňanská and Kostič, in press), the Spathebothriidea (Bruňanská et al., 2006; Bruňanská and Poddubnaya, 2010), the Trypanorhyncha (Miquel and Świdorski, 2006; Miquel et al., 2007a; Marigo et al., 2011c), the Bothriocephalidea (Bâ et al., 2007a; Marigo et al., 2011c), the Diphyllbothriidea (Justine, 1986; Levron et al., 2006a, 2009, in press), the Tetrphyllidea (Marigo et al., 2011b), the Proteocephalidea (Bâ and Marchand, 1994; Sène et al., 1997; Bruňanská et al., 2003a,c, 2004a,b) and the Cyclophyllidea–Mesocestoididae (Miquel et al., 1999, 2007b). However, in *Nomimoscolex* sp. (Sène et al., 1997), due to the presence of three helical crested bodies, this

Table 1. Spermatological characters in the proteocephalidean cestodes.

Family, subfamily and species References	Spermiogenesis							Spermatozoon								
	Type	IB	DM	SR	FR	PF	AxN	Type	AC	CB		ArcCM	AxN	G	PSE	
										N	T					
Monticelliidae																
Zygobothriinae																
<i>Nomimoscolex</i> sp. Sène et al. (1997)	I	1	–	+	+	+	2	II	+	3	80	+	2	+	Ax	
Proteocephalidae																
Corallobothriinae																
<i>Corallobothrium solidum</i> Bruňanská et al. (2004a, 2005)	I	1	–	+	+	+	2	II	–	1	30–200	+	2	+	Ax	
Gangesiinae																
<i>Electrotaenia malopteruri</i> Bruňanská et al. (2004b)								II	–	1	60–150	+	2	+	Ax	
Proteocephalinae																
<i>Barsonella lafoni</i> Present study	I	1	+	+	+	+	2	II	+	1	60–90	+	2	+	CM	
<i>Proteocephalus longicollis</i> Świdorski (1985, 1996) Bruňanská et al. (2003a, 2004c)	I	5 or 1	–	+	+	+	2	II	–	1	60–100	+	2	+	Ax	
<i>Proteocephalus torulosus</i> Bruňanská et al. (2003b, 2003c)	I	1	–	+	+	+	2	II	–	1	80–100	+	2	+	Ax	
Sandonellinae																
<i>Sandonella sandoni</i> Bâ and Marchand (1994)								IV	+	1	50–100	+	1	+	Ax	

Spermiogenesis characters: AxN, number of axonemes; DM, dense material; FR, flagellar rotation; IB, number of plates of intercentriolar body; PF, proximodistal fusion; SR, striated rootlets. Spermatozoon characters: AC, apical cone; ArcCM, arc of cortical microtubules; AxN, number of axonemes; CB, crested body (N, number; T, thickness in nm); CM, cortical microtubules; G, glycogen; PSE, posterior spermatozoon extremity. +/–, presence/absence of character. Spermiogenesis types are considered according to Bâ and Marchand (1995). Spermatozoa types are considered according to Levron et al. (2010).

arc-like row is divided into two separated arcs. Moreover, in most bothriocephalideans a complete ring of cortical microtubules replaces this arc-like row of cortical microtubules (Świdorski and Mokhtar-Maamouri, 1980; Levron et al., 2005, 2006a,c; Bruňanská et al., 2002, 2010; Šípková et al., 2010, 2011; Marigo et al., in press).

In most cases, the cortical microtubules forming the arc-like row or the ring show a different aspect in comparison to those present in posterior areas of the male gamete. The microtubules forming the arc-like row or ring are thicker than microtubules in posterior areas of the spermatozoon and therefore two types of cortical microtubules coexist in the male cell. These two types are reported in all the species presenting an arc-like row or ring of cortical microtubules, except in the caryophyllideans. In these species presenting two types of cortical microtubules, the thick cortical microtubules are limited to the anterior region of the sperm cell, whereas the thin ones occur after the appearance of the second axoneme, if the spermatozoon exhibits two axonemes or in the posterior regions if the spermatozoon presents only one axoneme.

The disposition and aspect of the nucleus are variable among the Proteocephalidea. These facts have been reviewed by Bruňanská (2010). Thus, in *E. malopteruri* and *Nomimoscolex* sp. (Sène et al., 1997; Bruňanská et al., 2004b) the nucleus appears before the second axoneme. In *B. lafoni* as in *Nomimoscolex* sp. (Sène et al., 1997) the nucleus is rod-shaped and localized between the axonemes. In *E. malopteruri*, *C. solidum* and *S. sandoni* (Bâ and Marchand, 1994; Bruňanská et al., 2004a,b) the nucleus is roughly circular and situated at the periphery of the cell. In *P. torulosus* and *P. longicollis* (Bruňanská et al., 2003a,c), the nucleus is initially circular and located between the axonemes, and posteriorly, it becomes horseshoe-shaped.

The posterior extremity of the spermatozoon in the proteocephalidean species generally shows the disorganization of one of the axonemes (Bâ and Marchand, 1994; Sène et al., 1997; Bruňanská et al., 2003a,c, 2004a,b). In *B. lafoni*, the posterior tip of the spermatozoon shows some cortical microtubules accompanied by some granules of glycogen. This type of posterior spermatozoon extremity is described for the first time in the Proteocephalidea.

Acknowledgements

We are grateful to Mikuláš Oros and Miloslav Jirků for providing material and to Alain de Chambrier for identification of specimens. This study was supported by the Grant of the Czech Republic (project no. KJB600960813). We also thank the “Unitat de Microscòpia, Facultat de Medicina, Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB)” for their support in the preparation of samples, particularly Núria Cortadellas and Almudena García. Adji Mama Marigo benefits from doctoral grants (2009–2010 no 0000448124 and 2010–2011 no 0000538056) of “Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación, Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo MAEC-AECID”.

References

- Arafa, S.Z., Hamada, S.F., 2004. Spermatogenesis and sperm ultrastructure of the caryophyllidean cestode, *Monobothrioides chalmersius* (Woodland, 1924) Hunter, 1930. *Egypt. J. Zool.* 43, 49–70.
- Azzouz-Draoui, N., 1985. Étude ultrastructurale comparée de la spermiogenèse et du spermatozoïde de quatre Cestodes Diphyllidea. Thèse de 3ème Cycle, Université de Tunis, Tunis, Tunisie.
- Azzouz-Draoui, N., Mokhtar-Maamouri, F., 1986/88. Ultrastructure comparée de la spermiogenèse et du spermatozoïde de *Echinobothrium affine* Diesing, 1863 et *E. harfordi* Mac Vicar, 1976 (Cestoda, Diphyllidea). *Bull. Soc. Sci. Nat. Tunis* 18, 9–20.
- Bâ, C.T., Marchand, B., 1994. Ultrastructure of the spermatozoon of *Sandonella sandoni* (Cestoda, Proteocephalidea, Sandonellinae). *Invert. Reprod. Dev.* 25, 9–17.
- Bâ, C.T., Marchand, B., 1995. Spermiogenesis, spermatozoa and phyletic affinities in the Cestoda. *Mém. Mus. Natl. Hist. Nat.* 166, 87–95.
- Bâ, C.T., Marchand, B., Mattei, X., 1991. Demonstration of the orientation of the Cestodes spermatozoon illustrated by the ultrastructural study of spermiogenesis of a Cyclophylleida: *Thysaniezia ovilla*, Rivolta, 1874. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 23, 605–612.
- Bâ, C.T., Bâ, A., Marchand, B., 2007. Ultrastructure of the spermatozoon of *Bothriocephalus claviceps* (Cestoda, Pseudophyllidea): a parasite of *Anguilla anguilla* (Fish, Teleostei). *Parasitol. Res.* 101, 77–83.
- Bruňanská, M., 2009. Spermatological characters of the caryophyllidean cestodes *Khawia sinensis* Hsü, 1935, a carp parasite. *Parasitol. Res.* 105, 1603–1610.
- Bruňanská, M., 2010. Recent insights into spermatozoa development and ultrastructure in the Eucestoda. In: Lejeune, T., Delvaux, P. (Eds.), *Human Spermatozoa: Maturation, Capacitation and Abnormalities*. NOVA Science Publishers, Inc., New York, pp. 327–354.
- Bruňanská, M., Kostič, B. Revisiting caryophyllidean type of spermiogenesis in the Eucestoda based on spermatozoon differentiation and ultrastructure of *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781). *Parasitol. Res.*, in press.
- Bruňanská, M., Poddubnaya, L.G., 2006. Spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Khawia armeniaca* (Cholodkovski, 1915). *Parasitol. Res.* 99, 449–454.
- Bruňanská, M., Poddubnaya, L.G., 2010. Spermatological characters of the spathebothriidean tapeworm *Didymobothrium rudolphii* (Monticelli, 1890). *Parasitol. Res.* 106, 1435–1442.
- Bruňanská, M., Nebesářová, J., Scholz, T., Fagerholm, H.P., 2001. Spermiogenesis in the pseudophyllid cestode *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779). *Parasitol. Res.* 87, 579–588.
- Bruňanská, M., Nebesářová, J., Scholz, T., Fagerholm, H.P., 2002. Ultrastructure of the spermatozoon of the pseudophyllidean cestode *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779). *Parasitol. Res.* 88, 285–291.
- Bruňanská, M., Scholz, T., Nebesářová, J., 2003a. Reinvestigation of the spermatozoon ultrastructure of the cestode *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800), a parasite of salmonid fish. *Parasitol. Res.* 91, 357–362.
- Bruňanská, M., Nebesářová, J., Scholz, T., 2003b. Spermiogenesis in the proteocephalidean cestode *Proteocephalus torulosus* (Batsch, 1786). *Parasitol. Res.* 90, 318–324.
- Bruňanská, M., Nebesářová, J., Scholz, T., 2003c. Ultrastructure of the spermatozoon of the proteocephalidean cestode *Proteocephalus torulosus* (Batsch, 1786). *Parasitol. Res.* 89, 345–351.
- Bruňanská, M., Scholz, T., Ibraheem, M.H., 2004a. Ultrastructural characters of the spermatozoon of the cestode *Corallobothrium solidum* Fritsch, 1886 (Cestoda: Proteocephalidea), a parasite of the electric catfish *Malapterurus electricus*. *Parasitol. Res.* 94, 421–426.
- Bruňanská, M., Scholz, T., Ibraheem, M.H., 2004b. Ultrastructural particularities of the spermatozoon of the cestode *Electrotaenia malopteruri* (Fritsch, 1886) (Proteocephalidae: Gangesiinae), a parasites of *Malapterurus electricus* (Siluriformes: Malapteruridae) from the river Nile, Egypt. *Parasitol. Res.* 93, 114–120.
- Bruňanská, M., Scholz, T., Nebesářová, J., 2004c. Reinvestigation of spermiogenesis in the proteocephalidean cestode *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800). *J. Parasitol.* 90, 23–29.
- Bruňanská, M., Scholz, T., Ibraheem, M.H., 2005. Spermiogenesis in the cestode *Corallobothrium solidum* Fritsch, 1886 (Proteocephalidea: Corallobothriinae). *Acta Zool. (Stockh.)* 86, 55–61.
- Bruňanská, M., Scholz, T., Dezfuli, B.S., Poddubnaya, L.G., 2006. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Cyathocephalus truncatus* (Pallas 1781) Kessler 1868 (Cestoda: Spathebothriidea). *J. Parasitol.* 92, 884–892.
- Bruňanská, M., Fagerholm, H.-P., Nebesářová, J., Kostič, B., 2010. Ultrastructure of the mature spermatozoon of *Eubothrium rugosum* (Batsch, 1786) with a re-assessment of the spermatozoon ultrastructure of *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779) (Cestoda: Bothriocephalidea). *Helminthologia* 47, 257–263.
- de Chambrier, A., Zehnder, A., Vaucher, C., Mariaux, J., 2004. The evolution of the proteocephalidea (Platyhelminthes, Eucestoda) based on an enlarged molecular phylogeny, with comments on their uterine development. *Syst. Parasitol.* 57, 159–171.
- Gamil, I.S., 2008. Ultrastructural studies of the spermatogenesis and spermiogenesis of the caryophyllidean cestode *Wenyonia virilis* (Woodland, 1923). *Parasitol. Res.* 103, 777–785.
- Hoberg, E.P., Mariaux, J., Justine, J.-L., Brooks, D.R., Weekes, P.J., 1997. Phylogeny of the orders of the Eucestoda (Cercaromorphae) based on comparative morphology: historical perspectives and a new working hypothesis. *J. Parasitol.* 83, 1128–1147.

- Justine, J.-L., 1986. Ultrastructure of the spermatozoon of the cestode *Duthiersia fimbriata* (Pseudophyllidea, Diphyllbothriidae). *Can. J. Zool.* 64, 1545–1548.
- Justine, J.-L., 1998. Spermatozoa as phylogenetic characters for the Eucestoda. *J. Parasitol.* 84, 385–408.
- Justine, J.-L., 2001. Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes. In: Littlewood, D.T.J., Bray, R.A. (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, pp. 231–238.
- Levron, C., Bruňanská, M., Marchand, B., 2005. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the pseudophyllidean cestode *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781). *Parasitol. Res.* 98, 26–33.
- Levron, C., Bruňanská, M., Poddubnaya, L.G., 2006a. Spermatological characters in *Diphyllbothrium latum* (Cestoda, Pseudophyllidea). *J. Morphol.* 267, 1110–1119.
- Levron, C., Bruňanská, M., Poddubnaya, L.G., 2006b. Spermatological characters of the pseudophyllidean cestode *Bothriocephalus scorpii* (Muller, 1781). *Parasitol. Int.* 55, 113–120.
- Levron, C., Bruňanská, M., Kuchta, R., Freeman, M., Scholz, T., 2006c. Spermatozoon ultrastructure of the pseudophyllidean cestode *Paraechinophallus japonicus*, a parasite of deep-sea fish *Psenopsis anomala* (Perciformes, Centrolophidae). *Parasitol. Res.* 100, 115–121.
- Levron, C., Sítko, J., Scholz, T., 2009. Spermiogenesis and spermatozoon of the tapeworm *Ligula intestinalis* (Diphyllbothriidea): phylogenetic implications. *J. Parasitol.* 95, 1–9.
- Levron, C., Miquel, J., Oros, M., Scholz, T., 2010. Spermatozoa of tapeworms (Platyhelminthes, Eucestoda): advances in ultrastructural and phylogenetic studies. *Biol. Rev.* 85, 523–543.
- Levron, C., Yoneva, A., Kalbe, M. Spermatological characters in the diphyllbothriidean *Schistocephalus solidus* (Cestoda). *Acta Zool. (Stockh.)*, in press.
- Marigo, A.M., Eira, C., Bâ, C.T., Miquel, J., 2011a. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the diphyllidean cestode *Echinobothrium euterpes* (Neifar, Tyler and Euzet 2001) Tyler 2006, a parasite of the common guitarfish *Rhinobatos rhinobatos*. *Parasitol. Res.* 109, 809–821.
- Marigo, A.M., Eira, C., Bâ, C.T., Miquel, J., 2011b. Spermatological characters of *Acanthobothrium crassicolle* Weld, 1855 (Tetraphyllidea, Onchobothriidae), a parasite of the common stingray *Dasyatis pastinaca*. *Acta Parasitol.* 56, 191–201.
- Marigo, A.M., Świdorski, Z., Bâ, C.T., Miquel, J., 2011c. Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of the trypanorhynch cestode *Aporhynchus menezesi* (Aporhynchidae), a parasite of the Velvet Belly lanternshark *Etmopterus spinax* (Elasmobranchii, Etmopteridae). *Folia Parasitol.* 58, 69–78.
- Marigo, A.M., Delgado, E., Torres, J., Bâ, C.T., Miquel, J., 2011. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the bothriocephalidean cestode *Clestobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819), a parasite of the teleost fish *Merluccius merluccius* (Gadiformes: Merlucciidae). *Parasitol. Res.*, in press.
- McKerr, G., 1985. The fine structure and physiology of a trypanorhynch tapeworm *Grillotia erinaceus*. PhD Thesis, The Queen's University of Belfast.
- Miquel, J., Feliu, C., Marchand, B., 1999. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Mesocestoides litteratus* (Cestoda, Mesocestoididae). *Int. J. Parasitol.* 29, 499–510.
- Miquel, J., Świdorski, Z., 2006. Ultrastructure of the spermatozoon of *Dollfusella spinulifera* (Beveridge and Jones, 2000) Beveridge, Neifar and Euzet, 2004 (Trypanorhyncha, Eutetrarhynchidae). *Parasitol. Res.* 99, 37–44.
- Miquel, J., Świdorski, Z., Neifar, L., Eira, C., 2007a. Ultrastructure of the spermatozoon of *Parachristianella trygonis* Dollfus, 1946 (Trypanorhyncha, Eutetrarhynchidae). *J. Parasitol.* 93, 1296–1302.
- Miquel, J., Eira, C., Świdorski, Z., Conn, D.B., 2007b. *Mesocestoides lineatus* (Goetze, 1782) (Mesocestoididae): new data on sperm ultrastructure. *J. Parasitol.* 93, 545–552.
- Miquel, J., Świdorski, Z., Mackiewicz, J.S., Ibraheem, M.H., 2008. Ultrastructure of spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Wenyonia virilis* Woodland, 1923, with re-assessment of flagellar rotation in *Glaridacris catostomi* Cooper, 1920. *Acta Parasitol.* 53, 19–29.
- Mokhtar-Maamouri, F., 1979. Étude en microscopie électronique de la spermiogénèse et du spermatozoïde de *Phyllobothrium gracile* Weld, 1855 (Cestoda, Tetraphyllidea, Phyllobothriidae). *Z. Parasitenkd.* 59, 245–258.
- Mokhtar-Maamouri, F., 1982. Étude ultrastructurale de la spermiogénèse de *Acanthobothrium filicolle* var. *filicolle* Zschokke, 1888 (Cestoda, Tetraphyllidea, Onchobothriidae). *Ann. Parasitol.* 57, 429–442.
- Mokhtar-Maamouri, F., Świdorski, Z., 1975. Étude en microscopie électronique de la spermatogénèse de deux Cestodes *Acanthobothrium filicolle benedenii* Loennberg, 1889 et *Onchobothrium uncinatum* (Rud., 1819) (Tetraphyllidea, Onchobothriidae). *Z. Parasitenkd.* 47, 269–281.
- Rego, A.A., 1994. Order Proteocephalidea Mola, 1928. In: Khalil, L.F., Jones, A., Bray, R.A. (Eds.), *Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates*. CAB International, Wallingford, pp. 257–293.
- Rego, A.A., 1995. A new classification of the cestode order Proteocephalidea Mola. *Rev. Brasil. Zool.* 12, 791–814.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208–212.
- Scholz, T., de Chambrier, A., 2003. Taxonomy and biology of proteocephalidean cestodes: current state and perspectives. *Helminthologia* 40, 65–77.
- Sène, A., Bâ, C.T., Marchand, B., 1997. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Nomimoscolex* sp. (Cestoda, Proteocephalidea) intestinal parasite of *Clarotes laticeps* (Fish, Teleost) in Senegal. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 29, 1–6.
- Sène, A., Bâ, C.T., Marchand, B., 1999. Ultrastructure of spermiogenesis of *Phyllobothrium lactuca* (Cestoda, Tetraphyllidea, Phyllobothriidae). *Folia Parasitol.* 46, 191–198.
- Šípková, L., Levron, C., Freeman, M., Scholz, T., 2010. Spermiogenesis and spermatozoon of the tapeworm *Parabothriocephalus gracilis* (Bothriocephalidea): ultrastructural and cytochemical studies. *Acta Parasitol.* 55, 58–65.
- Šípková, L., Levron, C., Oros, M., Justine, J.-L., 2011. Spermatological characters of bothriocephalideans (Cestoda) inferred from an ultrastructural study on *Oncodiscus sauridae* and *Senga* sp. *Parasitol. Res.* 109, 9–18.
- Škeříková, A., Hypša, V., Scholz, T., 2001. Phylogenetic analysis of European species of *Proteocephalus* (Cestoda: Proteocephalidea): compatibility of molecular and morphological

- data, and parasite–host coevolution. *Int. J. Parasitol.* 31, 1121–1128.
- Świderski, Z., 1976. Fine structure of the spermatozoon of *Lacistorhynchus tenuis* (Cestoda, Trypanorhyncha). In: *Proc. 6th Eur. Cong. Elect. Microsc.*, Jerusalem, pp. 309–310.
- Świderski, Z., 1985. Spermiogenesis in the proteocephalid cestode *Proteocephalus longicollis*. In: *Proc. Elect. Microsc. Soc. South Africa, 24th Ann. Conf.*, Pietermaritzburg, pp. 181–182.
- Świderski, Z., 1996. Fertilization in proteocephalid cestode *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800). In: *Proc. 11th Eur. Cong. Elect. Microsc.*, Dublin, pp. 495–496.
- Świderski, Z., Mokhtar-Maamouri, F., 1980. Étude de la spermatogénèse de *Bothriocephalus clavibothrium* Ariola, 1899 (Cestoda: Pseudophyllidea). *Arch. Inst. Pasteur Tunis* 57, 323–347.
- Thiéry, J.P., 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc.* 6, 987–1018.
- Yoneva, A., Levron, C., Oros, M., Orosová, M., Scholz, T., 2011. Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Breviscolex orientalis* (Cestoda: Caryophyllidea). *Parasitol. Res.* 108, 997–1005.
- Zehnder, M.P., Mariaux, J., 1999. Molecular systematic analysis of the order Proteocephalidea (Eucestoda) based on mitochondrial and nuclear rDNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 29, 1841–1852.

III.4. Etude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde du cestode *Cleistobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819) (Bothriocephalidea), parasite du poisson téléostéen *Merluccius merluccius* (Gadiformes : Merlucciidae)

Résumé

La spermiogenèse et l'ultrastructure du spermatozoïde du cestode *Cleistobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819) (Bothriocephalidea), parasite du poisson téléostéen *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758), ont été étudiées au microscope électronique à transmission. Le processus de la spermiogenèse implique en premier lieu la formation d'une zone de différenciation contenant deux centrioles, associés à deux racines striées et à un corps intercentriolaire. Un matériel dense aux électrons est visible dans la région apicale de la zone de différenciation. Les centrioles forment deux flagelles qui se développent perpendiculairement à l'expansion cytoplasmique médiane. Ensuite, ils entament une rotation de 90°, deviennent parallèles à l'expansion cytoplasmique médiane. A cette rotation fait suite une fusion proximodistale des flagelles qui s'intègrent dans l'expansion cytoplasmique. Au même moment, le noyau s'allonge et entame sa migration dans le corps spermatique. Le processus de la spermiogenèse prend fin avec l'apparition du cône apical entouré du corps en crête hélicoïdal à l'avant de la spermatide. Finalement, une constriction au niveau de l'anneau des membranes arquées permet le détachement du jeune spermatozoïde du cytoplasme résiduel. Le spermatozoïde mûr de *C. crassiceps* est filiforme et contient deux axonèmes de type 9+1', spécifique des Trepaxonemata, un noyau parallèle, des microtubules corticaux parallèles et des granules de glycogène. L'extrémité antérieure présente un cône apical réduit, opaque aux électrons et entouré d'un corps en crête hélicoïdal. Autour du premier axonème apparaît un anneau de microtubules épais qui persiste jusqu'à l'apparition du second axonème. Plus tard, ces microtubules épais disparaissent et d'autres microtubules beaucoup plus fins apparaissent. L'extrémité postérieure présente seulement un noyau. Les résultats obtenus sont discutés et comparés particulièrement avec les données ultrastructurales disponibles sur l'ancien ordre des « Pseudophyllidea ». Ainsi deux différences fondamentales peuvent être établies entre les spermatozoïdes de Bothriocephalidea et ceux des Diphyllbothriidea : le type de spermatozoïde (II ou I) et la présence/absence de l'anneau de microtubules corticaux.

Mots clés : spermiogenèse, spermatozoïde, ultrastructure, *Clestobothrium crassiceps*, Bothriocephalidea, Cestoda

Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the bothriocephalidean cestode *Clestobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819), a parasite of the teleost fish *Merluccius merluccius* (Gadiformes: Merlucciidae)

Adji Mama Marigo · Eulàlia Delgado · Jordi Torres ·
Cheikh Tidiane Bâ · Jordi Miquel

Received: 17 March 2011 / Accepted: 4 May 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Spermiogenesis and the ultrastructure of the spermatozoon of the bothriocephalidean cestode *Clestobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819), a parasite of the teleost fish *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758), have been studied by means of transmission electron microscopy. Spermiogenesis involves firstly the formation of a differentiation zone. It is characterized by the presence of two centrioles associated with striated rootlets, an intercentriolar body and an electron-dense material in the apical region of this zone. Later, two flagella develop from the centrioles, growing orthogonally in relation to the median cytoplasmic

process. Flagella then undergo a rotation of 90° until they become parallel to the median cytoplasmic process, followed by the proximodistal fusion of the flagella with the median cytoplasmic process. The nucleus elongates and afterwards it migrates along the spermatid body. Spermiogenesis finishes with the appearance of the apical cone surrounded by the single helical crested body at the base of the spermatid. Finally, the narrowing of the ring of arched membranes detaches the fully formed spermatozoon. The mature spermatozoon of *C. crassiceps* is filiform and contains two axonemes of the 9+“1” trepaxonematan pattern, a parallel nucleus, parallel cortical microtubules, and electron-dense granules of glycogen. The anterior extremity of the gamete exhibits a short electron-dense apical cone and one crested body, which turns once around the sperm cell. The first axoneme is surrounded by a ring of thick cortical microtubules that persist until the appearance of the second axoneme. Later, these thick cortical microtubules disappear and thus, the mature spermatozoon exhibits two bundles of thin cortical microtubules. The posterior extremity of the male gamete presents only the nucleus. Results are discussed and compared particularly with the available ultrastructural data on the former “pseudophyllideans”. Two differences can be established between spermatozoa of Bothriocephalidea and Diphyllbothriidea, the type of spermatozoon (II vs I) and the presence/absence of the ring of cortical microtubules.

A. M. Marigo · J. Torres · J. Miquel
Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i
Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia,
Universitat de Barcelona,
Av. Joan XXIII, sn,
E08028 Barcelona, Spain

A. M. Marigo · J. Torres · J. Miquel (✉)
Institut de Recerca de la Biodiversitat, Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona,
Av. Diagonal, 645,
E08028 Barcelona, Spain
e-mail: jordimiquel@ub.edu

E. Delgado
Departament de Ciències Ambientals, Facultat de Ciències,
Universitat de Girona,
Campus de Montilivi, sn,
E17071 Girona, Spain

C. T. Bâ
Laboratoire de Parasitologie, Département de Biologie animale,
Faculté des Sciences, Université Cheikh Anta Diop de Dakar,
Dakar, Senegal

Introduction

The genus *Clestobothrium* is included in the recent tapeworm order Bothriocephalidea, which had formerly

been included in the suppressed order “Pseudophyllidea” (Kuchta et al. 2008a). In their study, Kuchta et al. (2008a) showed that the order “Pseudophyllidea” consists of two unrelated clades using molecular, morphological, and ecological approaches. The ultrastructural spermatological data available to date support these results and confirm the existence of important ultrastructural differences between the species of both orders (Levron et al. 2005, 2006a, b, c, 2009; Bâ et al. 2007; Bruňanská et al. 2010; Šípková et al. 2010, 2011). Bothriocephalideans are intestinal parasites of teleost fishes including 46 genera distributed into four families (Bothriocephalidae, Echinophallidae, Philobythiidae, and Triaenophoridae). The genus *Clestobothrium* is included in the Bothriocephalidae along with another 13 valid genera (Kuchta et al. 2008a, b). Morphologically, individuals belonging to the genus *Clestobothrium* differ from other bothriocephalids because they possess a sphincter surrounding the anterior aperture of bothria (Schmidt 1986; Bray et al. 1994). To date, this genus comprises only three valid species: (1) *Clestobothrium crassiceps*, the genus type species that was initially described as *Bothriocephalus crassiceps*, (2) *Clestobothrium gibsoni*, formerly described as *Bathygadus macrops*, and (3) *Clestobothrium neglectum*, described as *Raniceps raninus* (Kuchta et al. 2008b). The remaining families of Bothriocephalidea include eight genera in the Echinophallidae, two genera in the Philobythiidae, and 22 genera in the Triaenophoridae (Kuchta et al. 2008a, b).

The usefulness of ultrastructural data of spermiogenesis and the spermatozoon to elucidate the phylogenetic relationships within the Platyhelminthes has been demonstrated by several authors (Euzet et al. 1981; Justine 1991, 1998, 2001; Bâ and Marchand 1995; Levron et al. 2010). To our knowledge, the spermatological characters of only 13 species of the former “Pseudophyllidea” have been studied, including 10 bothriocephalideans and three diphyllbothriideans. Concerning the bothriocephalideans, the analyzed species are the bothriocephalids *Bothriocephalus clavibothrium*, *B. claviceps*, *B. scorpii*, *Oncodiscus sauridae*, and *Senga* sp. (Świdorski and Mokhtar-Maamouri 1980; Levron et al. 2006b; Bâ et al. 2007; Šípková et al. 2011); the echinophallids *Parabothriocephalus gracilis* and *Paraechinophallus japonicus* (Levron et al. 2006a; Šípková et al. 2010); and the triaenophorids *Eubothrium crassum*, *E. rugosum*, and *Triaenophorus nodulosus* (Bruňanská et al. 2001, 2002, 2010; Levron et al. 2005). In what is referred to as the diphyllbothriideans, the three studied species are the scyphocephalid *Duthiersia fimbriata* (Justine 1986), and the diphyllbothriids *Diphyllbothrium latum* and *Ligula intestinalis* (Levron et al. 2006c, 2009).

The present study describes for the first time the spermiogenesis and the spermatozoon ultrastructure of *C.*

crassiceps, with the aim of providing new data on this genus potentially useful for phylogenetic analyses.

Materials and methods

Live adult specimens of *C. crassiceps* were collected from the intestine of the teleost fish *Merluccius merluccius* (Gadiformes: Merlucciidae) caught in Roses (Girona, Spain).

Live cestodes were first placed in a 0.9% NaCl solution. Later the mature proglottids were fixed in cold (4°C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1-M sodium cacodylate buffer at pH 7.4 for a minimum of 2 h, rinsed in a 0.1-M sodium cacodylate buffer at pH 7.4, postfixed in cold (4°C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h, rinsed in a 0.1-M sodium cacodylate buffer at pH 7.4, dehydrated in an ethanol series and propylene oxide, and finally embedded in Spurr's resin. Ultrathin sections were obtained using a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome, placed on copper grids, and double-stained with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds 1963). Ultrathin sections were examined using a JEOL 1010 TEM operated at an accelerating voltage of 80 kV.

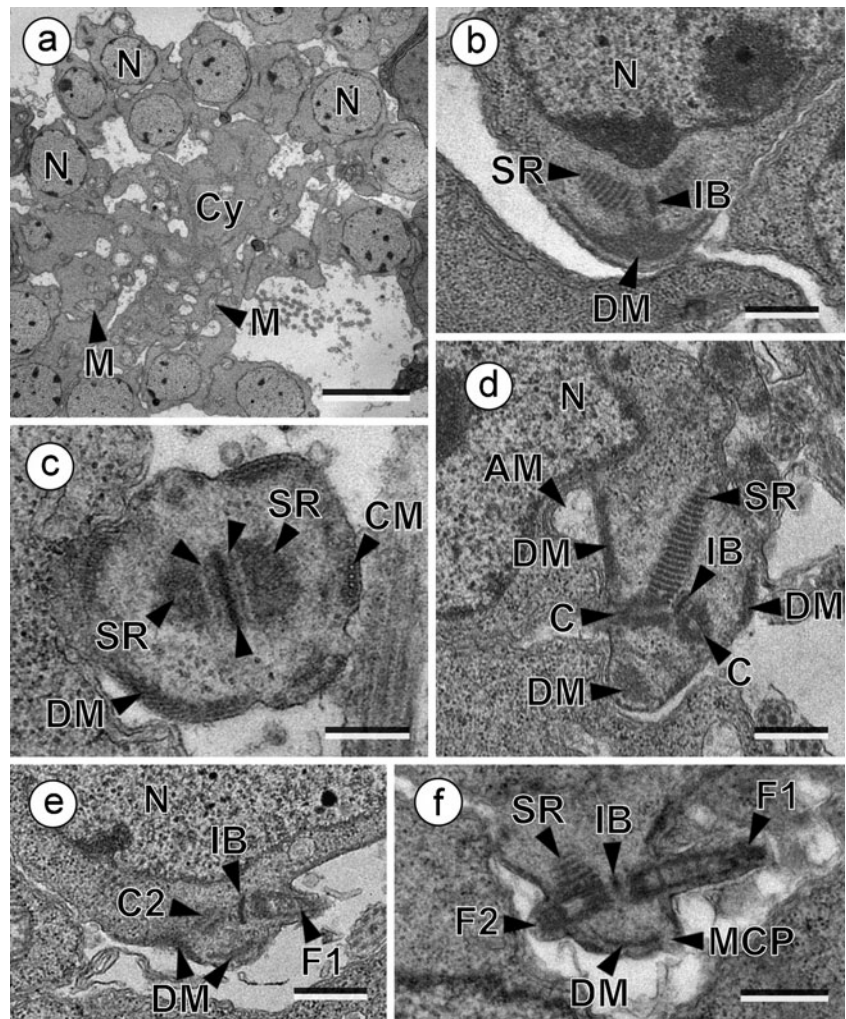
The presence of glycogen was detected using the method of Thiéry (1967). Gold grids were treated in periodic acid, thiocarbohydrazide, and silver proteinate (PA-TCH-SP) as follows: 30 min in 10% PA, rinsed in distilled water, 24 h in TCH, rinsed in acetic solutions, and distilled water, 30 min in 1% SP in the dark, and rinsed in distilled water.

Results

Spermiogenesis

Spermiogenesis in *C. crassiceps* is described in Figs. 1, 2, 3 and 4. In the testes, spermatids are grouped in rosettes and are interconnected to a central cytophore by cytoplasmic bridges (Fig. 1a). Each spermatid contains a large nucleus with scattered chromatin and numerous mitochondria (Fig. 1a). Spermiogenesis starts by the formation of a zone of differentiation situated at the periphery of each spermatid (Fig. 1b). In the very early stages of spermiogenesis it is possible to observe an electron-dense material in the peripheral region of the zone of differentiation (Fig. 1b). The differentiation zone also contains two centrioles associated with striated rootlets and an intercentriolar body (Fig. 1b–d). The intercentriolar body is a cylindrical structure and consists of three electron-dense plates: one central thicker electron-dense layer bordered by two thin electron-dense layers (Fig. 1c). The differentiation zone is lined by a layer of submembranous cortical microtubules and delimited at its base by a ring of arched membranes (Fig. 1d). Cross-sections of this zone show that cortical

Fig. 1 Spermiogenesis in *C. crassiceps*. **a** Rosette showing numerous peripheric spermatids attached to the central cytophore (Cy). M mitochondria, N nucleus. Bar 5 μ m. **b** Longitudinal section of an early stage of spermiogenesis showing the appearance of the electron-dense material (DM). IB intercentriolar body, N nucleus, SR striated rootlets. Bar 0.5 μ m. **c** Cross-section of the differentiation zone showing the intercentriolar body and the cortical microtubules (CM) associated with the electron-dense material (DM). Arrowheads indicate the three electron-dense layers forming the intercentriolar body. SR striated rootlets. Bar 0.3 μ m. **d** Longitudinal section of an early stage of spermiogenesis showing the presence of two centrioles (C), striated rootlets (SR), the intercentriolar body (IB), and the electron-dense material (DM) in the zone of differentiation. AM arched membranes, N nucleus. Bar 0.5 μ m. **e, f** Two longitudinal sections of the differentiation zone confirming the asynchronous growth of the flagella. C2 second centriole, DM electron-dense material, F1 first flagellum, IB intercentriolar body, N nucleus. Bar 0.5 μ m



microtubules are associated with an electron-dense material organized in several submembranous fields (Fig. 1c). In longitudinal sections, this electron-dense material is also visible and extends up to the ring of arched membranes (Fig. 1d). One of the centrioles elongates and gives rise to a flagellum (Fig. 1e). Later the second flagellum also elongates and, thus, two flagella of unequal length are formed perpendicularly to an incipient median cytoplasmic process (Fig. 1f). It is interesting to note that the growth of the flagella is asynchronous (Figs. 1e, f and 2a). Later, both flagella undergo a rotation of 90° and become parallel to the median cytoplasmic process (Fig. 2b–d). At this stage, four very small accumulations of electron-dense material, the so-called attachment zones, appear on the inner surface of the plasma membrane in the median cytoplasmic process (Fig. 2c). These attachment points mark the lines where the fusion of the median cytoplasmic process with the two axonemes takes place.

Thus, both axonemes fuse with the cytoplasmic extension in a proximodistal way (Fig. 2e). The nucleus, located outside the ring of arched membranes, forms a cone-like

extension directed towards the elongated spermatid (Fig. 2f). It is important to note that, after the proximodistal fusion, the axonemes become longitudinally displaced in relation to one another and striated rootlets are still present (Fig. 2f). Afterwards, the nucleus elongates and migrates into the spermatid (Fig. 3a). At the final stages of spermiogenesis, the ring of arched membranes narrows (Fig. 3b, c). The crested body and the future apical cone become visible only at the very end of spermiogenesis (Fig. 3c), just before the detachment of the mature spermatozoon from the residual cytoplasm.

Spermatozoon

The mature spermatozoon of *C. crassiceps* is filiform, tapered at both ends, and lacks mitochondria. From the anterior to the posterior extremities, four regions can be distinguished on the basis of distinctive ultrastructural features (Figs. 5, 6 and 7).

Region I (Figs. 5a–h and 7 (I)) constitutes the anterior extremity of the spermatozoon. It exhibits a small apical

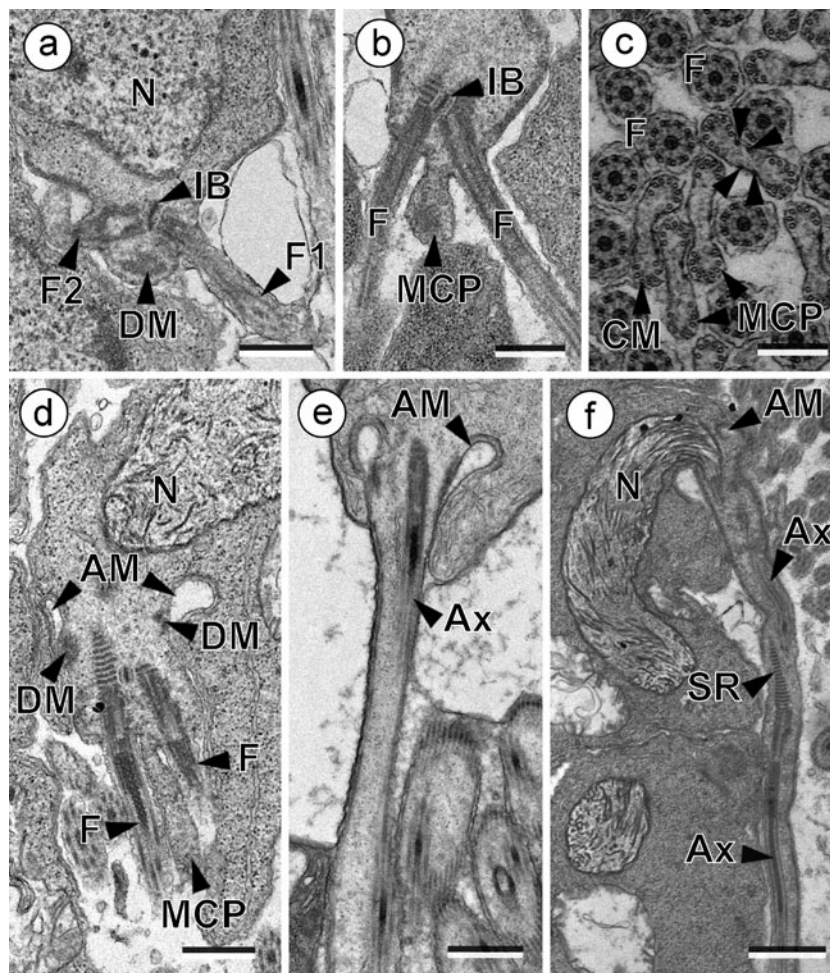


Fig. 2 Spermiogenesis in *Clestobothrium crassiceps*. **a** Longitudinal section of the zone of differentiation showing the unequal length of flagella (*F1* first flagellum, *F2* second flagellum) during the flagellar rotation. *DM* electron-dense material, *N* nucleus. *Bar* 0.5 μm . **b** Longitudinal section of the zone of differentiation showing the two flagella (*F*) well developed. *IB* intercentriolar body, *MCP* median cytoplasmic process. *Bar* 0.5 μm . **c, d** Cross and longitudinal sections of the differentiation zone after the flagellar rotation. Note the presence of four attachment zones in the median cytoplasmic process

(arrowheads). *AM* arched membranes, *CM* cortical microtubules, *DM* electron-dense material, *F* flagellum, *MCP* median cytoplasmic process. *Bar* 0.3 μm , *bar* 0.5 μm . **e** Longitudinal section of spermatid after the proximodistal fusion of axonemes (*Ax*). *AM* arched membranes. *Bar* 0.5 μm . **f** Longitudinal section at the beginning of the nuclear migration towards the cytoplasmic process. Note that the axonemes (*Ax*) are longitudinally displaced in relation to one another and that the striated rootlets (*SR*) are still present. *AM* arched membranes, *N* nucleus. *Bar* 1 μm

cone of electron-dense material, measuring 620 nm, surrounded by the single helical crested body (Fig. 5a, b). The crested body, 160 nm thick, is also short and describes only one turn around the sperm cell (Fig. 5a). At the anterior tip of the cell some microtubules become gradually visible from the apical cone area to the centriole area (Fig. 5b–e). Thus, these microtubules progressively form an arc of cortical microtubules beneath the plasma membrane and finally, when the first axoneme appears, they constitute a complete ring of about 24 to 30 parallel submembranous cortical microtubules that encircles the axoneme (Fig. 5f–h). These cortical microtubules are characterized by a thick membrane and an electron-lucent center and they extend up to Region II of the spermatozoon containing the second

centriole (Fig. 5f–k). The axoneme shows the 9+“1” pattern of the trepaxonematan Platyhelminthes (Fig. 5f–h).

Region II (Figs. 5i–n, 6a, and 7 (II)) lacks crested body and is characterized by the presence of two axonemes of the 9+“1” trepaxonematan pattern and also by the appearance of electron-dense granules of glycogen (Figs. 5l–n and 6a). At the end of Region I, scattered electron-dense microtubular elements appear indicating the beginning of the second centriole (Fig. 5i–k). At the same time, the ring of thick electron-dense cortical microtubules disorganizes and finally disappears (Fig. 5j, k). At this level, both axonemes are very close to each other being separated by two thin electron-dense cortical microtubules (Fig. 5l). Then, four electron-dense points corresponding to the attachment

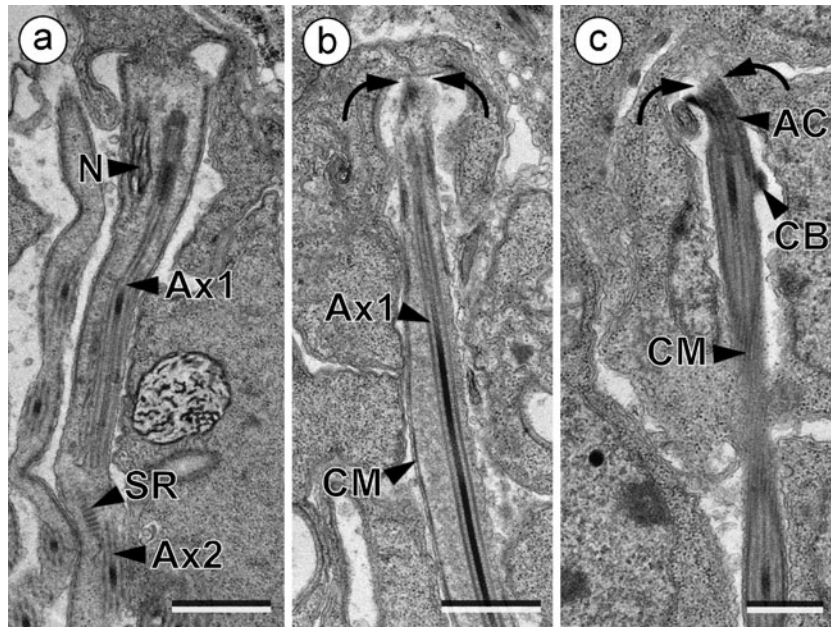


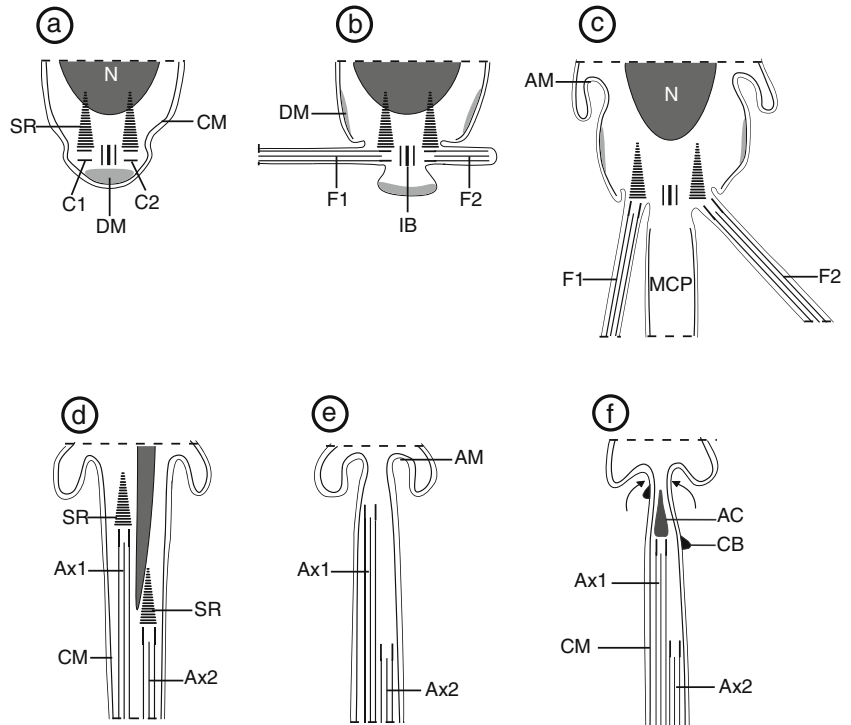
Fig. 3 Spermiogenesis in *C. crassiceps*. **a** Longitudinal section of the spermatid during the nuclear (*N*) penetration showing the two axonemes longitudinally displaced in relation to one another (*Ax1* first axoneme, *Ax2* second axoneme). *SR* striated roots. *Bar* 1 μ m. **b, c**

Longitudinal sections of a final stage of spermiogenesis showing the narrowing of the ring of arched membranes (*arrows*) and the appearance of the apical cone (*AC*) and the crested body (*CB*). *Ax1* first axoneme, *CM* cortical microtubules. *Bar* 1 μ m, *bar* 0.5 μ m

zones are visible in cross-sections (Fig. 5l). Subsequently, the width of the spermatozoon increases, the cortical microtubules become arranged in two opposite parallel fields of four units, and electron-dense granules appear between them (Fig. 5m, n). The method of Thiéry reveals that these electron-dense granules are glycogen (Fig. 6a).

Region III (Figs. 6b–d and 7 (III)) contains two axonemes, electron-dense granules of glycogen, and two fields of submembranous and parallel cortical microtubules. This region is characterized by the presence of the anterior part of nucleus (Fig. 6b). The nucleus is electron-dense with fibrillar patches of chromatin (Fig. 6c). Afterwards, the

Fig. 4 Diagram showing the main stages of spermiogenesis in *C. crassiceps*. *AC* apical cone, *AM* arched membranes, *Ax1* first axoneme, *Ax2* second axoneme, *C1* first centriole, *C2* second centriole, *CB* crested body, *CM* cortical microtubules, *DM* electron-dense material, *F1* first flagellum, *F2* second flagellum, *IB* intercentriolar body, *MCP* median cytoplasmic process, *N* nucleus, *SR* striated rootlets



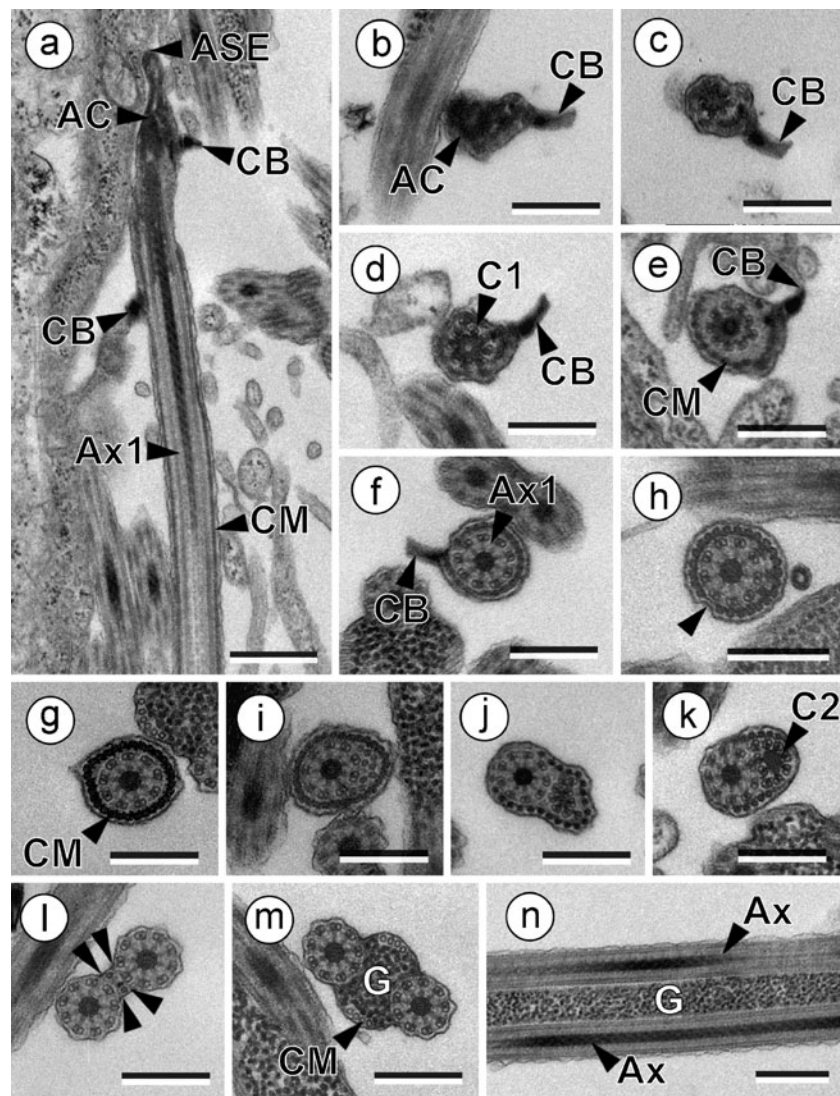


Fig. 5 Mature spermatozoon of *C. crassiceps*. **a** Longitudinal section of the anterior extremity (ASE) of the sperm cell showing the apical cone (AC) and the first axoneme (Ax1) surrounded by the crested body (CB). CM cortical microtubules. Bar 1 μ m. **b–f** Consecutive cross-sections of the anterior extremity of the spermatozoon from the apical cone (AC) to the beginning of the first axoneme (Ax1). Note the progressive formation of the ring of electron-dense cortical microtubules (CM). C1 first centriole, CB crested body. Bar 0.5 μ m. **g** Cross-section showing the almost complete ring of electron-dense cortical microtubules around the axoneme after the disappearance of the crested body (arrowhead). Bar 0.5 μ m. **h** Cross-section showing the complete ring of 30 cortical microtubules (CM) encircling the first

axoneme. Bar 0.5 μ m. **i–k** Consecutive cross-sections showing the gradual formation of the second axoneme (transition area between regions I and II). Note at the same time the progressive disorganization of the ring of electron-dense cortical microtubules. C2 second centriole. Bar 0.5 μ m. **l** Cross-section of the region II showing the four attachment zones (arrowheads). Note the presence of only one parallel electron-lucent cortical microtubule between the attachment points at each side of the spermatozoon. Bar 0.5 μ m. **m** Cross-section of region II showing granules of glycogen (G) and two opposite fields of parallel electron-lucent cortical microtubules (CM) between the axonemes. Bar 0.5 μ m. **n** Longitudinal section of region II showing large amounts of glycogen (G). Ax axoneme. Bar 1 μ m

diameter of the nucleus increases gradually (Fig. 6b–d). Each field of parallel cortical microtubules is composed by seven to eight units. At the end of this region, one of the axonemes starts to disorganize and finally disappears (Fig. 6c, d).

Region IV (Figs. 6e–j and 7 (IV)) is characterized by the presence of one axoneme, nucleus (posterior part), electron-dense granules of glycogen, and parallel cortical micro-

tubules. Cortical microtubules are still organized in two fields, composed of five to six units (Fig. 6e). They gradually disappear in the posterior part of this region, near the posterior extremity of the spermatozoon (Fig. 6e, f). The diameter of the nucleus increases at this level and reaches its maximum size (Fig. 6e). At the posterior part of the spermatozoon, the nucleus decreases in diameter and cortical microtubules disappear (Fig. 6f). Later the axoneme

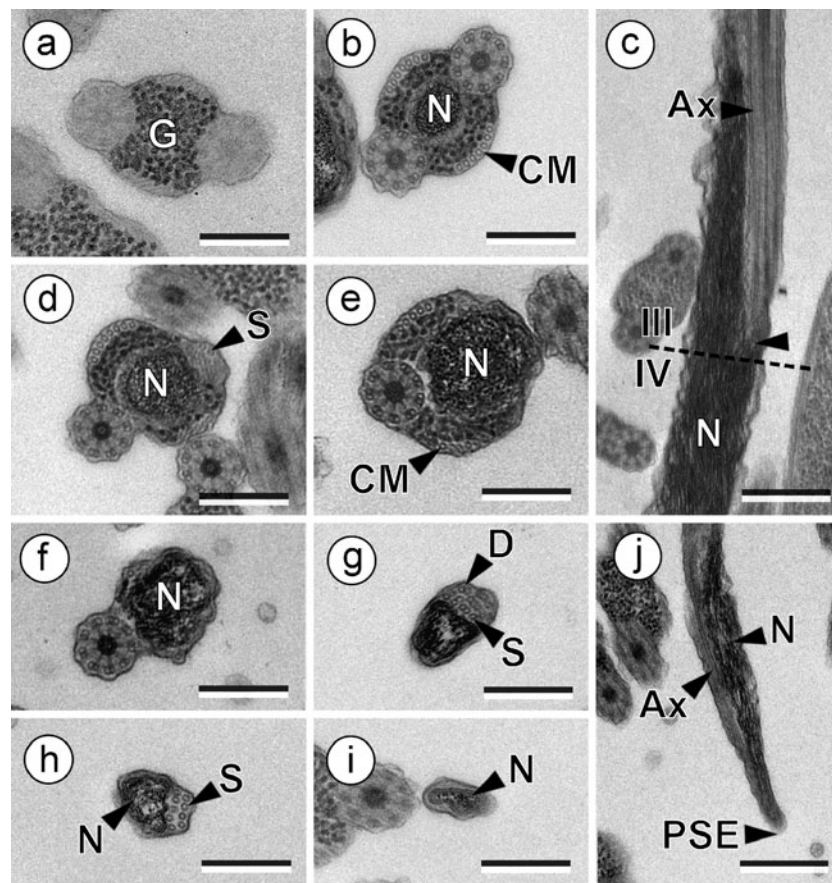


Fig. 6 Mature spermatozoon of *C. crassiceps*. **a** Cross-section of region II showing the presence of glycogen (*G*) evidenced by the cytochemical analysis using the test of Thiéry. *Bar* 0.5 μm . **b** Cross-section of region III showing the nucleus (*N*) and two axonemes. *CM* cortical microtubules. *Bar* 0.5 μm . **c** Longitudinal section of the nuclear region showing the transition area between regions III and IV. Note the posterior extremity of the axoneme (*Ax*; arrowhead). *N* nucleus. *Bar* 1 μm . **d** Cross-section of region IV showing the disorganization of one of the axonemes. *N* nucleus, *S* singlets. *Bar* 0.5 μm . **e, f** Consecutive cross-sections of the posterior area of the

spermatozoon showing the reduction of the size of nucleus (*N*), the reduction of glycogen, and the reduction in the number of cortical microtubules (*CM*). *Bar* 0.5 μm . **g, h** Consecutive cross-sections of the posterior tip of the spermatozoon showing the progressive disorganization of the axoneme. *D* doublets, *N* nucleus, *S* singlets. *Bar* 0.5 μm . **i** Cross-section of the posterior tip of the spermatozoon showing only the nucleus (*N*). *Bar* 0.5 μm . **j** Longitudinal section of the posterior spermatozoon extremity (*PSE*). Note the progressive disorganization of the last axoneme (*Ax*) near the end of the spermatozoon body. *N* nucleus. *Bar* 1 μm

disorganizes: the central core disappears and doublets lose their arms (Fig. 6g), become disorganized, and finally they transform into singlets (Fig. 6h). At this level the nucleus subsists along with only a few singlets (Fig. 6h). The posterior extremity of the gamete is characterized by the nucleus surrounded by the plasma membrane (Fig. 6i, j).

Discussion

Spermiogenesis

There are some particularities in the spermiogenesis of the former “Pseudophyllidea” when comparing with the spermiogenesis of other orders of cestodes. For example, one of such particularities is the accumulation of electron-dense

material in the apical area of the differentiation zone during the early stages of spermiogenesis. This electron-dense material, described for the first time in *E. crassum* (Bruňanská et al. 2001), has also been reported in caryophyllideans (Bruňanská and Poddubnaya 2006; Miquel et al. 2008; Bruňanská 2009; Yoneva et al. 2011) and spathebothriideans (Bruňanská et al. 2006; Bruňanská and Poddubnaya 2010), being present only during the initial stages of spermiogenesis. This electron-dense material has also been observed in *C. crassiceps* in our study. According to Bruňanská and Poddubnaya (2010), this feature can be regarded as characteristic of the basal or lower eucestodes. It is also important to note that in all the studied species of the former “Pseudophyllidea”, the cortical microtubules are associated with another electron-dense material present during spermiogenesis. Although

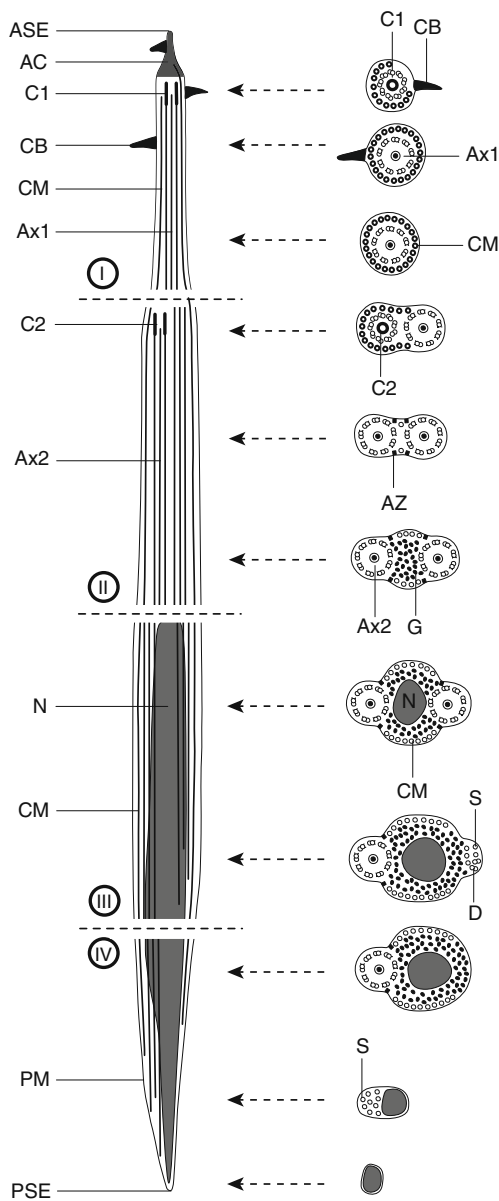


Fig. 7 Schematic reconstruction of the mature spermatozoon of *C. crassiceps*. To simplify the diagram, the granules of glycogen are not shown in the longitudinal section. *AC* apical cone, *ASE* anterior spermatozoon extremity, *Ax1* first axoneme, *Ax2* second axoneme, *AZ* attachment zones, *C1* first centriole, *C2* second centriole, *CB* crested body, *CM* cortical microtubules, *D* doublets, *G* granules of glycogen, *N* nucleus, *PM* plasma membrane, *PSE* posterior spermatozoon extremity, *S* singlets

this electron-dense material is observed in all the studied Bothriocephalidea and Diphyllbothriidea, it is not mentioned by the authors in their studies (Świdorski and Mokhtar-Maamouri 1980; Justine 1986; Bruňanská et al. 2001, 2002, 2010; Levron et al. 2005, 2006a, b, c, 2009; Bâ et al. 2007; Šípková et al. 2010, 2011). However, the localization of the electron-dense material in the differentiation zone of cestodes during spermiogenesis is some-

times restricted to the centriolar areas, as it happens for example in certain cyclophyllideans presenting the so-called centriolar adjunct or centriole-associated structures (Bâ et al. 1991, 2000; Bâ and Marchand 1994, 1998; Miquel et al. 2005; Eira et al. 2006). Moreover, in some of these cyclophyllideans, such as *Gallegoides arfaai* or *Mosgovoyia ctenoides*, the electron-dense structures associated with centrioles are still present when the axonemes are already formed (Miquel et al. 2005; Eira et al. 2006).

The process of spermiogenesis in *C. crassiceps* is characterized by a flagellar rotation and proximodistal fusion. This type of spermiogenesis corresponds to the “Pseudophyllidean type” of Świdorski (1986) or to the type I of Bâ and Marchand (1995). It is important to remark that members of the two unrelated clades that constituted the former order “Pseudophyllidea” (Bothriocephalidea and Diphyllbothriidea) follow the type I of spermiogenesis (see Table 1). Thus, taking into account that the four types of spermiogenesis established by Bâ and Marchand (1995) are the major characteristics of spermiogenesis in the eucestodes and that members of the two orders show the same pattern, future studies of spermiogenesis should be focussed on characters such as intercentriolar body, particularly for the diphyllbothriideans due to the scarce available data in this order.

The intercentriolar body is a character used in phylogenetic studies for the classification of higher-level cestodes (Hoberg et al. 1997; Justine 2001; Olson et al. 2001; Levron et al. 2010). The intercentriolar body in *C. crassiceps* includes three electron-dense layers delimited by four electron-lucent layers. This character is variable within the “Pseudophyllidea” and the number of plates varies from one to five within the group. It is formed by a single electron-dense layer in both *B. scorpii* and *E. crassum* (Bruňanská et al. 2001; Levron et al. 2006b), by three layers in *P. gracilis*, *T. nodulosus*, and *D. latum* (Levron et al. 2005, 2006c; Šípková et al. 2010) and by five layers in *L. intestinalis* (Levron et al. 2009). According to Justine (2001), a progressive reduction of the intercentriolar body occurs in the higher cestodes.

Spermatozoon

Recent studies on cestode spermatozoa have revealed numerous new ultrastructural characters showing a great degree of variation. These numerous supplementary characters are constantly increasing the degree of utility of spermatozoon ultrastructure for analysis of cestode phylogeny and evolution (Hoberg et al. 1997, 1999; Justine 2001; Olson et al. 2001; Levron et al. 2010).

The spermatozoon of *C. crassiceps* also shows particular characters. It possesses two axonemes of the 9+“1”

Table 1 Spermatological characters in bothriocephalidean and diphyllbothriidean cestodes

Orders, families, and species	Spermiogenesis							Spermatozoon							
	Type	IB	DM	SR	FR	PF	F	Type	AC	CB	RCM	AxN	G	AZ	PSE
Bothriocephalidea															
Bothriocephalidae															
<i>Bothriocephalus clavibothium</i> (Świderski and Mokhtar-Maamouri 1980)	I	?	-	+	+	+	2	II	-	-	+	2	+	-	Ax
<i>Bothriocephalus claviceps</i> (Bâ et al. 2007)								II	+	+	Partial	2	+	?	Ax
<i>Bothriocephalus scorpii</i> (Levron et al. 2006b)	I	3	+	+	+	+	2	II	-	+	+	2	+	+	N
<i>Clestobothrium crassiceps</i> (present study)	I	3	+	+	+	+	2	II	+	160	+	2	+	+	N
<i>Oncodiscus sauridae</i> (Šípková et al. 2011)	I	3	+	+	+	+	2	II	-	150	+	2	+	+	N+CM
<i>Senga</i> sp. (Šípková et al. 2011)	I	3	+	+	+	+	2	II	-	150	+	2	+	+	CM
Echinophallidae															
<i>Parabothriocephalus gracilis</i> Šípková et al. 2010	I	3	+	+	+	+	2	II	-	130	+	2	+	-	N+CM
<i>Paraechinophallus japonicum</i> (Levron et al. 2006a)								II	-	130	+	2	+	+	N+CM
Triaenophoridae															
<i>Eubothrium crassum</i> (Bruňanská et al. 2001, 2002, 2010)	I	1	+	+	+	+	2	II	-	50–100	+	2	+	+	Ax
<i>Eubothrium rugosum</i> (Bruňanská et al. 2010)								II	-	120	+	2	+	+	Ax
<i>Triaenophorus nodulosus</i> (Levron et al. 2005)	I	3	+	+	+	+	2	II	-	50	+	2	+	?	Ax
Diphyllbothriidea															
Scyphocephalidae															
<i>Duthiersia fimbriata</i> (Justine 1986)								II	-	100	Partial	2	+	?	?
Diphyllbothriidae															
<i>Diphyllbothrium latum</i> (Levron et al. 2006c)	I	3	+	+	+	+	2	I	-	-	-	2	+	+	N
<i>Ligula intestinalis</i> (Levron et al. 2009)	I	5	+	+	+	+	2	I	-	-	-	2	-	+	Ax

Spermiogenesis types are considered according to Bâ and Marchand (1995); spermatozoa types are considered according to Levron et al. (2010)

Spermiogenesis characters: *N*Ax number of axonemes, *DM* dense mass, *F* number of flagella, *FR* flagellar rotation, *IB* number of plates of intercentriolar body, *PF* proximodistal fusion, *SR* striated rootlets; *spermatozoon characters*: *AC* apical cone, *Ax* axoneme, *AxN* number of axonemes, *AZ* attachment zones, *CB* crested body, *CM* cortical microtubules, *G* glycogen, *N* nucleus, *PSE* posterior spermatozoon extremity, *RCM* ring of cortical microtubules, +/- presence/absence of considered character, ? unknown data or required to be confirmed

treaxonematan pattern, a single crested body, parallel nucleus, and parallel cortical microtubules. Therefore, it corresponds to the type II spermatozoon of Levron et al. (2010). This type has been reported in all the studied species of Bothriocephalidea (Świderski and Mokhtar-Maamouri 1980; Bruňanská et al. 2001, 2002, 2010; Levron et al. 2005, 2006a, b; Bâ et al. 2007; Šípková et al. 2010, 2011), Tetraphyllidea-Onchobothriidae (Mokhtar-Maamouri and Świderski 1975; Mokhtar-Maamouri 1982; Quilichini et al. 2007; Marigo et al. 2011a), Proteocephalidea (Sène et al. 1999; Bruňanská et al. 2003a, b; 2004a, b), and in two Diphyllidea (Azzouz-Draoui 1985).

An interesting feature in the spermatozoon of *C. crassiceps* is the presence of an apical cone in its anterior extremity. Among the 13 previously studied “pseudophyllideans” this structure was only described by Bâ et al. (2007) in *B. claviceps*. However, in *B. claviceps*, the apical cone is very long (around 6.6 μm) while in *C. crassiceps* this structure is short and measures about 600 nm.

The crested body is another structure that also marks the anterior part of the spermatozoon and is present in most but not all cestode spermatozoa. In the Bothriocephalidea, the crested body is present in almost all studied species except for a single taxon, *B. clavibothrium* (Świderski and Mokhtar-Maamouri 1980). The presence of the crested body is considered a synapomorphy for the eucestodes (Bâ and Marchand 1995). Posteriorly, Justine (1998) proposed the crested body as a synapomorphy in derived groups of cestodes, including the “Pseudophyllidea”. Therefore, the crested body is presumably absent in the most basal eucestodes, i.e., Caryophyllidea, Spathebothriidea, Haplobothriidea, and Trypanorhyncha (Levron et al. 2010). In light of the spermatozoon study presented here, as well as previous ones, the crested body is only present in bothriocephalidean cestodes, but not in diphyllbothriideans (see Table 1).

The anterior part of the spermatozoon of bothriocephalideans is characterized by the presence of a ring of thick

electron-dense cortical microtubules encircling the axoneme (Świdorski and Mokhtar-Maamouri 1980; Bruňanská et al. 2002, 2010; Levron et al. 2005, 2006a, b; Šípková et al. 2010, 2011). This feature has not been observed in the diphyllbothriideans *L. intestinalis* or *D. latum* (Levron et al. 2006c, 2009). However, an incomplete ring of cortical microtubules has been described in the diphyllbothriidean *D. fimbriata* (Justine 1986), but this observation requires confirmation. Later, in more posterior areas of the spermatozoon these cortical microtubules become thin and, consequently, two types of microtubules have been observed: the first type (thick cortical microtubules) forms the ring and is localized in the anterior part, and the second type (thin cortical microtubules) is localized posteriorly (Świdorski and Mokhtar-Maamouri 1980; Bruňanská et al. 2002, 2010; Levron et al. 2005, 2006a, b; Šípková et al. 2010, 2011). Among the Bothriocephalidae some species present particularities such as those in *B. claviceps* (Bâ et al. 2007) presenting a partial ring of cortical microtubules. Also, in *E. crassum* cortical microtubules had been initially attributed to a posterior area of the sperm cell (Bruňanská et al. 2002). Nonetheless, sections containing the ring of cortical microtubules were recently attributed to the anterior region of the spermatozoon (Bruňanská et al. 2010). In *T. nodulosus*, *B. scorpii*, and *E. rugosum*, this ring of cortical microtubules participates in the formation of the crested body (Levron et al. 2005, 2006b; Bruňanská et al. 2010). On the other hand, the first type of cortical microtubules generally stays in the first region of the spermatozoon, but in *B. claviceps* (Bâ et al. 2007) some electron-dense microtubules were found in the posterior areas of the sperm cell. According to Šípková et al. (2010), this ring of electron-dense cortical microtubules is only described in the spermatozoa of bothriocephalideans and may indicate a suitable spermatozoon character for recognition of divergent taxa. On the other hand, Levron et al. (2010) considered the ring of electron-dense cortical microtubules as a possible autapomorphy for the Bothriocephalidea. This fact is confirmed in the study of *O. sauridae* and *Senga* sp., (Šípková et al. 2011) and also in *C. crassiceps* in the present study.

The attachment zones indicate the area of fusion of the two free flagella with the median cytoplasmic process during spermiogenesis. These structures, observed in *C. crassiceps* during the present study, are also described in six other Bothriocephalidea namely *P. japonicus*, *B. scorpii*, *E. crassum*, *E. rugosum*, *O. sauridae*, and *Senga* sp. (Levron et al. 2006a, b; Bruňanská et al. 2010; Šípková et al. 2011); in two Diphyllbothriidea namely *L. intestinalis* and *D. latum* (Levron et al. 2006c, 2009); and in three Trypanorhyncha namely *Aporhynchus menezesi*, *Dollfusiiella spinulifera*, and *Parachristianella trygonis* (Miquel and Świdorski 2006; Miquel et al. 2007; Marigo et al. 2011b).

The posterior part of the spermatozoon of *C. crassiceps* as in *D. latum* (Levron et al. 2006c) shows only the nucleus. This posterior end in bothriocephalidean and diphyllbothriidean cestodes is variable even within the species and contains a nucleus, or a nucleus plus microtubules, or an axoneme (see Table 1). According to this variability, the posterior extremity of the spermatozoon does not appear to possess characters suitable for differentiating members of Bothriocephalidea and Diphyllbothriidea.

Acknowledgments We are grateful to the “Unitat de Microscòpia, Facultat de Medicina, Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB)” for their support in the preparation of samples, particularly Núria Cortadellas and Almudena García. The present study was partially funded by the Spanish project CTM2009-08602. Adji Mama Marigo benefits from doctoral grants (2009–2010 no. 0000448124 and 2010–2011 no. 0000538056) of “Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación, Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo MAEC-AECID”.

References

- Azzouz-Draoui N (1985) Étude ultrastructurale comparée de la spermiogenèse et du spermatozoïde de quatre Cestodes Diphyllidea. Thèse de 3^e Cycle, Université de Tunis, Tunis, Tunisie
- Bâ A, Bâ CT, Marchand B (2000) Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Sudarikovina taterae* (Cestoda, Cyclophyllidea, Anoplocephalidae) intestinal parasite of *Tatera gambiana* (Rodentia, Gerbillidae). *J Submicrosc Cytol Pathol* 32:137–144
- Bâ CT, Bâ A, Marchand B (2007) Ultrastructure of the spermatozoon of *Bothriocephalus claviceps* (Cestoda, Pseudophyllidea): a parasite of *Anguilla anguilla* (Fish, Teleostei). *Parasitol Res* 101:77–83. doi:10.1007/s00436-006-0445-z
- Bâ CT, Marchand B (1994) Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Mathevotaenia herpestis* (Cestoda), intestinal parasite of *Atelex albiventris* in Sénégal. *Acta Zool (Stockh)* 75:167–175. doi:10.1111/j.1463-6395.1994.tb01120.x
- Bâ CT, Marchand B (1995) Spermiogenesis, spermatozoa and phyletic affinities in the Cestoda. *Mém Mus Natl Hist Nat* 166:87–95
- Bâ CT, Marchand B (1998) Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Vampirolepis microstoma* (Cestoda, Hymenolepididae), intestinal parasite of *Rattus rattus*. *Microsc Res Tech* 42:218–225
- Bâ CT, Marchand B, Mattei X (1991) Demonstration of the orientation of the Cestodes spermatozoon illustrated by the ultrastructural study of spermiogenesis of a Cyclophyllidea: *Thysaniezia ovilla*, Rivolta, 1874. *J Submicrosc Cytol Pathol* 23:605–612
- Bray RA, Jones A, Anderson KI (1994) Order Pseudophyllidea Carus, 1863. In: Khalil LF, Jones A, Bray RA (eds) Key to the cestode parasites of vertebrates. CAB International, Wallingford, pp 205–247
- Bruňanská M (2009) Spermatological characters of the caryophyllidean cestode *Khawia sinensis* Hsü, 1935, a carp parasite. *Parasitol Res* 105:1603–1610. doi:10.1007/s00436-009-1599-2
- Bruňanská M, Fagerholm HP, Nebesářová J, Kostič B (2010) Ultrastructure of the mature spermatozoon of *Eubothrium rugosum* (Batsch, 1786) with a re-assessment of the spermatozoon ultrastructure of *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779) (Cestoda: Bothriocephalidea). *Helminthologia* 47:257–263. doi:10.2478/s11687-010-0040-9

- Bruňanská M, Nebesářová J, Scholz T (2003a) Ultrastructure of the spermatozoon of the proteocephalidean cestode *Proteocephalus torulosus* (Batsch, 1786). *Parasitol Res* 89:345–351. doi:10.1007/s00436-002-0757-6
- Bruňanská M, Nebesářová J, Scholz T, Fagerholm HP (2001) Spermiogenesis in the pseudophyllid cestode *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779). *Parasitol Res* 87:579–588. doi:10.1007/s004360100392
- Bruňanská M, Nebesářová J, Scholz T, Fagerholm HP (2002) Ultrastructure of the spermatozoon of the pseudophyllidean cestode *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779). *Parasitol Res* 88:285–291. doi:10.1007/s00436-001-0532-0
- Bruňanská M, Poddubnaya LG (2006) Spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Khawia armeniaca* (Cholodkovski, 1915). *Parasitol Res* 99:449–454. doi:10.1007/s00436-006-0155-6
- Bruňanská M, Poddubnaya LG (2010) Spermatological characters of the spathebothriidean tapeworm *Didymobothrium rudolphi* (Monticelli, 1890). *Parasitol Res* 106:1435–1442. doi:10.1007/s00436-010-1822-1
- Bruňanská M, Scholz T, Dezfuli BS, Poddubnaya LG (2006) Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Cyathocephalus truncatus* (Pallas 1781) Kessler 1868 (Cestoda: Spathebothriidea). *J Parasitol* 92:884–892. doi:10.1645/GE-718R1.1
- Bruňanská M, Scholz T, Ibraheem MH (2004a) Ultrastructural characters of the spermatozoon of the cestode *Corallobothrium solidum* Fritsch, 1886 (Cestoda: Proteocephalidea), a parasite of the electric catfish *Malapterurus electricus*. *Parasitol Res* 94:421–426. doi:10.1007/s00436-004-1236-z
- Bruňanská M, Scholz T, Ibraheem MH (2004b) Ultrastructural particularities of the spermatozoon of the cestode *Electrotaenia malapteruri* (Fritsch, 1886) (Proteocephalidae: Gangesiinae), a parasites of *Malapterurus electricus* (Siluriformes: Malapteruridae) from the river Nile, Egypt. *Parasitol Res* 93:114–120. doi:10.1007/s00436-004-1109-5
- Bruňanská M, Scholz T, Nebesářová J (2003b) Reinvestigation of the spermatozoon ultrastructure of the cestode *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800), a parasite of salmonid fish. *Parasitol Res* 91:357–362. doi:10.1007/s00436-003-0977-4
- Eira C, Miquel J, Vingada J, Torres J (2006) Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the cestode *Mosgovoyia ctenoides* (Cyclophyllidea: Anoplocephalidae), an intestinal parasite of *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha: Leporidae). *J Parasitol* 92:708–718. doi:10.1645/GE-818R.1
- Euzet L, Świdarski Z, Mokhtar-Maamouri F (1981) Ultrastructure comparée du spermatozoïde des Cestodes. Relations avec la phylogénèse. *Ann Parasitol (Paris)* 56:247–259
- Hoberg EP, Gardner SL, Campbell RA (1999) Systematics of the Eucestoda: advances toward a new phylogenetic paradigm, and observations on the early diversification of tapeworms and vertebrates. *Syst Parasitol* 42:1–12. doi:10.1023/A:1006099009495
- Hoberg EP, Mariaux J, Justine J-L, Brooks DR, Weekes PJ (1997) Phylogeny of the orders of the Eucestoda (Cercomeromorphae) based on comparative morphology: historical perspectives and a new working hypothesis. *J Parasitol* 83:1128–1147
- Justine J-L (1986) Ultrastructure of the spermatozoon of the cestode *Duthiersia fimbriata* (Pseudophyllidea, Diphyllbothriidae). *Can J Zool* 64:1545–1548
- Justine J-L (1991) Phylogeny of parasitic Platyhelminthes: a critical study of synapomorphies proposed on the basis of the ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa. *Can J Zool* 69:1421–1440
- Justine J-L (1998) Spermatozoa as phylogenetic characters for the Eucestoda. *J Parasitol* 84:385–408. doi:10.2307/3284502
- Justine J-L (2001) Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes. In: Littlewood DTJ, Bray RA (eds) *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, pp 231–238
- Kuchta R, Scholz T, Brabec J, Bray RA (2008a) Suppression of the tapeworm order Pseudophyllidea (Platyhelminthes: Eucestoda) and the proposal of two new orders, Bothriocephalidea and Diphyllbothriidae. *Int J Parasitol* 38:49–55. doi:10.1016/j.ijpara.2007.08.005
- Kuchta R, Scholz T, Bray RA (2008b) Revision of the order Bothriocephalidea Kuchta, Scholz, Brabec & Bray, 2008 (Eucestoda) with amended generic diagnoses and keys to families and genera. *Syst Parasitol* 71:81–136. doi:10.1007/s11230-008-9153-7
- Levron C, Bruňanská M, Kuchta R, Freeman M, Scholz T (2006a) Spermatozoon ultrastructure of the pseudophyllidean cestode *Paraechinophallus japonicus*, a parasite of deep-sea fish *Pseudonopsis anomala* (Perciformes, Centrolophidae). *Parasitol Res* 100:115–121. doi:10.1007/s00436-006-0224-x
- Levron C, Bruňanská M, Marchand B (2005) Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the pseudophyllidean cestode *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781). *Parasitol Res* 98:26–33. doi:10.1007/s00436-005-0009-7
- Levron C, Bruňanská M, Poddubnaya LG (2006b) Spermatological characters of the pseudophyllidean cestode *Bothriocephalus scorpii* (Muller, 1781). *Parasitol Int* 55:113–120. doi:10.1016/j.parint.2005.11.055
- Levron C, Bruňanská M, Poddubnaya LG (2006c) Spermatological characters in *Diphyllbothrium latum* (Cestoda, Pseudophyllidea). *J Morphol* 267:1110–1119. doi:10.1002/jmor.10460
- Levron C, Miquel J, Oros M, Scholz T (2010) Spermatozoa of tapeworms (Platyhelminthes, Eucestoda): advances in ultrastructural and phylogenetic studies. *Biol Rev* 85:523–543. doi:10.1111/j.1469-185X.2009.00114.x
- Levron C, Sitko J, Scholz T (2009) Spermiogenesis and spermatozoon of the tapeworm *Ligula intestinalis* (Diphyllbothriidae): phylogenetic implications. *J Parasitol* 95:1–9. doi:10.1645/GE-1646.1
- Marigo AM, Eira C, Bâ CT, Miquel J (2011a) Spermatological characters of *Acanthobothrium crassicolle* Wedl, 1855 (Tetryphylloidea, Onchobothriidae), a parasite of the common stingray *Dasyatis pastinaca*. *Acta Parasitol* 56:191–201. doi:10.2478/s11686-011-0025-y
- Marigo AM, Świdarski Z, Bâ CT, Miquel J (2011b) Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of the trypanorhynch cestode *Aporhynchus menezesi* (Aporhynchidae), a parasite of the velvet belly lanternshark *Etmopterus spinax* (Elasmobranchii: Etmopteridae). *Folia Parasitol* 58:69–78
- Miquel J, Świdarski Z (2006) Ultrastructure of the spermatozoon of *Dollfusella spinulifera* (Beveridge and Jones, 2000) Beveridge, Neifar and Euzet, 2004 (Trypanorhyncha, Eutetrarhynchidae). *Parasitol Res* 99:37–44. doi:10.1007/s00436-005-0094-7
- Miquel J, Świdarski Z, Mackiewicz JS, Ibraheem MH (2008) Ultrastructure of spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Wenyonia virilis* Woodland, 1923, with re-assessment of flagellar rotation in *Glaridacris catostomi* Cooper, 1920. *Acta Parasitol* 53:19–29. doi:10.2478/s11686-008-0013-z
- Miquel J, Świdarski Z, Młocicki D, Eira C, Marchand B (2005) Spermatogenesis in the anoplocephalid cestode *Gallegoides arfaai* (Mobedi et Ghadirian, 1977) Tenora et Mas-Coma, 1978. *Acta Parasitol* 50:132–144. doi:10.1007/s00436-004-1238-x
- Miquel J, Świdarski Z, Neifar L, Eira C (2007) Ultrastructure of the spermatozoon of *Parachristianella trygonis* Dollfus, 1946 (Trypanorhyncha, Eutetrarhynchidae). *J Parasitol* 93:1296–1302. doi:10.1645/GE-1193.1
- Mokhtar-Maamouri F (1982) Étude ultrastructurale de la spermiogenèse de *Acanthobothrium filicolle* var. *filicolle* Zschokke, 1888 (Cestoda, Tetryphylloidea, Onchobothriidae). *Ann Parasitol (Paris)* 57:429–442

- Mokhtar-Maamouri F, Świderski Z (1975) Étude en microscopie électronique de la spermatogénèse de deux Cestodes *Acanthobothrium filicolle benedenii* Loennberg, 1889 et *Onchobothrium uncinatum* (Rud., 1819) (Tetraphyllidea, Onchobothriidae). *Z Parasitenkd* 47:269–281. doi:10.1007/BF00389886
- Olson PD, Littlewood DTJ, Bray RA, Mariaux J (2001) Interrelationships and evolution of the tapeworm (Platyhelminthes: Cestoda). *Mol Phylogenet Evol* 19:443–467. doi:10.1006/mpev.2001.0930
- Quilichini Y, Foata J, Bâ CT, Marchand B (2007) Ultrastructure of the spermatozoon of *Calliobothrium verticillatum* (Cestoda, Tetraphyllidea, Oncobothriidae). *Acta Parasitol* 52:219–224. doi:10.2478/s11686-007-0037-9
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208–212
- Schmidt GD (1986) CRC handbook of tapeworm identification. CRC, Boca Raton, p 675
- Sène A, Bâ CT, Marchand B (1999) Ultrastructure of spermiogenesis of *Phyllobothrium lactuca* (Cestoda, Tetraphyllidea, Phyllobothriidae). *Folia Parasitol (Praha)* 46:191–198
- Šípková L, Levron C, Freeman M, Scholz T (2010) Spermiogenesis and spermatozoon of the tapeworm *Parabothriocephalus gracilis* (Bothriocephalidea): ultrastructural and cytochemical studies. *Acta Parasitol* 55:58–65. doi:10.2478/s11686-010-0003-9
- Šípková L, Levron C, Oros M, Justine J-L (2011) Spermatological characters of bothriocephalideans (Cestoda) inferred from an ultrastructural study on *Oncodiscus sauridae* and *Senga* sp. *Parasitol Res* (in press). doi:10.1007/s00436-010-2215-1
- Świderski Z (1986) Three types of spermiogenesis in cestodes. *Proc XIth Int Cong Electron Microsc*, Kyoto, Japan: 2959–2960
- Świderski Z, Mokhtar-Maamouri F (1980) Étude de la spermatogénèse de *Bothriocephalus clavibothrium* Ariola, 1899 (Cestoda: Pseudophyllidea). *Arch Inst Pasteur Tunis* 57:323–347
- Thiéry JP (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J Microsc* 6:987–1018
- Yoneva A, Levron C, Oros M, Orosová M, Scholz T (2011) Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Breviscolex orientalis* (Cestoda: Caryophyllidea). *Parasitol Res* 108:997–1005. doi:10.1007/s00436-010-2144-z

III.5. Etude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde du cestode *Echinobothrium euterpes* (Neifar, Tyler & Euzet 2001) Tyler 2006 (Diphyllidea), parasite de la raie commune, *Rhinobatos rhinobatos*

Résumé

La spermiogenèse et l'organisation ultrastructurale du spermatozoïde de *Echinobothrium euterpes* ont été étudiées au microscope électronique à transmission en y associant une analyse cytochimique pour la détection du glycogène. Le matériel a été récolté chez la raie guitare, *Rhinobatos rhinobatos*, pêchée dans le Golf de Gabès (Tunisie). La spermiogenèse chez *E. euterpes* est caractérisée par le développement orthogonal de deux flagelles inégaux, suivi par une rotation flagellaire et une fusion proximodistale de ces flagelles avec une expansion cytoplasmique médiane. Le caractère le plus important, spécifique aux cestodes Diphyllidea, est la présence de deux corps triangulaires, associés aux centrioles, constitués par de fins granules de matériel dense aux électrons, dépourvus de striations visibles et assimilés aux racines striées. Cette structure, seulement décrite chez les Diphyllidea, pourrait être considérée comme une synapomorphie pour cet ordre. Le processus de la spermiogenèse est aussi caractérisé par la présence d'un flagelle très court (environ 1 µm de long), observé durant tous les stades de la spermiogenèse. Ce type de flagelle n'a jamais été décrit chez un Diphyllidea et pourrait être considéré comme un caractère évolué du groupe. Durant les derniers stades de la spermiogenèse, ce flagelle court aurait dégénéré. De ce fait, le spermatozoïde mûr de *E. euterpes* présente un seul axonème de type 9+1 décrit chez les Trepaxonemata. Il présente également un unique corps en crête hélicoïdal, un noyau spiralé, très peu de microtubules corticaux parallèles et des granules de α-glycogène. Les similitudes et les différences entre les spermatozoïdes de Diphyllidea sont discutées.

Mots clés : spermiogenèse, spermatozoïde, ultrastructure, *Echinobothrium euterpes*, Diphyllidea, Cestoda

Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the diphyllidean cestode *Echinobothrium euterpes* (Neifar, Tyler and Euzet 2001) Tyler 2006, a parasite of the common guitarfish *Rhinobatos rhinobatos*

Adji Mama Marigo · Catarina Eira ·
Cheikh Tidiane Bâ · Jordi Miquel

Received: 3 February 2011 / Accepted: 23 February 2011 / Published online: 17 March 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Spermiogenesis and the ultrastructural characters of the spermatozoon of *Echinobothrium euterpes* are described by means of transmission electron microscopy, including cytochemical analysis for glycogen. Materials were obtained from a common guitarfish *Rhinobatos rhinobatos* caught in the Gulf of Gabès (Tunisia). Spermiogenesis in *E. euterpes* is characterized by the orthogonal development of two unequal flagella followed by the flagellar rotation and the proximodistal fusion of these

flagella with the median cytoplasmic process. The most interesting pattern characterizing the diphyllidean cestodes is the presence of a triangular body constituted by fines and dense granules without visible striation and assimilated at the striated rootlets. This pattern, only related in the Diphyllidea cestodes may be a synapomorphy of this order. Spermiogenesis is also characterized by the presence of a very short flagellum (around 1 µm long), observed in all the stages of spermiogenesis. This type of flagellum has never been commented in the diphyllidean cestodes and should be considered as an evolved character in this group. In the latest stage of spermiogenesis, this short axoneme probably degenerates. Thus, the mature spermatozoon of *E. euterpes* possesses only one axoneme of 9+“1” trepaxonematan pattern. It also exhibits a single helical electron-dense crested body, a spiraled nucleus, few parallel cortical microtubules, and α-glycogen granules. Similarities and differences between spermatozoa of diphyllideans are discussed.

A. M. Marigo · J. Miquel (✉)
Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i
Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia,
Universitat de Barcelona,
Av. Joan XXIII, sn,
E08028 Barcelona, Spain
e-mail: jordimiquel@ub.edu

A. M. Marigo · J. Miquel
Institut de Recerca de la Biodiversitat, Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona,
Av. Diagonal, 645,
E08028 Barcelona, Spain

C. Eira
CESAM & Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro,
Campus de Santiago,
3810–193 Aveiro, Portugal

C. Eira
Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem,
Estação de Campo de Quiaios,
Apartado 16 EC Quiaios,
3081–101 Figueira da Foz, Portugal

C. T. Bâ
Laboratoire de Parasitologie, Département de Biologie Animale,
Faculté des Sciences, Université Cheikh Anta Diop de Dakar,
Dakar, Senegal

Introduction

The phylogeny of the order of Diphyllidea has been controversial for a long time. Since recognition and validation of this group by various authors, there has been a divergence of opinion regarding the affinities of this order (Ivanov and Hoberg 1999; Tyler 2006). The justification for maintaining the Diphyllidea in an order range was strengthened (reinforced) by Caira et al. (1999, 2001) and Ivanov and Hoberg (1999), who demonstrated the monophyly of the order. In the most recent keys to the cestodes (Khalil et al. 1994), the order Diphyllidea was recognized as comprising three families: Echinobothriidae, Ditrachybothri-

diidae, and Macrobothriidae. This taxonomic status of the order was fairly stable, and was accepted by most, if not all, cestode systematists worldwide (Hoberg et al. 1997, 1999, 2001; Mariaux 1998; Caira et al. 1999; Olson et al. 2001). However, more recently, Tyler (2006) proposes in a monograph study that the order Diphyllidea only includes two genera and 36 species classified into two families (Echinobothriidae and Ditrachybothriidae). Posteriorly, with the description of six additional species namely *Echinobothrium diamanti* (Ivanov and Lipshitz 2006), *Echinobothrium sinensis* described as belonging to the genus *Macrobothridium* (Li and Wang 2007), *Echinobothrium minutamicum* (Twohig et al. 2008), *Echinobothrium nataliae*, *Echinobothrium reginae*, and *Echinobothrium vojtaei* (Kuchta and Caira 2010) the order currently count 42 valid species.

Echinobothrium euterpes described by Neifar et al. (2001) was firstly assigned to the genus *Macrobothridium*, which they considered as a valid genus. Later, Tyler (2006), based on a morphologic and phylogenetic analysis, considers the genus *Macrobothridium* as synonymous of *Echinobothrium*, and all the species were transferred into the later genus.

To date, only four species belonging to the genus *Echinobothrium* are ultrastructurally studied from a spermatological point of view. These are *Echinobothrium affine*, *Echinobothrium harfordi*, *Echinobothrium typus*, and *Echinobothrium brachysoma* (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88). In the present paper, the ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *E. euterpes* have been studied by means of transmission electron microscopy (TEM) in order to obtain more information on this genus, to resolve some spermatological gaps on the Diphyllidea (Levron et al. 2010) and to increase the spermiological general database of Eucestoda.

Materials and methods

Live specimens of *E. euterpes* were collected from the spiral intestine of the common guitarfish *Rhinobatos rhinobatos* caught in the Gulf of Gabès (Tunisia). The living cestodes were placed in a 0.9% NaCl solution. After dissection, different portions of mature proglottides containing testes and seminal ducts were normally processed for transmission electron microscope examination. Therefore, they were fixed in cold (4°C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4 for 2 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4, postfixed in cold (4°C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, dehydrated in an ethanol series and propylene oxide, and finally embedded in Spurr's resin. Ultrathin sections were

obtained using a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome, placed on copper grids and double-stained with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds methodology (Reynolds 1963). Ultrathin sections were examined using a JEOL 1010 TEM operated at an accelerating voltage of 80 kV.

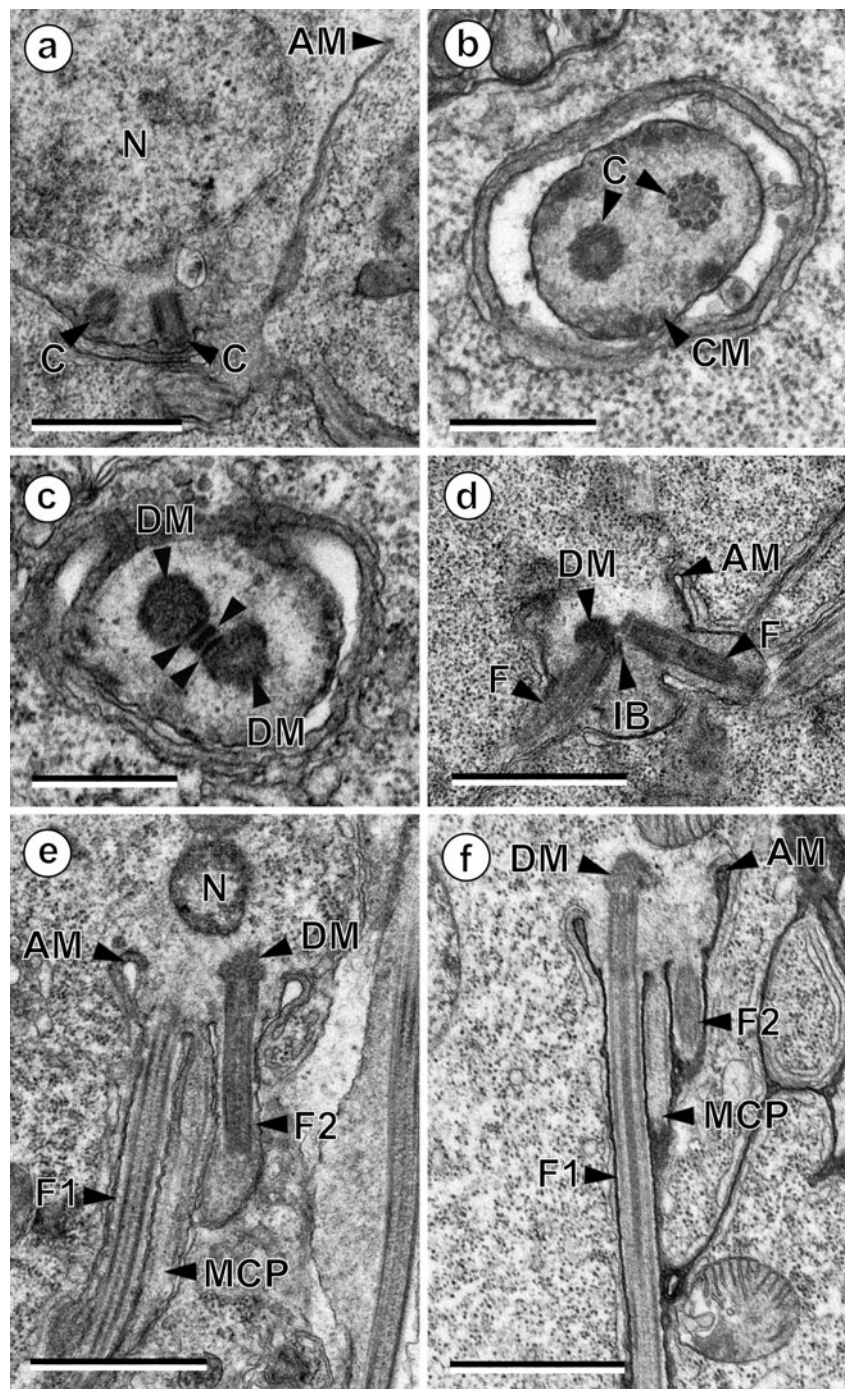
For proving the presence of glycogen particles, the Thiéry's technique (Thiéry 1967) was used. Gold grids were treated in periodic acid, thiocarbohydrazide, and silver proteinate (PA-TCH-SP) as follows: 30 min in 10% of PA, rinsed in distilled water, 24 h in TCH, rinsed in acetic solutions and distilled water, 30 min in 1% SP in the dark, and rinsed in distilled water.

Results

Spermiogenesis

In *E. euterpes*, spermiogenesis (Figs. 1, 2, 3) starts with the formation of a zone of differentiation at the periphery of each spermatid. This differentiation zone is a conical area containing nucleus and two centrioles and delimited at its base by a ring of arched membranes (Fig. 1a). In cross-section, the centrioles appear as formed by nine triplets (Fig. 1b) and are situated in a cytoplasmic protrusion bordered by few cortical microtubules (Fig. 1b). Each centriole supports a dense mass that is interpreted as homologous to a striated rootlet and both are separated by an intercentriolar body (Fig. 1c). The latter is formed by three electron-dense plates (Fig. 1c). The centrioles elongate and give rise to two unequal free flagella which grow orthogonal to a cytoplasmic extension and later rotate (Fig. 1d) and become parallel with the cytoplasmic process (Fig. 1e, f). The short flagellum presents more or less an equal longer in all the viewed spermatids and never exceeds 1 µm (Fig. 1e). Cross-section in the proximal region of the differentiation zone shows that the cortical microtubules are organized in two opposite fields of six to eight microtubules in both sides to the median cytoplasmic process (Fig. 2a). More posteriorly, in the lower part with one flagellum, this number decreases to one or two (Fig. 2b). The fusion of these three processes occurs in the so-called proximodistal fusion. In a later stage, the nucleus enlarges, moves across the ring of arched membranes, and initiates its migration along the spermatid body between the two axonemes (Fig. 2c). At this stage, the short flagellum is shown near the ring of arched membranes (Fig. 2c). After the migration of nucleus, the short axoneme takes down and is localized more distally in the spermatid (Fig. 2d). In advanced stages of spermiogenesis, an apical cone and the single helical crested body appear at the basis of the spermatid (Fig. 2e).

Fig. 1 Spermiogenesis in *E. euterpes*. **a** Zone of differentiation in the initial stage of spermiogenesis showing the presence of two centrioles (*C*). *AM* arched membranes, *N* nucleus. *Bar* 1 μ m. **b** Cross-section of the proximal part of the spermatid showing the nine triplets of centrioles (*C*). *CM* cortical microtubules. *Bar* 0.5 μ m. **c** Cross-section of a proximal area of the spermatid showing the three electron-dense plates forming the inter-centriolar body and both dense masses (*DM*). *Bar* 0.5 μ m. **d** Longitudinal section of a zone of differentiation during the flagellar rotation. *AM* arched membranes, *DM* dense mass, *F* flagellum, *IB* intercentriolar body. *Bar* 1 μ m. **e** Longitudinal section of a zone of differentiation after the flagellar rotation showing the aspect of the short flagellum (*F2*). *AM* arched membranes, *DM* dense mass, *F1* first flagellum, *MCP* median cytoplasmic process, *N* nucleus. *Bar* 0.5 μ m. **f** Another longitudinal section of the zone of differentiation after the flagellar rotation showing the difference of length between both flagella. *AM* arched membranes, *DM* dense mass, *F1* first flagellum, *F2* second flagellum, *MCP* median cytoplasmic process. *Bar* 0.5 μ m



Spermiogenesis finishes with the detachment of the spermatozoon from the residual cytoplasm as a result of the narrowing of the ring of arched membranes (Fig. 2e).

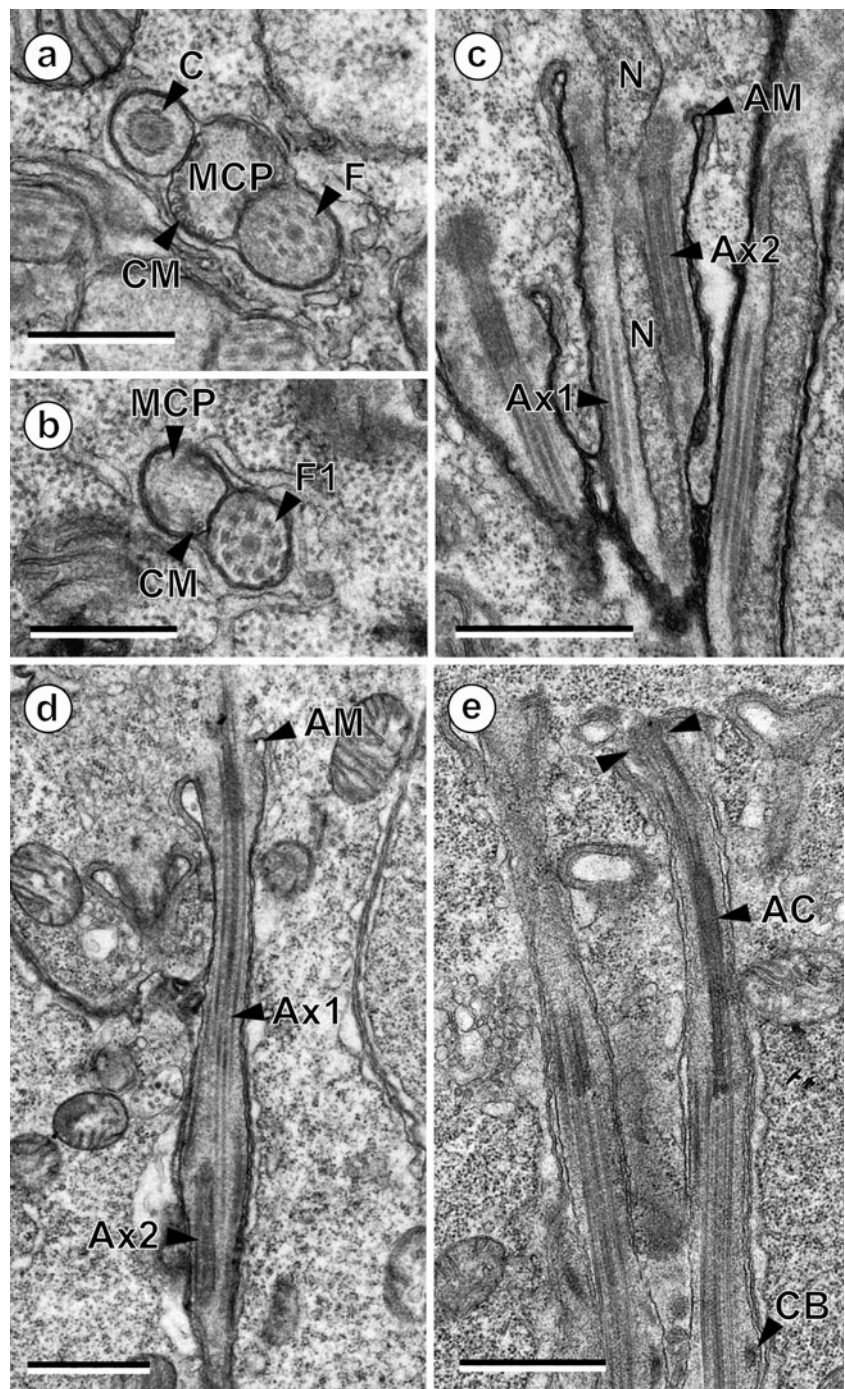
Spermatozoon

The mature spermatozoon of *E. euterpes* is a filiform cell, tapered at both extremities, and lacks mitochondrion (Figs. 4, 5, 6, 7). From the anterior to posterior extremity,

it is possible to distinguish four different regions (I–IV) with distinct ultrastructural characters and without any discontinuity.

Region I (Fig. 4a–g) corresponds to the anterior part of the gamete. The anterior tip consists of an electron-dense apical cone that is long and electron-dense (Fig. 4a) and is surrounded by the single crested body which begins its helical course more or less at the level of the anterior spermatozoon extremity and attains the axoneme (Fig. 4a,

Fig. 2 Spermiogenesis in *E. euterpes*. **a** Cross-section of the spermatid showing both flagella (*F*) and the number of cortical microtubules (*CM*) in the proximal part of the median cytoplasmic expansion (*MCP*). *C* centriole. Bar 0.5 μ m. **b** Cross-sections of spermatids showing the decreasing of the number cortical microtubules (*CM*) at a distal level of the spermatid containing the first flagellum (*F1*). *MCP* median cytoplasmic process. Bar 0.5 μ m. **c** Longitudinal section of a zone of differentiation after the proximodistal fusion of axonemes (*Ax1* and *Ax2*) showing the migration of the nucleus (*N*). (Note the position of the short axoneme). *AM* arched membranes. Bar 1 μ m. **d** Longitudinal section of the spermatid after the penetration of the nucleus, showing the downward position of the short axoneme (*Ax2*). *AM* arched membranes, *Ax1* first axoneme. Bar 1 μ m. **e** Longitudinal section of a spermatid in a final stage of spermiogenesis showing the appearance of the apical cone (*AC*) and the crested body (*CB*). Note the constriction of the ring of arched membranes. Bar 1 μ m

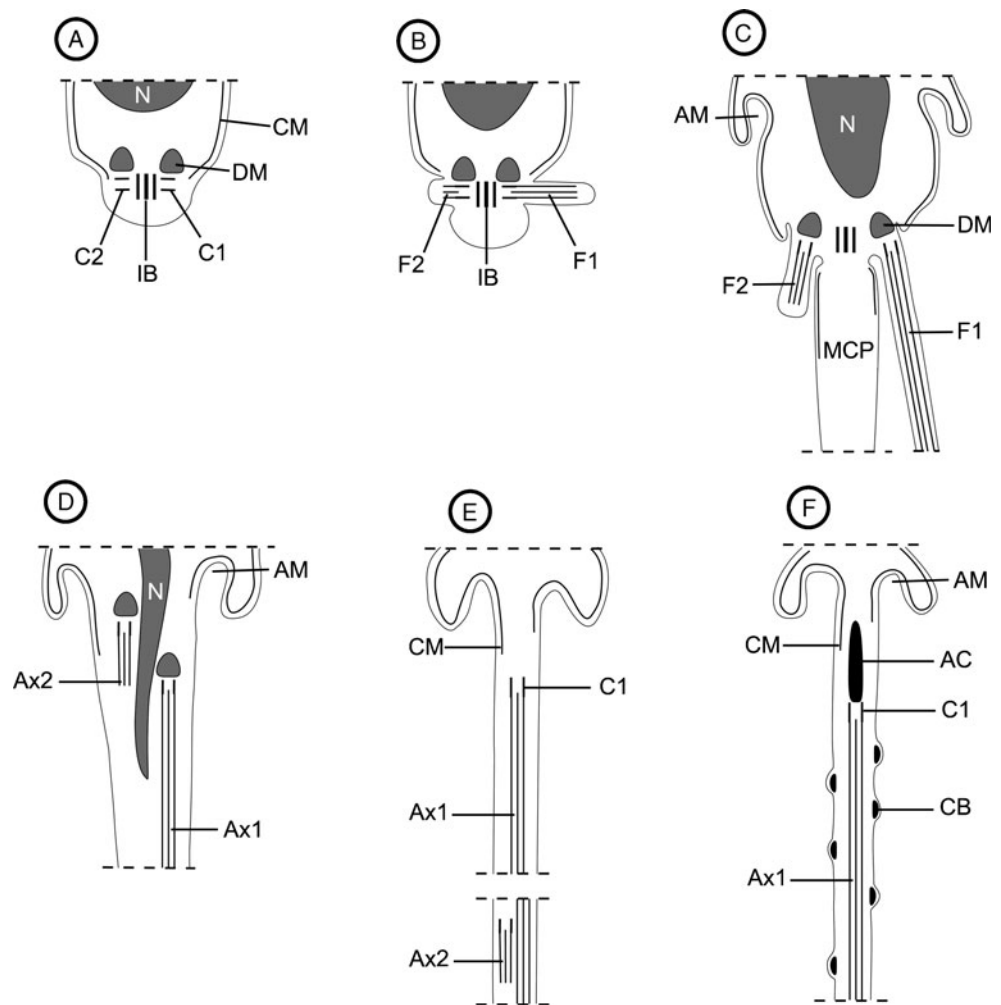


b). The anterior spermatozoon extremity is electron-lucent (Fig. 4b). In cross-section, this apical cone appears as an assemblage of some electron-dense tubular structures (Fig. 4c) coiled by the crested body (Fig. 4c). Later, the centriole appears (Fig. 4d, e) which announces the beginning of the axoneme (Fig. 4f). The axoneme of the 9+“1” trepaxonematan pattern is centrally positioned. This region has a particularity to possess few parallel

cortical microtubules only present in a short area (Fig. 4f). In fact, this is the only part of the male gamete that contains cortical microtubules. Region I finishes with the disappearance of the crested body (Fig. 4g).

Region II (Fig. 5a–d) represents the area of the spermatozoon located between the crested body and the nuclear areas. In the areas of this region the axoneme is only surrounded by the plasma membrane (Fig. 5a, b).

Fig. 3 Diagram showing the main stages of spermiogenesis in *E. euterpes*. *AC* apical cone, *AM* arched membranes, *Ax1* axoneme 1, *Ax2* axoneme 2, *C1* centriole 1, *C2* centriole 2, *CB* crested body, *CM* cortical microtubules, *DM* dense mass, *F1* flagellum 1, *F2* flagellum 2, *IB* intercentriolar body, *MCP* median cytoplasmic process, *N* nucleus



Later granules of glycogen granules become gradually visible in the middle part of this region and are uniformly distributed around the axoneme (Fig. 5a, c, d).

Region III (Figs. 5d–f, 6a) corresponds to the nuclear region of the spermatozoon. The nucleus is spiraled around the single axoneme (Fig. 5d). In cross-sections, it appears horseshoe in form and partially encircles the axoneme (Fig. 5e). The granules of glycogen are still present and are isolated in the opposite side without nucleus. The Thiéry's test has permitted to determine that this electron-dense granular material is glycogen (β -glycogen type; Fig. 5f). At the end of this region, the dimension of the nuclear spire decreases and the nucleus progressively disappears (Fig. 6a).

Region IV (Fig. 6a–e) corresponds to the postnuclear area of the spermatozoon containing only the axoneme coiled by granules of glycogen (Fig. 6a). In the posterior end, these granules decreased in number and form a thin layer roughly the axoneme (Fig. 6b). The axoneme becomes progressively disorganized towards the distal end of this region (Fig. 6c–e): firstly the peripheral doublets become disorganized (Fig. 6c), break apart into

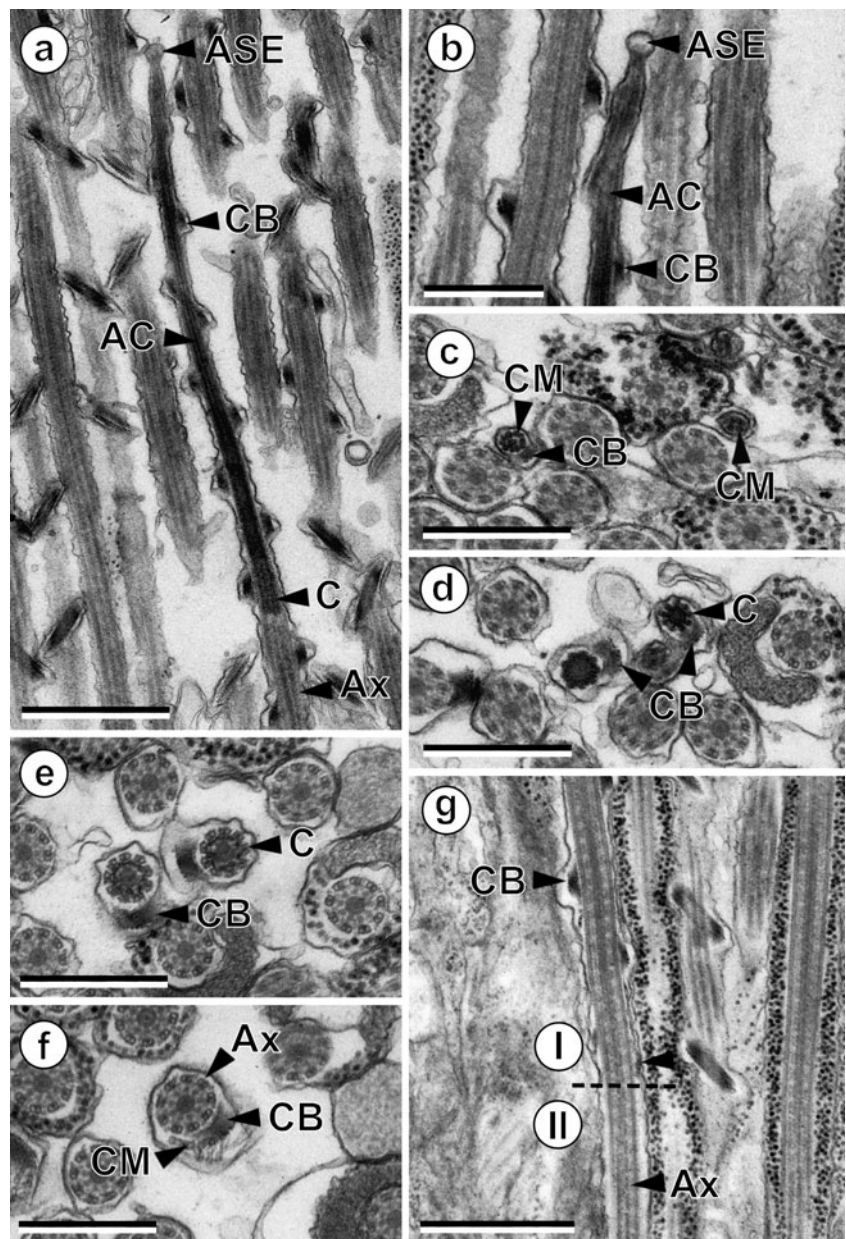
singlets encircling the central core (Fig. 6d); afterwards the central core disappears. The granules of glycogen reach up the vicinity of the posterior tip of the spermatozoon (Fig. 6e).

Discussion

Spermiogenesis

Spermiogenesis in *E. euterpes* involves a differentiation zone with a symmetric median cytoplasmic process with very few peripheral microtubules. It exhibits also three electron-dense plates that constitute the intercentriolar body separating two centrioles which support two dense masses corresponding to the typical striated roots. Each centriole grows and forms a free flagellum which rotates and later fuses with the median cytoplasmic process. This pattern is assimilated to the type I spermiogenesis of Bâ and Marchand (1995) and is registered in most of the Diphyllidea (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88) with the

Fig. 4 Mature spermatozoon of *E. euterpes*. **a** Longitudinal section of the apical cone (AC) surrounded by the crested body (CB). ASE anterior spermatozoon extremity, Ax axoneme, C centriole Bar 1 μm . **b** Detail of the anterior spermatozoon extremity (ASE). AC apical cone, CB crested body. Bar 0.5 μm . **c–f** Consecutive cross-sections from the anterior spermatozoon extremity to the appearance of the axoneme. Note the presence of some cortical microtubules (CM) in the axoneme area. Ax axoneme, C centriole, CB crested body, CM cortical microtubules. Bar 0.5 μm . **g** Longitudinal section showing the transition area between regions I and II. Note the end of the crested body (arrowhead). Ax axoneme, CB crested body. Bar 1 μm



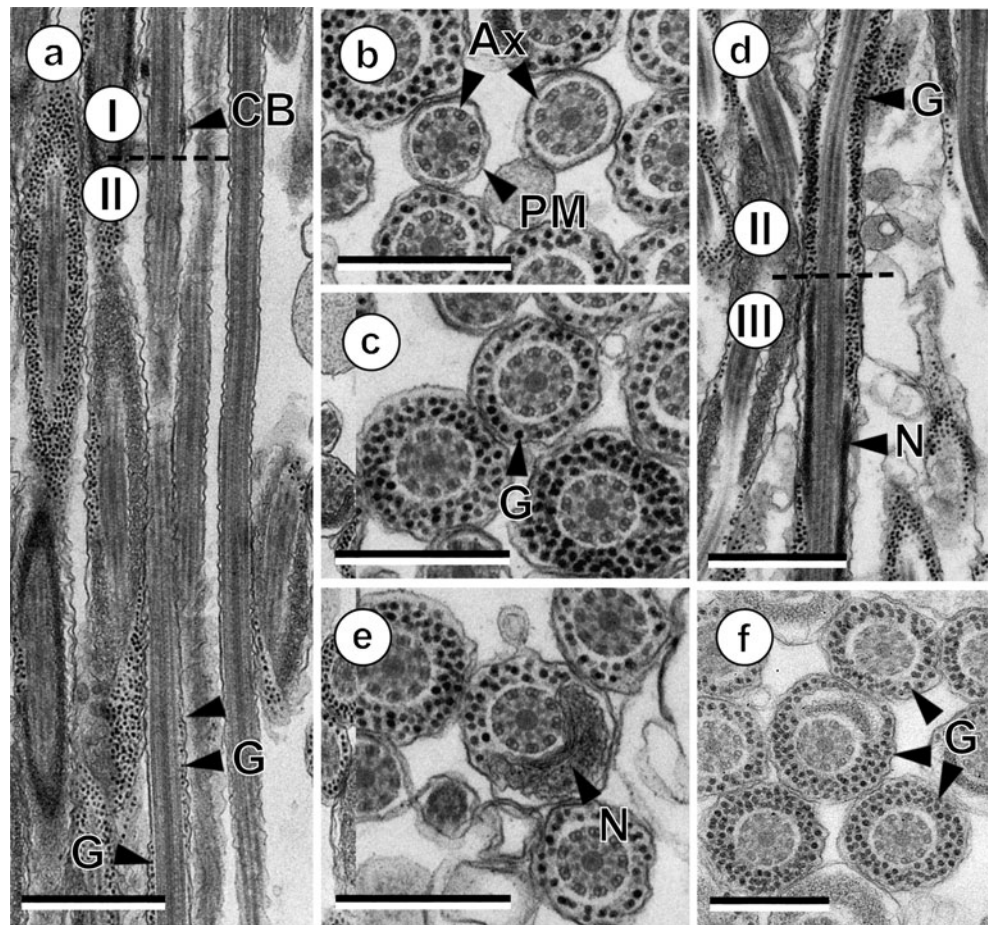
exception of *E. harfordi* in which the flagellar bud does not participate at the spermiogenesis process (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88). Subsequently, *E. harfordi* possesses the type II spermiogenesis contrary to the other Diphyllidea.

The type I spermiogenesis in *E. typus*, *E. brachysoma*, *E. affine* (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88), and *E. euterpes* is globally similar but offers some particularities. All the studied diphyllideans exhibit dense masses at the place of the striated rootlets. This structure shows a granular aspect and has a triangular form. Dense masses are only reported in diphyllidean species and

might be capable to play the same function that the striated rootlets. Thus, this character only found in Diphyllidea could be considered as a synapomorphy for this order.

The intercentriolar body in the Diphyllidea comprises several parallel disk-shaped plates of different electron density. As occurs in *E. euterpes* in the present study, three electron-dense plates form the intercentriolar body also in *E. typus* and in *E. brachysoma*. (Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88). On the contrary, *E. harfordi* possesses five electron-dense plates (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88) and in *E. affine* the number of plates constituting the intercentriolar body is undefined and composed by

Fig. 5 Mature spermatozoon of *E. euterpes*. **a** Another longitudinal section of the transition area between region I and II showing the appearance of granules of glycogen (*G*) in the Region II (arrowhead). *CB* crested body. Bar 1 μm . **b** Cross-sections of the Region II before the appearance of granules of glycogen. *Ax* axoneme, *PM* plasma membrane. Bar 0,5 μm . **c** Several cross-sections of the glycogen area (*G*). Bar 0,5 μm . **d** Longitudinal section of the transition zone between regions II and III (nuclear region). *G* granules of glycogen, *N* nucleus. Bar 1 μm . **e** Cross-section of the nuclear region showing the nucleus (*N*) in a horseshoe shape. Bar 1 μm . **f** Several regions of spermatozoon showing the presence of glycogen (*G*) evidenced by the method of Thiéry. Bar 0.5 μm

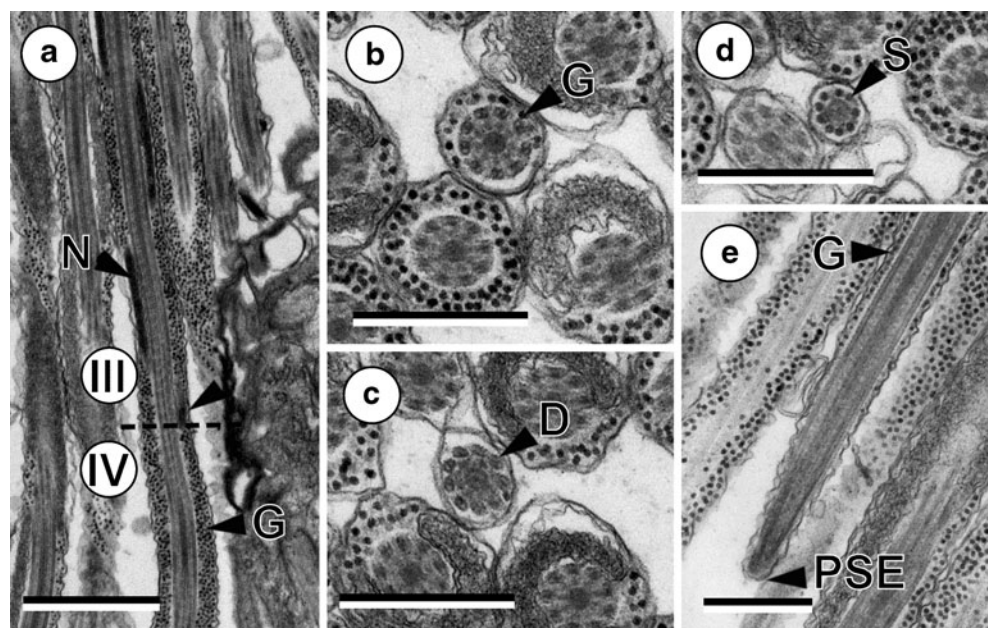


multiple electron-dense plates, approximately ten (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88). The heterogeneity of this character within species belonging to

the same order is not sufficient for indicate a possible polyphyly of this order.

The most interesting feature evidenced in the present study is the presence in the differentiation zone of two

Fig. 6 Mature spermatozoon of *E. euterpes*. **a** Longitudinal section of the transition zone between regions III and IV. *N* nucleus. Note the end of the nucleus (arrowhead). Bar 1 μm . **b** Cross-section of the postnuclear area showing the decreasing of the granules of glycogen (*G*). Bar 0,5 μm . **c, d** Consecutive cross-sections of the posterior area of the spermatozoon showing the disorganization of the axoneme. *D* doublets, *S* singlets. Bar 0.5 μm . **e** Longitudinal section of the posterior area of the spermatozoon. Note the presence of the granules of glycogen in this zone. *G* granules of glycogen, *PSE* posterior spermatozoon extremity. Bar 0.5 μm



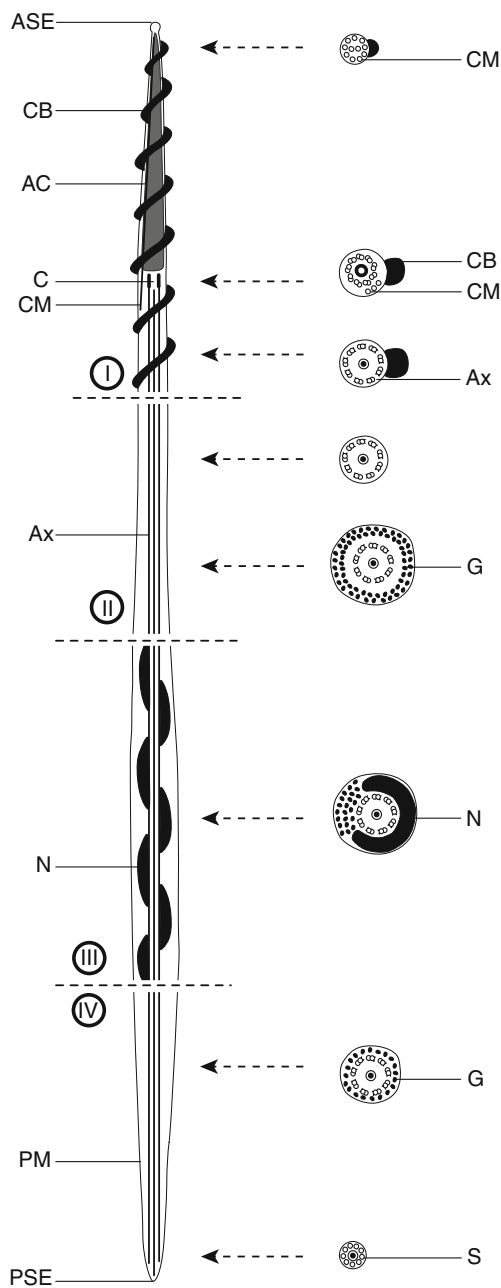


Fig. 7 Schematic reconstruction of the mature spermatozoon of *E. euterpes*. To simplify the diagram, the granules of glycogen are not shown in the longitudinal section. *AC* apical cone, *ASE* anterior spermatozoon extremity, *Ax* axoneme, *C* centriole, *CB* crested body, *CM* cortical microtubules, *G* glycogen, *N* nucleus, *PM* plasma membrane, *PSE* posterior spermatozoon extremity, *S* singlets

types of flagellum: a well-developed flagellum and a short flagellum. The later grows, but never exceed 1 μm . Very similar pattern is viewed in *E. harfordi* in which the differentiation zone shows two centrioles that give rise to a well-developed flagellum and a flagellar bud that persists but later disappears after the migration of the nucleus (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-

Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88). However, this flagellar bud does not participate at the spermiogenesis process, whereas in *E. euterpes*, the short flagellum contributes to the process of spermiogenesis and subsists after the nuclear migration.

According to Justine (1998) the general diagram of spermiogenesis described in the Diphyllidea contains two unequal flagella; one flagellum as shorter than the other and thus *E. harfordi* could be simply considered as an extreme case in which the shorter flagellum is particularly reduced. This reduction of the axoneme should be an evolved character and then the spermiogenesis pattern in *E. harfordi* (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88) and *E. euterpes* could be considered more evolved than the remaining diphyllideans.

Contrary to that viewed in other Eucestoda, in the Diphyllidea, the distribution of cortical microtubules in the spermatid cells is curious. In *E. brachysoma* as in *E. typus* (Azzouz-Draoui 1985), very few microtubules are described only in the early stages of spermiogenesis; while in *E. harfordi*, microtubules were reported as lacking or difficult to distinguish (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88). In contradiction with these three species, *E. affine* (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88) possesses peripheral microtubules arranged in two fields along the median cytoplasmic expansion and *E. euterpes* also presents cortical microtubules in all the spermiogenesis stages, but they are restricted in the proximal part of the differentiation zone. This lack and/or paucity of cortical microtubules, is only related in Diphyllidea and may be an important pattern restricted only in this group.

The great differences observed between these five species belonging to a same genus, indicate that further observation is needed for validate o refute the heterogeneity of the ultrastructural characters of the spermiogenesis of this group. Additionally, spermiogenesis in *E. harfordi* and *E. euterpes* resembles that of the tetraphyllidean Phyllobothriidae *Phyllobothrium lactuca* (Sène et al. 1999). The latter shows the Bâ and Marchand's type I spermiogenesis and presents both a long and a short flagella as occurs in *E. euterpes*, although all the remaining phyllobothriids present the type II (Mokhtar-Maamouri 1979; Euzet et al. 1981; MacKinnon and Burt 1984). Indeed, it is an intermediated character because this pattern may be considered as comprising between type I and II spermiogenesis but it is more similar to the type II in which one flagellum degenerates or is not formed. The type II spermiogenesis is described in cestodes belonging to the Tetraphyllidea–Phyllobothriidae (Mokhtar-Maamouri 1979; Euzet et al.

1981; MacKinnon and Burt 1984), Caryophyllidea (Świderski and Mackiewicz 2002; Arafa and Hamada 2004; Bruňanská and Poddubnaya 2006; Gamil 2008; Miquel et al. 2008; Bruňanská 2009; Yoneva et al. 2011) and Mesocestoididae (Miquel et al. 1999, 2007a) and is basically characterized by the formation of two centrioles but only one of them gives a flagellum. The single flagellum grows orthogonally, rotates, and fuses with the cytoplasmic extension. Finally, the previous differentiation zone with one flagellum and one flagellar bud produces a mature sperm cell with only one axoneme.

Spermatozoon

The mature spermatozoon of the five Diphyllidea examined until now shows three different patterns (types I, II, and IV) according to Levron et al. (2010). The type I spermatozoon exhibited by the species of Spathebothriidea (Bruňanská et al. 2006; Bruňanská and Poddubnaya 2010) Diphyllbothriidea (Levron et al. 2006a, 2009), Haplobothriidea (MacKinnon and Burt 1985), Trypanorhyncha (Miquel and Świderski 2006; Miquel et al. 2007b; Marigo et al. 2011), and Diphyllidea (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88) is characterized by the presence of two axonemes, parallel cortical microtubules and parallel nucleus, and by the lacking of crested body. The type II spermatozoon reported in Botriocephalidea (Świderski and Mokhtar-Maamouri 1980; Bruňanská et al. 2002; Levron et al. 2005, 2006b, c; Bâ et al. 2007; Šípková et al. 2010, 2011), Tetrphyllidea-Onchobothriidae (Mokhtar-Maamouri and Świderski 1975; Mokhtar-Maamouri 1982; Quilichini et al. 2007), Proteocephalidea (Świderski and Eklun-Natey 1978; Sène et al. 1997; Bruňanská et al. 2003a, b, 2004a, b), and Diphyllidea (Azzouz-Draoui 1985) is characterized by the presence of two axonemes, helical crested body, parallel nucleus, and parallel cortical microtubules. The type IV spermatozoon, characterized by the presence of one axoneme, helical crested body, parallel nucleus, and parallel cortical microtubules, is described in some Tetrphyllidea-Phyllobothriidae (Mokhtar-Maamouri 1979; MacKinnon and Burt 1984), in the Mesocestoididae cyclophyllideans (Miquel et al. 1999, 2007a) and in certain Diphyllidea (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88 and present study). According to this classification of the spermatozoon of eucestodes (Levron et al. 2010) there are some problematic spermatozoa difficult to place. It is the case of *Sandonella sandoni* (Bâ and Marchand 1994), a Proteocephalidea which presents only one axoneme, or the commented case of *P. lactuca* (Sène et al. 1999) or *Trilocularia acanthiaevulgaris* (Mahendrasingam et al. 1989), two Phyllobothriidae which present two axonemes. These partic-

ular patterns observed in these species could be considered as evolved characters.

Considering diphyllidean species, in *E. affine*, *E. brachysoma*, and *E. typus* (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88), an apparently plesiomorphic pattern of spermiogenesis engenders a spermatozoon with two axonemes that are longitudinally well displaced, and make that the zone with two axonemes become quasi inexistent. A single helical crested body is also described in the anterior part of spermatozoa of *E. brachysoma* and *E. typus*, therefore the male gamete of this two species is most similar to the type II of Levron et al. (2010). In contrast, no crested body is related in *E. affine* (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88) which is included in the type I spermatozoon. Type IV is related in *E. harfordi* (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88) and in our study in *E. euterpes*. The mature spermatozoon contains only a single axoneme, a helical crested body and nucleus.

In *E. euterpes*, although in the final stage of spermiogenesis the short flagellum was evidenced, the observation of numerous sections from different specimens permits us to affirm that a possible overlapping region of the two axonemes is absent in the mature spermatozoon of this species and, thus we conclude that one of the axonemes (the short one) degenerate at the end of spermiogenesis as in *E. harfordi* (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88).

The most interesting components of all the mature spermatozoon of Eucestoda include the presence of cortical microtubules. However, in the Diphyllidea, to date, cortical microtubules are only related in the mature spermatozoon of *E. affine* (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88). In *E. euterpes*, a short and reduced in number bundle of parallel cortical microtubules are observed only in the first part of the spermatozoon, precisely in the region with crested body.

In the review of sperm ultrastructure, Justine (1998) supposed that the absence of microtubules in diphyllidean has been a problem of fixation and judged more prudent to consider that microtubules are present in all species. However, the present study of *E. euterpes* confirms that cortical microtubules lack or is strongly reduced in the diphyllidean cestodes (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88 and present study).

There is a spiraled horseshoe-shaped nucleus encircling the axoneme in *E. euterpes* as occurs in other diphyllideans

such as *E. harfordi*, *E. typus*, and *E. brachysoma* (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88). This pattern also makes additional difficulties to class these sperm cells into the classification of Levron et al. (2010) because the type I and II spermatozoon present a parallel nucleus. Thus, from the five species studied, only the mature spermatozoon of *E. affine* (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88) corresponds to the description of Levron et al. (2010) with a parallel nucleus.

The ultrastructure of the posterior area of the spermatozoon in *E. euterpes* shows only the axoneme surrounded by the plasma membrane with some granules of glycogen. The distal tip of the spermatozoon of *E. euterpes* is characterized by the transformation of doublets into singlets previously to the disappearance of the central core unit. This schema is not in agreement with those found in the previously studied diphyllideans (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88). The general schema of the posterior type includes firstly the disappearance of the central core, and more posteriorly the transformation of the peripheral doublets into singlets (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88). The β -glycogen gran-

ules are present in all the studied diphyllideans (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88 and present study) and only *E. affine* presents both types, α - and β -glycogen (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88; see Table 1). The presence of granules of glycogen at the bottom of the sperm cell in *E. euterpes* and this pronounced presence in all the Diphyllidea (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1984; Azzouz-Draoui 1985; Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri 1986/88) would permit to think that they should compensate the absence of cortical microtubules.

Conclusion

The most important character in the spermatozoon of cestodes named “number of axonemes” is problematic in the Diphyllidea. The number of axonemes in the sperm cell is one of the most interesting phylogenetical component concerning spermatological characters. During spermiogenesis, *E. harfordi* possesses a flagellum and a flagellar bud; *E. euterpes*, *E. typus*, and *E. brachysoma* exhibits both short and long flagella, while in *E. affine* the short flagellum likes to more developed than in the other species.

Table 1 Spermatological characters in the diphyllidean cestodes

Species	Spermiogenesis							Spermatozoon								
	Type	FR	PF	IB	DM	CM	F	Type	ASE	AC	CB	CM	NAx	N	G	PSE
<i>Echinobothrium typus</i> Azzouz-Draoui (1985)	I	+	+	3	+	+	2	II	Ax	?	+	-	2	S	β	Ax
<i>Echinobothrium brachysoma</i> Azzouz-Draoui (1985)	I	+	+	3	+	?	2	II	Ax	?	+	-	2	S	β	Ax
<i>Echinobothrium affine</i> Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui (1984) Azzouz –Draoui (1985) Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri (1986/88)	I	+	+	≈ 10	+	+	2	I	CM	?	-	+	2	P	α, β	Ax
<i>Echinobothrium harfordi</i> Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui (1984) Azzouz –Draoui (1985) Azzouz-Draoui and Mokhtar-Maamouri (1986/88)	II	+	+	5	+	+	1+IB	IV	Ax	?	+	-	1	S	β	Ax
<i>Echinobothrium euterpes</i> Present study	I	+	+	3	+	+	2	IV	CM	+	+	+	1	S	β	Ax

Spermiogenesis types are considered according Bâ and Marchand (1995)

Spermatozoa types are considered according Levron et al. (2010)

Spermiogenesis characters: *B* cytoplasmic bud, *CM* cortical microtubules, *DM* dense mass, *F* number of flagella, *FR* flagellar rotation, *IB* number of plates of intercentriolar body, *PF* proximodistal fusion

Spermatozoon characters: *AC* apical cone, *ASE* anterior spermatozoon extremity, *Ax* axoneme, *CB* crested body, *CM* cortical microtubules, *G* type of glycogen, *N* nucleus, *NAx* number of axonemes, *P* parallel, *PSE* posterior spermatozoon extremity, *S* spiraled

+/- presence/absence of character, ? unknown data or required to be confirmed

In the mature spermatozoon, the number of axonemes becomes unclear.

In the Diphyllidea the spermiogenesis is globally coherent between species and presents more or less the same characteristics, but the pattern of the spermatozoon is so variable that is urgent to perform additional studies in order to resolve this problem and elucidate the real design of the sperm cell.

In our opinion, the previous studies of diphyllideans were not complete or were wrongly interpreted. At this time spermatological studies have not so developed than to date, and we think that the spermatozoon described in previous diphyllideans should be contain only one axoneme after the degeneration of one of them in final stages of spermiogenesis. This hypothesis should explain the spiraled form of the nucleus and the infrequency and/or absence of the sections with two axonemes.

Acknowledgments We are thankful to Lassad Neifar from the “Département des Sciences de la Vie de la Faculté des Sciences de Sfax” (Tunisia) for its valuable help in the field work. We are also thankful to “Servei de Microscòpia, Facultat de Medicina, Centre Científic i Tecnològic de la Universitat de Barcelona (CCiTUB)”, particularly Núria Cortadellas and Almudena García, for their support in the preparation of samples. This study was partially supported by the Spanish grants from the “Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID)” of the “Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación (MAEC)” (no. A/2390/05 and no. A/6244/06). Adji Mama Marigo benefits from MAEC-AECID doctoral grants (2009–10, no 0000448124 and 2010–11, no 0000538056).

References

- Arafa SZ, Hamada SF (2004) Spermatogenesis and sperm ultrastructure of the caryophyllidean cestode, *Monobothrioides chalmersius* (Woodland, 1924) Hunter, 1930. *Egypt J Zoology* 43:49–70
- Azzouz-Draoui N (1985) Étude ultrastructurale comparée de la spermiogénèse et du spermatozoïde de quatre Cestodes Diphyllidea. Thèse de 3^e Cycle, Université de Tunis, Tunis, Tunisie
- Azzouz-Draoui N, Mokhtar-Maamouri F (1986/88) Ultrastructure comparée de la spermiogénèse et du spermatozoïde de *Echinobothrium affine* Diesing, 1863 et *E. harfordi* Mac Vicar, (Cestoda, Diphyllidea). *Bull Soc Sci Nat Tunis* 18:9–20
- Bâ CT, Marchand B (1994) Ultrastructure of the spermatozoon of *Sandonella sandoni* (Cestoda, Proteocephalidea, Sandonellinae). *Invertebr Reprod Dev* 25:9–17
- Bâ CT, Marchand B (1995) Spermiogenesis, spermatozoa and phyletic affinities in the Cestoda. *Mém Mus Natl Hist Nat* 166:87–95
- Bâ CT, Bâ A, Marchand B (2007) Ultrastructure of the spermatozoon of *Bothriocephalus claviceps* (Cestoda, Pseudophyllidea): a parasite of *Anguilla anguilla* (Fish, Teleostei). *Parasitol Res* 101:77–83. doi:10.1007/s00436-006-0445-z
- Bruňanská M (2009) Spermatological characters of the caryophyllidean cestodes *Khawia sinensis* Hsü, 1935, a carp parasite. *Parasitol Res* 105:1603–1610. doi:10.1007/s00436-009-1599-2
- Bruňanská M, Poddubnaya LG (2006) Spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Khawia armeniaca* (Cholodkovski, 1915). *Parasitol Res* 99:449–454. doi:10.1007/s00436-006-0155-6
- Bruňanská M, Poddubnaya LG (2010) Spermatological characters of the spathebothriidean tapeworm *Didymobothrium rudolphii* (Monticelli, 1890). *Parasitol Res* 106:1435–1442. doi:10.1007/s00436-010-1822-1
- Bruňanská M, Nebesářová J, Scholz T, Fagerholm HP (2002) Ultrastructure of the spermatozoon of the pseudophyllidean cestode *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779). *Parasitol Res* 88:285–291. doi:10.1007/s00436-001-0532-0
- Bruňanská M, Nebesářová J, Scholz T (2003a) Ultrastructure of the spermatozoon of the proteocephalidean cestode *Proteocephalus torulosus* (Batsch, 1786). *Parasitol Res* 89:345–351. doi:10.1007/s00436-002-0757-6
- Bruňanská M, Scholz T, Nebesářová J (2003b) Reinvestigation of the spermatozoon ultrastructure of the cestode *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800), a parasite of salmonid fish. *Parasitol Res* 91:357–362. doi:10.1007/s00436-003-0977-4
- Bruňanská M, Scholz T, Ibraheem MH (2004a) Ultrastructural characters of the spermatozoon of the cestode *Corallobothrium solidum* Fritsch, 1886 (Cestoda: Proteocephalidea), a parasite of the electric catfish *Malapterurus electricus*. *Parasitol Res* 94:421–426. doi:10.1007/s00436-004-1236-z
- Bruňanská M, Scholz T, Ibraheem MH (2004b) Ultrastructural particularities of the spermatozoon of the cestode *Electrotaenia malopteruri* (Fritsch, 1886) (Proteocephalidae: Gangesinae), a parasites of *Malapterurus electricus* (Siluriformes: Malapteruridae) from the river Nile, Egypt. *Parasitol Res* 93:114–120. doi:10.1007/s00436-004-1109-5
- Bruňanská M, Scholz T, Dezfuli BS, Poddubnaya LG (2006) Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Cyathocephalus truncatus* (Pallas 1781) Kessler 1868 (Cestoda, Spathebothriidea). *J Parasitol* 92:884–892. doi:10.1645/GE-718R.1
- Caira JN, Jensen K, Healy CJ (1999) On the phylogenetic relationships among tetraphyllidean, lecanicephalidean and diphyllidean tapeworm genera. *Syst Parasitol* 42:77–151. doi:10.1023/A:1006192603349
- Caira JN, Jensen K, Healy CJ (2001) Interrelationships among tetraphyllidean and lecanicephalidean cestodes. In: Littlewood DTJ, Bray RA (eds) *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, pp 135–158
- Euzet L, Świdorski Z, Mokhtar-Maamouri F (1981) Ultrastructure comparée du spermatozoïde des Cestodes. Relations avec la phylogénèse. *Ann Parasitol (Paris)* 56:247–259
- Gamil IS (2008) Ultrastructural studies of the spermatogenesis and spermiogenesis of the caryophyllidean cestode *Wenyonia virilis* (Woodland, 1923). *Parasitol Res* 103:777–785. doi:10.1007/s00436-008-1040-2
- Hoberg EP, Mariaux J, Justine J-L, Brooks DR, Weekes PJ (1997) Phylogeny of the orders of the Eucestoda (Cercomeromorphae) based on comparative morphology: historical perspectives and a new working hypothesis. *J Parasitol* 83:1128–1147
- Hoberg EP, Gardner SL, Campbell RA (1999) Systematics of the Eucestoda: advances toward a new phylogenetic paradigm, and observations on the early diversification of tapeworms and vertebrates. *Syst Parasitol* 42:1–12. doi:10.1023/A:1006099009495
- Hoberg EP, Mariaux J, Brooks DR (2001) Phylogeny among orders of the Eucestoda (Cercomeromorphae): Integrating morphology, molecules and total evidence. In: Littlewood DTJ, Bray RA (eds) *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, pp 112–126
- Ivanov VA, Hoberg EP (1999) Preliminary comments on a phylogenetic study of the order Diphyllidea van Beneden in Carus, 1863. *Syst Parasitol* 42:21–27. doi:10.1023/A:1006059428150
- Ivanov VA, Lipshitz A (2006) Description of a new diphyllidean parasite of triakid sharks from the deep Red Sea. *J Parasitol* 92:841–846. doi:10.1645/GE-714R.1
- Justine J-L (1998) Spermatozoa as phylogenetic characters for the Eucestoda. *J Parasitol* 84:385–408

- Khalil LF, Jones A, Bray RA (1994) Keys to the cestodes parasites of vertebrates. Cambridge, University Press, p 751
- Kuchta R, Caira JN (2010) Three new species of Echinobothrium (Cestoda: Diphyllidea) from Indo-Pacific stingrays of the genus *Pastinachus* (Rajiformes: Dasyatidae). *Folia Parasitol* 57:185–196
- Levron C, Bruňanská M, Marchand B (2005) Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the pseudophyllidean cestode *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781). *Parasitol Res* 98:26–33. doi:10.1007/s00436-005-0009-7
- Levron C, Bruňanská M, Poddubnaya LG (2006a) Spermatological characters in *Diphyllobothrium latum* (Cestoda, Pseudophyllidea). *J Morphol* 267:1110–1119. doi:10.1002/jmor.10460
- Levron C, Bruňanská M, Kuchta R, Freeman M, Scholz T (2006b) Spermatozoon ultrastructure of the pseudophyllidean cestode *Paraechinophallus japonicus*, a parasite of deep-sea fish *Pseudonopsis anomala* (Perciformes, Centrolophidae). *Parasitol Res* 100:115–121. doi:10.1007/s00436-006-0224-x
- Levron C, Bruňanská M, Poddubnaya LG (2006c) Spermatological characters of the pseudophyllidean cestode *Bothriocephalus scorpii* (Muller, 1781). *Parasitol Int* 55:113–120. doi:10.1016/j.parint.2005.11.055
- Levron C, Sítko J, Scholz T (2009) Spermiogenesis and spermatozoon of the tapeworm *Ligula intestinalis* (Diphyllobothriidae): phylogenetic implications. *J Parasitol* 95:1–9. doi:10.1645/GE-1646.1
- Levron C, Miquel J, Oros M, Scholz T (2010) Spermatozoa of tapeworms (Platyhelminthes, Cestoda): advances in ultrastructural and phylogenetic studies. *Biol Rev* 85:523–543. doi:10.1111/j.1469-185X.2009.00114.x
- Li HT, Wang YH (2007) A new species of Macrobothriidae (Cestoda: Diphyllidea) from thornback ray *Platyrrhina sinensis* in China. *J Parasitol* 93:897–900
- MacKinnon BM, Burt MDB (1984) The comparative ultrastructure of spermatozoa from *Bothrimonus sturionis* Duv. 1842 (Pseudophyllidea), *Pseudanthobothrium hansenii* Baer, 1956 (Tetraphyllidea), and *Monoecocestus americanus* Stiles, 1895 (Cyclophyllidea). *Can J Zool* 62:1059–1066
- MacKinnon BM, Burt MDB (1985) Ultrastructure of spermatogenesis and the mature spermatozoon of *Haplobothrium globuliforme* Cooper, 1914 (Cestoda: Haplobothrioidea). *Can J Zool* 63:1478–1487
- Mahendrasingam S, Fairweather I, Halton DW (1989) Spermatogenesis and the fine structure of the mature spermatozoon in the free proglottis of *Trilocularia acanthiaevulgaris* (Cestoda, Tetraphyllidea). *Parasitol Res* 75:287–298. doi:10.1007/BF00931813
- Mariaux J (1998) A molecular phylogeny of the Eucestoda. *J Parasitol* 84:114–124
- Marigo AM, Świdzki Z, Bâ CT, Miquel J (2011) Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of the trypanorhynch cestode *Aporhynchus menezesi* (Aporhynchidae), a parasite of the velvet belly lanternshark *Etmopterus spinax* (Elasmobranchii: Etmopteridae). *Folia Parasitol* (in press)
- Miquel J, Świdzki Z (2006) Ultrastructure of the spermatozoon of *Dollfusella spinulifera* (Beveridge and Jones, 2000) Beveridge, Neifar and Euzet, 2004 (Trypanorhyncha, Eutetrarhynchidae). *Parasitol Res* 99:37–44. doi:10.1007/s00436-005-0094-7
- Miquel J, Feliu C, Marchand B (1999) Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Mesocestoides litteratus* (Cestoda, Mesocestoididae). *Int J Parasitol* 29:499–510. doi:10.1645/GE-1008R.1
- Miquel J, Eira C, Świdzki Z, Conn DB (2007a) *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1782) (Mesocestoididae): new data on sperm ultrastructure. *J Parasitol* 93:545–552
- Miquel J, Świdzki Z, Neifar L, Eira C (2007b) Ultrastructure of the spermatozoon of *Parachristianella trygonis* Dollfus, 1946 (Trypanorhyncha, Eutetrarhynchidae). *J Parasitol* 93:1296–1302. doi:10.1645/GE-1193.1
- Miquel J, Świdzki Z, Mackiewicz JS, Ibraheem MH (2008) Ultrastructure of spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Wenyonia virilis* Woodland, 1923, with re-assessment of flagellar rotation in *Glavidacris catostomi* Cooper, 1920. *Acta Parasitol* 53:19–29. doi:10.2478/s11686-008-0013-z
- Mokhtar-Maamouri F (1979) Étude en microscopie électronique de la spermiogénèse et du spermatozoïde de *Phyllobothrium gracile* Weld, 1855 (Cestoda, Tetraphyllidea, Phyllobothriidae). *Z Parasitenkd* 59:245–258. doi:10.1007/BF00927519
- Mokhtar-Maamouri F (1982) Étude ultrastructurale de la spermiogénèse de *Acanthobothrium filicolle* var. *filicolle* Zschokke, 1888 (Cestoda, Tetraphyllidea, Onchobothriidae) Cestoda, Tetraphyllidea, Onchobothriidae. *Ann Parasitol Paris* 57:429–442
- Mokhtar-Maamouri F, Azzouz-Draoui N (1984) Spermiogénèse et ultrastructure du spermatozoïde de deux Cestodes Diphyllidea. 4ème Ecole Franco-Afric Biol Mol, Djerba, Tunisie:467–469
- Mokhtar-Maamouri F, Świdzki Z (1975) Étude en microscopie électronique de la spermatogénèse de deux Cestodes *Acanthobothrium filicolle benedenii* Loennberg, 1889 et *Onchobothrium uncinatum* (Rud., 1819) (Tetraphyllidea, Onchobothriidae). *Z Parasitenkd* 47:269–281. doi:10.1007/BF00389886
- Neifar LG, Tyler GA, Euzet L (2001) Two new species of *Macrobothridium* (Cestoda, Diphyllidea) from rhinobatid elasmobranchs in the Gulf of Gabès, Tunisia, with notes on the status of the genus. *J Parasitol* 87:673–680
- Olson PD, Littlewood DTJ, Bray RA, Mariaux J (2001) Interrelationships and evolution of the tapeworm (Platyhelminthes: Cestoda). *Mol Phylogenet Evol* 19:443–467. doi:10.1006/mpev.2001.0930
- Quilichini Y, Foata J, Bâ CT, Marchand B (2007) Ultrastructure of the spermatozoon of *Calliobothrium verticillatum* (Cestoda, Tetraphyllidea, Oncobothriidae). *Acta Parasitol* 52:219–224. doi:10.2478/s11686-007-0037-9
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cel Biol* 17:208–212
- Sène A, Bâ CT, Marchand B (1997) Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Nomimoscolex* sp. (Cestoda, Proteocephalidea) intestinal parasite of *Claroetes laticeps* (Fish, Teleost) in Senegal. *J Submicrosc Cytol Pathol* 29:1–6
- Sène A, Bâ CT, Marchand B (1999) Ultrastructure of spermiogenesis of *Phyllobothrium lactuca* (Cestoda, Tetraphyllidea, Phyllobothriidae). *Folia Parasitol* 46:191–198
- Šípková L, Levron C, Freemaan M, Scholz T (2010) Spermiogenesis and spermatozoon of the tapeworm *Parabothriocephalus gracilis* (Bothriocephalidea): ultrastructural and cytochemical studies. *Acta Parasitol* 55:58–65. doi:10.2478/s11686-010-0003-9
- Šípková L, Levron C, Oros M, Justine J-L (2011) Spermatological characters of bothriocephalideans (Cestoda) inferred from an ultrastructural study on *Oncodiscus sauridae* and *Senga* sp. *Parasitol Res*. doi:10.1007/s00436-010-2215-1
- Świdzki Z, Eklun-Natey RD (1978) Fine structure of the spermatozoon of *Proteocephalus longicollis* (Cestoda, Proteocephalidea). *Proc 9th Int Cong Electron Microsc*, Toronto, Canada, 572–573
- Świdzki Z, Mackiewicz JS (2002) Ultrastructure of spermatogenesis and spermatozoa of the caryophyllidean cestode *Glavidacris catostomi* Cooper, 1920. *Acta Parasitol* 47:83–104
- Świdzki Z, Mokhtar-Maamouri F (1980) Étude de la spermatogénèse de *Bothriocephalus clavibothrium* Ariola, 1899 (Cestoda: Pseudophyllidea). *Arch Inst Pasteur Tunis* 57:323–347

- Thiéry JP (1967) Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J Microsc* 6:987–1018
- Twohig ME, Caira JN, Fyler CA (2008) Two new cestodes species from the dwarf whipray, *Himantura walga* (Batoidea: Dasyatidae), from Borneo, with comments on site and mode of attachment. *J Parasitol* 94:1118–1127. doi:10.1645/GE-1475.1
- Tyler GA (2006) Tapeworms of Elasmobranchs (Part II). A Monograph on the Diphyllidea (Platyhelminthes, Cestoda). *Bull Univ Nebraska State Mus* 20
- Yoneva A, Levron C, Oros M, Orosová M, Scholz T (2011) Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Breviscolex orientalis* (Cestoda: Caryophyllidea). *Parasitol Res*. doi:10.1007/s00436-010-2144-z

III.6. Etude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde du cestode *Molluscotaenia crassiscolex* (von Linstow, 1890) (Dilepididae), parasite intestinal de la musaraigne commune, *Sorex araneus*

Résumé

La spermiogenèse chez *Molluscotaenia crassiscolex* débute par la formation d'une zone de différenciation contenant deux centrioles. L'un des centrioles se développe et donne naissance à un flagelle qui croît directement dans l'extension cytoplasmique, bordée de microtubules corticaux. Au même moment, le noyau s'allonge et migre dans l'extension cytoplasmique médiane. Durant les stades avancés de la spermiogenèse, apparaît une gaine périaxonémale. La spermiogenèse se termine avec l'apparition du corps en crête hélicoïdal à l'avant de la spermatide. Finalement, le jeune spermatozoïde va alors se détacher du cytoplasme résiduel par un processus d'étranglement de l'anneau des membranes arquées. Le spermatozoïde mûr de *M. crassiscolex* est caractérisé par la présence d'un axonème de type 9+1', typique des Trepaxonemata, d'un corps en crête, partiellement détaché dans sa partie médiane, de microtubules corticaux spiralés, d'une gaine périaxonémale et d'un noyau spiralé. L'extrémité antérieure présente un cône apical de matériel opaque aux électrons, autour duquel s'enroule un corps en crête. Le corps en crête dessine des spires plus ou moins lâches tout au long de la région I du spermatozoïde. Il est accolé au corps spermatique dans ses parties antérieure et postérieure ; mais se détache partiellement de celui-ci dans la partie centrale de la région I. Ce genre de corps en crête est décrit pour la première fois. L'extrémité postérieure montre la désorganisation de l'unique axonème. Les résultats obtenus sont discutés et comparés particulièrement avec les données ultrastructurales disponibles chez les dilépididés *sensu lato*.

Mots clés : *Molluscotaenia crassiscolex*, Dilepididae, Cyclophyllidea, Cestoda, spermiogenèse, spermatozoïde, ultrastructure

Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the dilepidid cestode *Molluscotaenia crassiscolex* (von Linstow, 1890), an intestinal parasite of the common shrew *Sorex araneus*

Adji M. Marigo,^{1,2} Cheikh T. Bâ³ and Jordi Miquel^{1,2}

¹Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, sn, 08028 Barcelona, Spain; ²Institut de Recerca de la Biodiversitat, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona, Spain; ³Laboratoire de Parasitologie, Département de Biologie animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar, Sénégal

Keywords:

Molluscotaenia crassiscolex, Dilepididae, Cyclophyllidea, Cestoda, spermiogenesis, spermatozoon, ultrastructure

Accepted for publication:
29 March 2010

Abstract

Marigo, A.M., Bâ, C.T. and Miquel, J. 2011. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the dilepidid cestode *Molluscotaenia crassiscolex* (von Linstow, 1890), an intestinal parasite of the common shrew *Sorex araneus*. —*Acta Zoologica* (Stockholm) 92: 116–125.

Spermiogenesis in *Molluscotaenia crassiscolex* begins with the formation of a differentiation zone containing two centrioles. One of the centrioles develops a flagellum directly into the cytoplasmic extension. The nucleus elongates and later migrates along the spermatid body. During advanced stages of spermiogenesis, a periaxonemal sheath appears in the spermatid. Spermiogenesis finishes with the appearance of a single helicoidal crested body at the base of the spermatid and, finally, the narrowing of the ring of arched membranes causes the detachment of the fully formed spermatozoon. The mature spermatozoon of *M. crassiscolex* exhibits a partially detached crested body in the anterior region of the spermatozoon, one axoneme, twisted cortical microtubules, a periaxonemal sheath, and a spiralled nucleus. The anterior spermatozoon extremity is characterized by the presence of an electron-dense apical cone and a single spiralled crested body, which is attached to the sperm cell in the anterior and posterior areas of region I, whereas in the middle area it is partially detached from the cell. This crested body is described for the first time in cestodes. The posterior extremity of the male gamete exhibits only the disorganizing axoneme. Results are discussed and compared particularly with the available ultrastructural data on dilepidids *sensu lato*.

Jordi Miquel, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n, E-08028 Barcelona, Spain.

E-mail: jordimiquel@ub.edu

Introduction

It has now been clearly demonstrated that the ultrastructure of spermiogenesis and of the spermatozoon reveals significant characters for phylogenetic inference in parasitic Platyhelminthes (Euzet *et al.* 1981; Świdorski 1986; Justine 1991, 1997, 1998, 2001; Bâ and Marchand 1994a, 1995; Watson and Rohde 1995; Hoberg *et al.* 1997; Olson *et al.* 2001; Świdorski and Mackiewicz 2002; Levron *et al.* 2010). There is a significant amount of information concerning the order Cyclophyllidea. Nevertheless, most of the available studies focused on the family Anoplocephalidae (see Justine 1998, 2001; Levron *et al.* 2010). Within this family, subfamilies can

be distinguished using spermatological data (see Levron *et al.* 2010).

The family Dilepididae is a diverse group, which includes more than 100 genera, parasitic in birds and mammals (Bona 1994). However, spermatological data on the family Dilepididae are restricted to four species only: *Angularella beema* (see Yoneva *et al.* 2006b), *Molluscotaenia crassiscolex* (see Świdorski and Tkach 1996), *Dilepis undula* (see Świdorski *et al.* 2000) and *Kowalewskiiella glareola* (see Świdorski *et al.* 2002).

The taxonomy of the dilepidid cestodes *sensu lato* at the family level and lower groups has been controversial for a long period of time. The species of the now recognized families Dipylidiidae, Metadilepididae and Paruterinidae were

previously included in the Dilepididae (Schmidt 1986). Recently, ultrastructural studies of *Skrjabinoporus merops* (Metadilepididae), *Anonchotaenia globata* and *Triaenorhina rectangularis* (Paruterinidae), and Dipylidiidae species (see Miquel et al. 1998, 2005a; Ndiaye et al. 2003a; Yoneva et al. 2006a, 2009, 2010) show differences between these groups characterized by the Type III spermiogenesis. The record of the Bâ and Marchand's Type IV spermiogenesis in a dilepidid species (*sensu stricto*) further supports that Dipylidiidae, Metadilepididae and Paruterinidae should be considered distinct families in agreement with Jones et al. (1994). The latter authors sustain the recognition of the families Dilepididae (Railliet & Henry, 1909), Metadilepididae (Spasskii, 1959), Paruterinidae (Fuhrmann, 1907) and Dipylidiidae (Stiles, 1896).

With respect to the family Gryporhynchidae (Spasskii & Spasskaya, 1973), while being considered a subfamily of the Dilepididae by Bona (1994), Mariaux (1998) and Hoberg et al. (1999) raise it to the family level. The sole spermatological study on a gryporhynchid (*Valipora mutabilis*) shows a Type IV spermiogenesis (see Yoneva et al. 2008). Concerning the ultrastructural organization of the spermatozoon, dilepidids, dipylidiids and gryporhynchids present a Type VI spermatozoon, while metadilepidids and paruterinids present a Type VII spermatozoon (Levron et al. 2010).

Although a brief unillustrated description of the mature spermatozoon of *M. crassiscolex* has been presented at a conference (Świdorski and Tkach 1996), the present paper represents a complete ultrastructural analysis of the spermiogenesis and of the spermatozoon of this dilepidid species.

Material and Methods

Naturally infected shrews (*Sorex araneus*) were captured in the Nature Reserve of Py (Pyrenean Mountains, France). Mature specimens of *M. crassiscolex* were collected live from the small intestine and were placed in a 0.9% NaCl solution. These mature proglottids were routinely processed for transmission electron microscopic examination; they were fixed in cold (4°C) 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2 for 2 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, postfixed in cold (4°C) 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 h, rinsed in a 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2, dehydrated in an ethanol series and propylene oxide, and finally embedded in Spurr epoxy medium. Ultrathin sections were obtained using a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome, placed on copper grids and double-stained with uranyl acetate and lead citrate according to Reynolds (1963). Ultrathin sections were examined using Jeol 1010 transmission electron microscope in the Scientific Services of the University of Barcelona.

The Thiéry (1967) technique was used to evidence the presence of glycogen particles. Gold grids were treated in periodic acid, thiocarbohydrazide and silver proteinate (PATCH-SP) as follows: 30 min in 10% of PA, rinsed in distilled water, 24 h in TCH, rinsed in acetic solutions and distilled

water, 30 min in 1% SP in the dark, and rinsed in distilled water.

Results

Spermiogenesis

Spermiogenesis in *M. crassiscolex* is described in Figs 1A–F and 2A–D. Spermiogenesis starts with the formation of a differentiation zone (Figs 1A and 2A). This is a cone-shaped area bordered by submembranous cortical microtubules containing two centrioles (Fig. 1A). Only one of the centrioles gives rise to an axoneme that grows directly into the cytoplasmic expansion (Figs 1B,D and 2B). The ring of arched membranes is present at the base of the differentiation zone (Figs 1B,C and 2B). The nucleus elongates, becomes conical and migrates along the spermatid body (Figs 1A,C and 2B,C). Initially, cortical microtubules are parallel to the spermatid axis and then they become twisted (Fig. 1B–D). Finally, a crested body appears at the anterior part of the old spermatid in the final stage of spermiogenesis (Fig. 1E,F). Additionally, an electron-dense material present in the spermatid near the ring of arched membranes forms the apical cone in the anterior extremity of the future spermatozoon (Figs 1E,F and 2D). At the end of spermiogenesis, the ring of arched membranes becomes narrower, which precedes the detachment of the spermatozoon from the residual cytoplasm (Figs 1F and 2D).

Spermatozoon

The mature spermatozoon of *M. crassiscolex* (Figs 3A–K, 4A–J, 5 and 6I–IV) is a long filiform cell, tapered at both extremities, which lacks mitochondria. The observation of numerous longitudinal and cross-sections has enabled us to establish four regions (I–IV) characterized by distinctive ultrastructural features.

Region I (Figs 3A–J and 6I) corresponds to the anterior area of the mature spermatozoon. It exhibits an electron-dense apical cone (Fig. 3A–C) localized in the most anterior part of the gamete. Later, the centriole appears and it is clearly visible in cross-sections of the spermatozoon (Fig. 3D,E). The axoneme, of the 9 + '1' trepaxonematan pattern, is surrounded by a thin layer of electron-lucent cytoplasm (Fig. 3F,J). The cortical microtubules constitute a submembranous electron-dense layer (Fig. 3E–G,J) and they are spiralled at an angle of 45° (Fig. 3G). Externally, there is a thick helicoidal cord of electron-dense material that forms a single crested body (Fig. 3A,C–J). The positioning of the crested body is remarkable: at the anterior and posterior areas of region I, the crested body is attached to the sperm cell, being around 160 nm thick (Fig. 3A,C–G,I). However, in the intermediate part, the crested body is partially detached from the cell and its thickness increases to 330 nm (Fig. 3H,J).

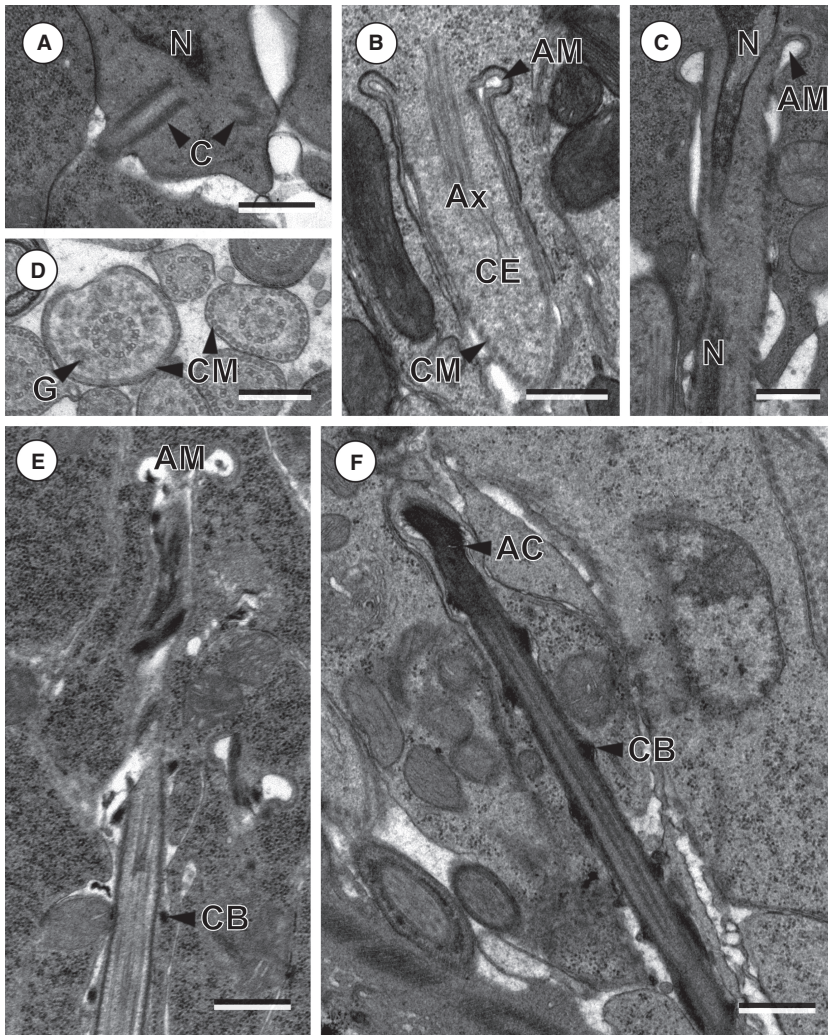


Fig. 1—Spermiogenesis of *Molluscaetania crassiscolex*. —**A**. Zone of differentiation showing two centrioles (C) and the nucleus (N). Bar = 0.5 μ m. —**B**. Longitudinal section of a zone of differentiation showing the elongation of the axoneme (Ax) in the cytoplasmic extension (CE) bordered by the cortical microtubules (CM) and delimited by the arched membrane (AM). Bar = 0.5 μ m. —**C**. Longitudinal section of spermatids showing the migrating nucleus (N) into the cytoplasmic extension. AM, arched membranes. Bar = 0.5 μ m. —**D**. Cross-sections of spermatids before the twisting of cortical microtubules (CM). G, granules. Bar = 0.3 μ m. —**E**. Longitudinal section of a zone of differentiation showing the formation of the crested body (CB). AM, arched membranes. Bar = 0.5 μ m. **F**. Final stage of the spermiogenesis showing the detachment of the spermatid after the formation of the apical cone (AC). CB, crested body. Bar = 0.5 μ m.

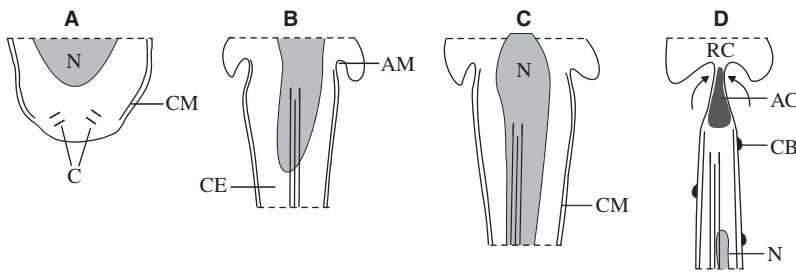


Fig. 2—**A–D**. Schematic drawing showing the main stages of spermiogenesis of *Molluscaetania crassiscolex*. AC, apical cone; AM, arched membranes; C, centriole; CB, crested bodies; CE, cytoplasmic extension; CM, cortical microtubules; N, nucleus; RC, residual cytoplasm.

Region II (Figs 3I,K, 4A–D, 5 and 6II) is characterized by the appearance of a periaxonemal sheath and electron-dense granules (Figs 3K and 4A–D). In the anterior areas of this region, the cortical microtubules form a submembranous continuous layer and both periaxonemal sheath and electron-dense granules are absent (Fig. 3I,K). Posterior areas of region II are characterized by the discontinuity of cortical microtubules in the submembranous layer and by the

presence of both electron-dense granules and periaxonemal sheath (Figs 3K and 4A–D). These electron-dense granules are located between the periaxonemal sheath and the submembranous layer of cortical microtubules and may constitute either a thin (Fig. 4B) or a thicker layer (Figs 3K and 4C). The test of Thiéry (1967) shows the absence of contrast, demonstrating the non-glycogenic nature of this electron-dense granular material (Fig. 5).

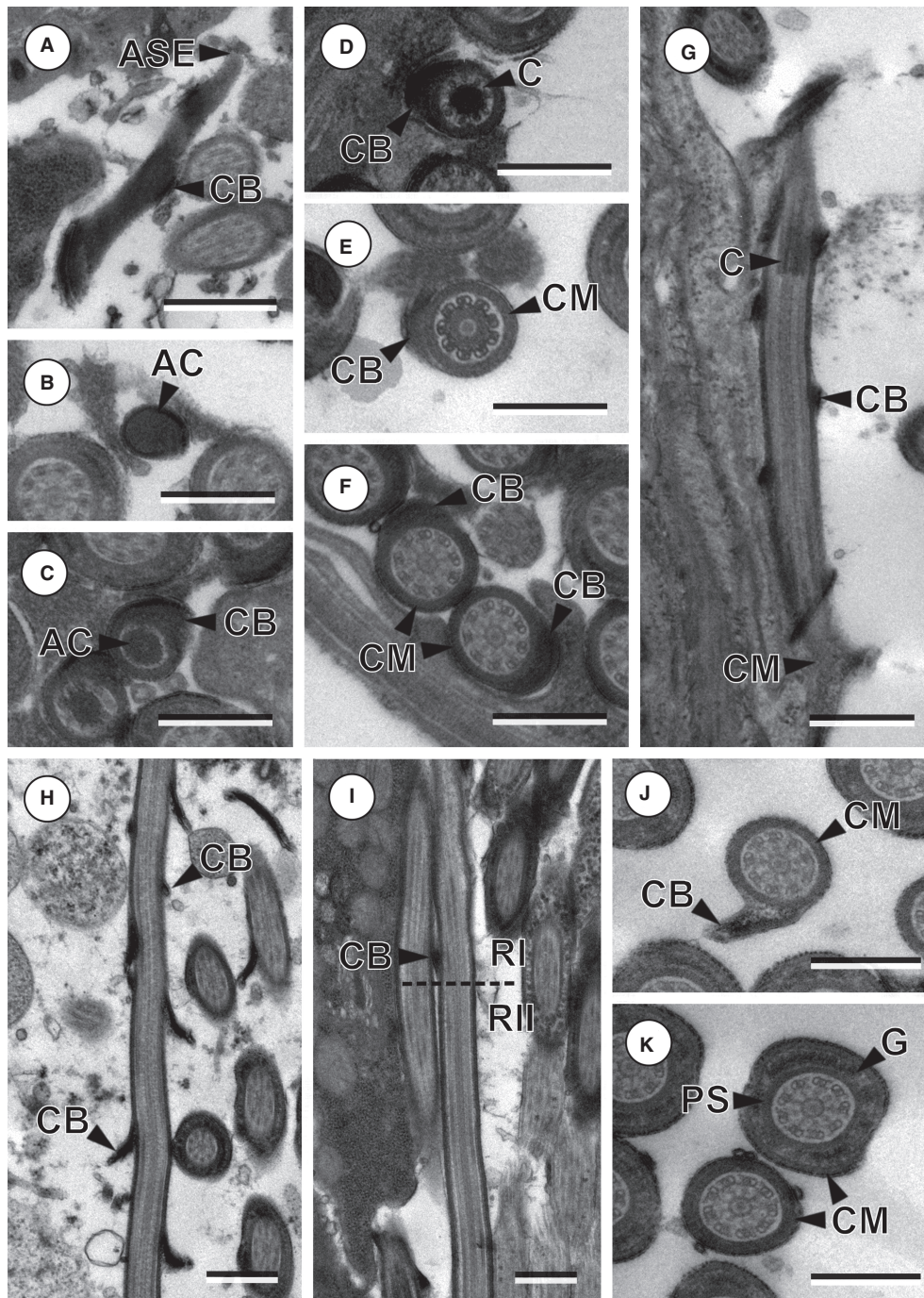


Fig. 3—Spermatozoon of *Molluscotaenia crassiscolex*. —**A**. Longitudinal section of region I showing the apical cone, the anterior spermatozoon extremity (ASE) and the crested body (CB). Bar = 0.5 μm. —**B**. Cross-section of region I showing the electron-dense apical cone (AC). Bar = 0.3 μm. —**C–D**. Cross-sections of posterior areas of the apical cone (AC) in region I showing the presence of one crested body (CB) and the beginning of centriole (C). Bars = 0.3 μm. —**E**. Cross-section of region I at the level of the centriole. CB, crested body; CM, cortical microtubules. Bar = 0.3 μm. —**F**. Cross-section of anterior areas of region I showing the axoneme. CB, crested body; CM, cortical microtubules. Bar = 0.3 μm. —**G**. Longitudinal section of region I showing the anterior axonemal extremity marked by the presence of the centriole (C). CB, crested body; CM, cortical microtubules. Bar = 0.5 μm. —**H**. Longitudinal section of region I showing the detached crested body (CB) in the median part of this region. Bar = 0.5 μm. —**I**. Longitudinal section showing the transition area between region I (RI) and region II (RII). CB, crested body. Bar = 0.5 μm. —**J**. Cross-section showing the detached crested body (CB) in the middle area of region I. CM, cortical microtubules. Bar = 0.3 μm. —**K**. Cross-section of region II showing the periaxonemal sheath (PS), the electron-dense granules (G) and the cortical microtubules (CM). Bar = 0.3 μm.

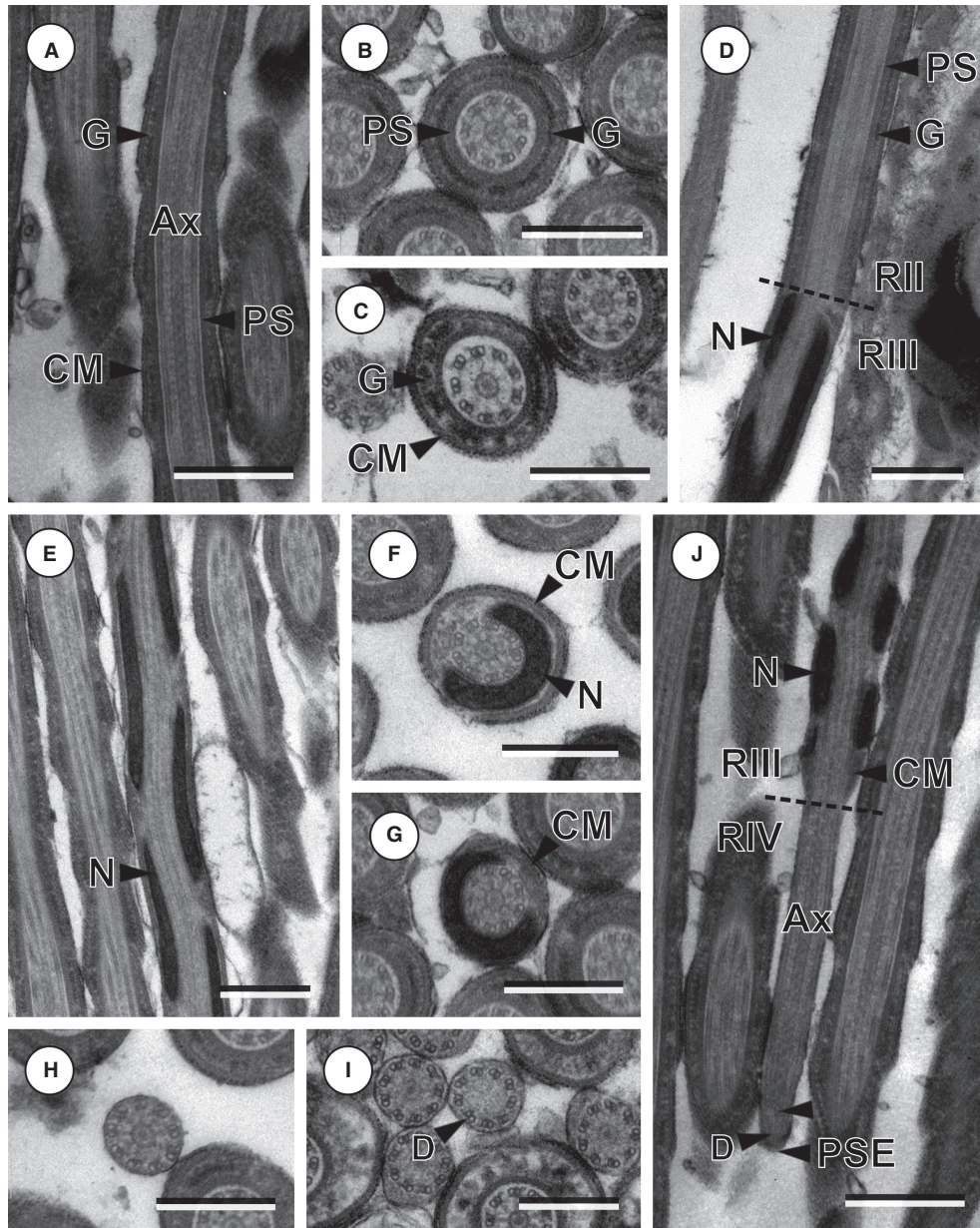


Fig. 4—Spermatozoon of *Molluscotaenia crassicolex*. —**A**. Longitudinal section of region II showing the periaxonemal sheath (PS) surrounding the axoneme (Ax), and electron-dense granules (G). CM, cortical microtubules. Bar = 0.5 μ m. —**B–C**. Cross-sections of region II showing the periaxonemal sheath (PS) and the different aspect of electron-dense granules (G). CM, cortical microtubules. Bars = 0.3 μ m. —**D**. Longitudinal section of the transition zone between region II (RII) and region III (RIII) (nuclear region). G, electron-dense granules; N, nucleus; PS, periaxonemal sheath. Bar = 0.5 μ m. —**E**. Longitudinal section of the nuclear region. N, nucleus. Bar = 0.5 μ m. —**F**. Cross-section of the nuclear region showing the nucleus (N) in a horse-shoe shape and the twisted cortical microtubules (CM). Bar = 0.3 μ m. —**G**. Cross-section of the nuclear region near the end of the nucleus showing the posterior extremity of cortical microtubules (CM). Bar = 0.3 μ m. —**H**. Cross-section of region IV at the level of the posterior end showing the axoneme surrounded by the plasma membrane. Bar = 0.3 μ m. —**I**. Cross-section of region IV showing the disorganization of the axoneme forming doublets (D). Bar = 0.3 μ m. —**J**. Longitudinal section of the transition zone of regions III (RIII) and IV (RIV). Note that the cortical microtubules (CM) stop at the end of region III and that region IV presents a reduced length. The arrowhead indicates the disappearance of the central core. Ax, axoneme; D, doublets; N, nucleus; PSE, posterior spermatozoon extremity. Bar = 0.5 μ m.

Region III (Figs 4D–G, I and 6III) presents the nucleus

sections, the nucleus is horseshoe-shaped or almost annular (Fig. 4F, G). This region is also characterized by the lack of

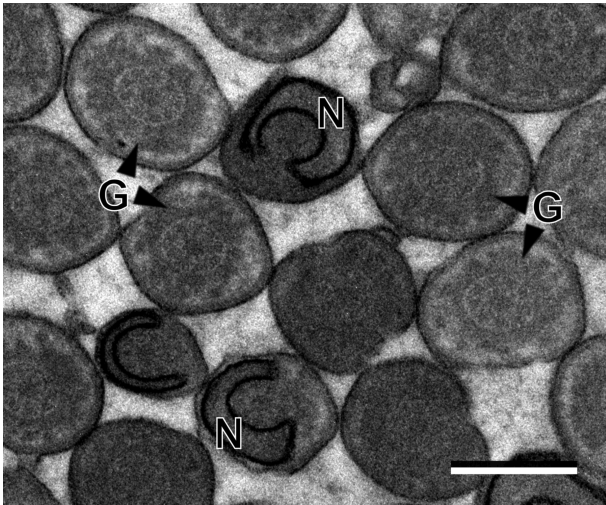


Fig. 5—Several cross-sections showing the non-glycogenic nature of electron-dense granules (G) evidenced by the application of Thiéry staining. N, nucleus. Bar = 0.5 μ m.

both electron-dense granules and periaxonemal sheath. Cortical microtubules stop their course at the end of this region (Fig. 4G,I).

Region IV (Figs 4H,I and 6IV) corresponds to the posterior spermatozoon extremity, which includes only the axoneme surrounded by the plasma membrane (Fig. 4H). Towards the end portion of this region, the axoneme becomes disorganized; the central core disappears first and the disorganized doublets–singlets reach the posterior tip of the spermatozoon (Fig. 4I,J). This is a short region that measures around 1.5 μ m.

Discussion

Spermiogenesis

Within the order Cyclophyllidea, spermiogenesis is divided into two types (Bâ and Marchand 1995): Type III is characterized by the formation of a single flagellum that grows parallel to the cytoplasmic protrusion followed by the proximodistal fusion, whereas Type IV describes the growth of the axoneme directly into the cytoplasmic protrusion. Type III spermiogenesis occurs in some Anoplocephalidae, and also in Nematotaeniidae, Davaineidae, Dipylidiidae, Metadilepidae, Paruterinidae, Catenotaeniidae and Taeniidae. On the other hand, Type IV spermiogenesis is present in some Anoplocephalidae, in Dilepididae and in Hymenolepidae (see Justine 1998, 2001; Levron *et al.* 2010). To date, the ultrastructural analysis of spermiogenesis in *A. beema* constituted the only available data on dilepidids (Yoneva *et al.* 2006b). The present study showed that the spermiogenesis process in *M. crassiscolex*, as in *A. beema*, also follows the Type IV of Bâ and Marchand (1995). Among cyclophyllideans,

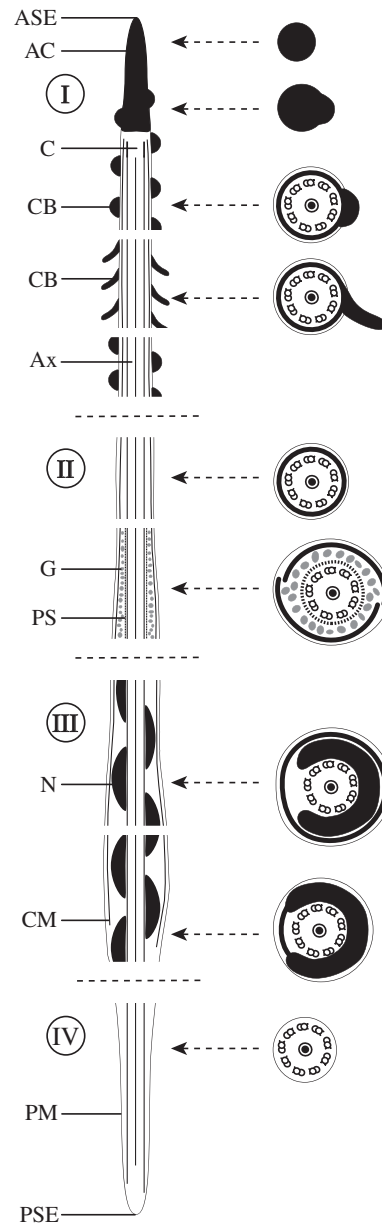


Fig. 6—I–IV. Schematic drawing showing the ultrastructural organization of the mature spermatozoon of *Molluscotaenia crassiscolex*. AC, apical cone; ASE, anterior spermatozoon extremity; Ax, axoneme; C, centriole; CB, crested body; CM, cortical microtubules; G, electron-dense granules; N, nucleus; PM, plasma membrane; PS, periaxonemal sheath; PSE, posterior spermatozoon extremity.

mesocestoidids constitute the only exception, presenting a Type II spermiogenesis, which is characterized by the flagellar rotation of a single flagellum followed by its proximodistal fusion with a cytoplasmic extension, and by the presence of both intercentriolar body and striated rootlets in the zone of differentiation (see Miquel *et al.* 1999, 2007a). According to the original description of Bâ and Marchand (1995), the

cyclophyllidean Types III and IV lack both intercentriolar body and striated rootlets in the zone of differentiation. However, posterior studies have shown certain particularities. This is the case of the well-developed striated rootlets present in *Joyeuxiella* species (Dipylidiidae) (see Ndiaye et al. 2003a) and the vestigial striated rootlets, which include thin, spiralled and filamentous striated rootlets, found in the zone of differentiation of the anoplocephalids *Anoplocephaloides dentata*, *Galgoides arfaai*, *Moniezia expansa* and *Mosgovoyia ctenoides* (see Miquel and Marchand 1998; Li et al. 2003; Miquel et al. 2005b; Eira et al. 2006), the dipylidiid *Dipylidium caninum* (see Miquel et al. 1998, 2005a), the metadilepidid *S. merops* (see Yoneva et al. 2006a), the paruterinids *T. rectangula* and *An. globata* (see Yoneva et al. 2009, 2010), and the taeniid *Taenia taeniaeformis* (see Miquel et al. 2009).

Bâ and Marchand (1995) describe the presence of an electron-dense material, the centriolar adjunct, associated with centrioles in the zone of differentiation in the Type IV spermiogenesis. This structure has been observed in the anoplocephalid cyclophyllideans *Thysaniezia ovilla* (Bâ et al. 1991), *G. arfaai* (Miquel et al. 2005b) and *Mo. ctenoides* (Eira et al. 2006). Other anoplocephalids (*Ano. dentata*, *Aporina delafondii* and *M. expansa* – see Bâ and Marchand 1994b; Miquel and Marchand 1998; Li et al. 2003), the dilepidid *A. beema* (Yoneva et al. 2006b), the gryporhynchid *V. mutabilis* (Yoneva et al. 2008) and the hymenolepidid *Rodentolepis nana* (Bâ and Marchand 1992) also follow a Type IV spermiogenesis but they lack the centriolar adjunct as occurs in the case of *M. crassiscolex* spermiogenesis. Other centriole-associated structures, the intercentriolar-dense material and the electron-dense material, are described in anoplocephalid *Sudarikovina taterae* (Bâ et al. 2000) and in the hymenolepidid *Rodentolepis microstoma* (Bâ and Marchand 1998), respectively.

According to several authors (see Ndiaye et al. 2003a; Miquel et al. 2005a, in press), the process of cytoplasmic condensation and posterior twisting of cortical microtubules during spermiogenesis probably plays an important role in the origin of the periaxonemal sheath present in the mature spermatozoon of cyclophyllideans. This has been clearly described in the dipylidiids *Joyeuxiella echimorhynchoides* and *Joyeuxiella pasqualei* by Ndiaye et al. (2003a). A similar condensation of material in the periphery of spermatids has also been observed in the davaineid *Raillietina micracantha* (Miquel et al. 2010). In our study, an electron-dense granular material appears in the spermatids, but the formation of periaxonemal sheath is not observed. Nevertheless, it is interesting to remark that these species follow different patterns of spermiogenesis: both *Joyeuxiella* spp. and *R. micracantha* follow Type III, while spermiogenesis in *M. crassiscolex* corresponds to pattern IV.

Spermatozoon

According to Levron et al. (2010), there are seven types of spermatozoa in the Eucestoda. The latter authors consider

three different types of spermatozoa for cyclophyllideans (Types V through VII). Type V is characteristic of hymenolepidids, nematotaeniids and some anoplocephalids. Type VII is found in the davaineids, metadilepidids, paruterinids, taeniids and certain anoplocephalids, and also in tetrabothriideans. The ultrastructural organization of the mature spermatozoon of *M. crassiscolex* corresponds to the Type VI, which is characterized by the presence of one axoneme, spiralled cortical microtubules, spiralled nucleus, crested body and periaxonemal sheath. This pattern is present in the Catenotaeniidae, Dilepididae, Dipylidiidae, Gryporhynchidae and in the Anoplocephalidae genera *Mathevotaenia* and *Stilesta* (see Levron et al. 2010). With respect to the family Mesocestoididae, studies on *Mesocestoides litteratus* and *Mesocestoides lineatus* (see Miquel et al. 1999, 2007a) have revealed plesiomorphic characters (as in the case of spermiogenesis) and the ultrastructural organization of their spermatozoa corresponds to Type IV, which is also present in lecanicephalideans and in the phyllobothriid tetracyllideans.

The generally accepted sperm characters interpreted as synapomorphies for the Eucestoda are the absence of mitochondria in the mature sperm (Justine 1991) and the presence of one or more helical crested bodies (Bâ and Marchand 1995). The validity of the latter is questionable because their absence in the sperm cell of caryophyllideans, spathebothriideans and trypanorhynchids (see Justine 2001 and Levron et al. 2010). The synapomorphies for the cyclophyllideans + tetrabothriideans include the presence of twisted peripheral microtubules and the presence of periaxonemal sheath (Justine 2001). However, the validity of the latter character as a synapomorphy may be impeded by the anoplocephalid cyclophyllideans whose spermatozoa lack periaxonemal sheath (see Yoneva et al. 2006b).

The present results on *M. crassiscolex* are in agreement with the previous ultrastructural studies on spermatozoa of dilepidid cestodes (Świdorski et al. 2000, 2002; Yoneva et al. 2006b – see Table 1). The mature spermatozoon of *M. crassiscolex* exhibits a single crested body that marks the anterior extremity of the gamete (Bâ et al. 1991). Among cyclophyllideans, the number of crested bodies varies from 1 to 12 (see Bâ and Marchand 1995; Justine 1998; Bâ et al. 2000). A single helical crested body is present in the cyclophyllidean families Dilepididae (Świdorski et al. 2000, 2002; Yoneva et al. 2006b), Dipylidiidae (Miquel and Marchand 1997; Ndiaye et al. 2003a; Miquel et al. 2005a), Mesocestoididae (Miquel et al. 1999, 2007a), Metadilepididae (Yoneva et al. 2006a), Nematotaeniidae (Mokhtar-Maamouri and Azzouz-Draoui 1990), Paruterinidae (Yoneva et al. 2009, 2010) and Taeniidae (Miquel et al. 2000; Ndiaye et al. 2003b; Willms et al. 2004), whereas Catenotaeniidae and Davaineidae are characterized by the presence of two crested bodies (Bâ and Marchand 1994a,c; Miquel et al. 1997, 2010; Hidalgo et al. 2000; Bâ et al. 2005a,b). The spermatozoa of the Hymenolepididae possess multiple (6–12) crested bodies (Bâ and Marchand 1992, 1993, 1996, 1998; Miquel et al. 2007b), while in the

Table 1 Spermatological characters in the Dilepididae, Dipylidiidae, Gryporhynchidae, Metadilepididae and Paruterinidae cestodes

Family and species	Spermiogenesis					Spermatozoon							References
	Type	FR	PF	IB	RLS	Type	AC	CB					
								n	thickn.	CM	PS	G	
Dilepididae													
<i>Angularella beema</i>	IV	-	-	-	-	VI	1		30–40°	+	+	-	Yoneva <i>et al.</i> (2006b)
<i>Dilepis undula</i>							1		35–45°	+	?	?	Świdorski <i>et al.</i> (2000)
<i>Kowalewskiella glareola</i>							1		Twisted		+		Świdorski <i>et al.</i> (2002)
<i>Molluscotaenia crassiscolex</i>	IV	-	-	-	-	VI	1	160–330	45°	+	+	-	Świdorski and Tkach (1996), present paper
Dipylidiidae													
<i>Dipylidium caninum</i>	III	-	+	-	VSR	VI	600	1 150	40°	+	-	-	Miquel and Marchand (1997), Miquel <i>et al.</i> (1998, 2005a)
<i>Joyeuxiella echinorhynchoides</i>	III	-	+	-	SR	VI	>2000	1 150	40°	+	-	-	Ndiaye <i>et al.</i> (2003a), Miquel <i>et al.</i> (2005a)
<i>Joyeuxiella pasqualei</i>	III	-	+	-	SR	VI	>2000	1 75	40°	+	-	-	Ndiaye <i>et al.</i> (2003a), Miquel <i>et al.</i> (2005a)
Gryporhynchidae													
<i>Valipora mutabilis</i>	IV	-	-	-	-	VI	1	55	45°	+	+	-	Yoneva <i>et al.</i> (2008)
Metadilepididae													
<i>Skrjabinoporus merops</i>	III	<90°	+	-	VSR	VII	1		30–40°	+	-	+	Yoneva <i>et al.</i> (2006a)
Paruterinidae													
<i>Anonchotaenia globata</i>	III	<90°	+	-	VSR	VII	1	75	35°	+	-	+	Yoneva <i>et al.</i> (2010)
<i>Trianaorhina rectangula</i>	III	<90°	+	-	VSR	VII	1	50	40°	+	-	+	Yoneva <i>et al.</i> (2009)

Spermiogenesis types are considered according to Bâ and Marchand (1995).

Spermatozoa types are considered according to Levron *et al.* (2010).

All measurements are given in nm.

AC, apical cone (length); CB, crested body (number and thickness); CM, angle of cortical microtubules; FR, flagellar rotation; G, electron-dense granules; IB, intercentriolar body; IW, intracytoplasmic walls; PF, proximodistal fusion; PS, periaxonemal sheath; RLS, root-like structures; SR, striated rootlets; VSR, vestigial striated rootlets; +/–, presence/absence of character; ?, data required to be confirmed.

Anoplocephalidae species the number of crested bodies varies from 1 to 7 (Bâ and Marchand 1994b; Bâ *et al.* 2000; Miquel *et al.* 2004; Eira *et al.* 2006). The particular morphology of the crested body observed in *M. crassiscolex* is reported for the first time in a cestode. In fact, while the anterior and posterior areas of region I show a crested body adjacent to the sperm cell, in the middle area the crested body is partially detached from the cell.

Although the transverse intracytoplasmic walls are usually present in the spermatozoon of species that also exhibit a periaxonemal sheath (see Justine 1998), the mature spermatozoon of *M. crassiscolex* lacks intracytoplasmic walls while presenting a periaxonemal sheath. In fact, as described by Levron *et al.* (2010), transverse intracytoplasmic walls and periaxonemal sheath consist of characters that they are not associated in all the studied species. Thus, according to these authors, among the cyclophyllidean types of spermatozoon, the Type VI presents only periaxonemal sheath and the Type VII exhibits both periaxonemal sheath and transverse intracytoplasmic walls. The periaxonemal sheath characterizing the posterior part of region II of the spermatozoon of *M. crassiscolex* is present in all dilepidid, dipylidiid, gryporhynchid, metadilepidid and paruterinid cestodes that have been studied to date (see Table 1). Among these families, only the metadilepidid *S. merops* and the paruterinids *T. rectangula* and *An. globata* (Yoneva *et al.* 2006a, 2009, 2010) exhibit both

intracytoplasmic walls and periaxonemal sheath in agreement with the above mentioned statement by Justine (1998).

The ultrastructure of the posterior region of the spermatozoon in *M. crassiscolex* shows only the axoneme surrounded by the plasma membrane. The cortical microtubules stop their course at the end of the nuclear region and thus the distal spermatozoon extremity is characterized by the absence of peripheral microtubules and the posterior disappearance of the central core unit followed by the gradual disintegration of doublets. This schema is in agreement with those found in the previously studied dilepidids *D. undula* (Świdorski *et al.* 2000) and *A. beema* (Yoneva *et al.* 2006b), in the dipylidiid genus *Joyeuxiella* (Ndiaye *et al.* 2003a), in the gryporhynchid *V. mutabilis* (Yoneva *et al.* 2008), in the metadilepidid *S. merops* (Yoneva *et al.* 2006a) and in the paruterinids *T. rectangula* (Yoneva *et al.* 2009) and *An. globata* (Yoneva *et al.* 2010).

Concluding remarks

Type IV spermiogenesis is the characteristic pattern of dilepidids as revealed by the comparative analysis of the available spermatological data. During spermiogenesis, a root-like structure is absent in all the studied dilepidids. Concerning the ultrastructural organization of the mature spermatozoon, dilepidids present a Type VI spermatozoon, which is characterized by the presence of (1) a single axoneme, (2) spiralled

cortical microtubules and nucleus, (3) a periaxonemal sheath and (4) a single crested body. Although these characteristics clearly differentiate dilepidids from dipylidiids, metadilepidids and paruterinids, they do not differentiate dilepidids from gryporhynchids, which present similar spermiogenesis and spermatozoa ultrastructural characters.

Acknowledgements

Authors thank the staff of the Nature Reserve of Py (Claude Guisset and David Morichon, in particular) (Pyrenean Mountains, France) for their hospitality and valuable help in the fieldwork. We also thank 'Serveis Científics i Tècnics' of the University of Barcelona for their support in the preparation of samples. Study partially supported by the Spanish Projects 2009SGR-403 and CGL2009-07759/BOS. Adj. Mama Marigo benefits from a MAEC-AECID doctoral grant (2009-10, n° 0000448124).

References

- Bâ, C. T. and Marchand, B. 1992. Reinvestigation of the ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Hymenolepis nana* (Cestoda, Cyclophyllidea), parasite of the small intestine of *Rattus rattus*. – *Molecular Reproduction and Development* 33: 39–45.
- Bâ, C. T. and Marchand, B. 1993. Ultrastructure of the *Retinometra serrata* spermatozoon (Cestoda) intestinal parasite of turtle-doves in Senegal. – *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 25: 233–238.
- Bâ, C. T. and Marchand, B. 1994a. Similitude ultrastructurale des spermatozoïdes de quelques Cyclophyllidea. – *Parasite* 1: 51–55.
- Bâ, C. T. and Marchand, B. 1994b. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Aporina delafondi* (Cyclophyllidea, Anoplocephalidae) intestinal parasite of turtle doves in Senegal. – *International Journal for Parasitology* 24: 225–235.
- Bâ, C. T. and Marchand, B. 1994c. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Raillietina (Raillietina) tunetensis* (Cyclophyllidea, Davaineidae) intestinal parasite of turtle doves in Senegal. – *International Journal for Parasitology* 24: 237–248.
- Bâ, C. T. and Marchand, B. 1995. Spermiogenesis, spermatozoa and phyletic affinities in the Cestoda. – *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle* 166: 87–95.
- Bâ, C. T. and Marchand, B. 1996. Ultrastructure of the spermatozoon of *Hymenolepis straminea* (Cyclophyllidea, Hymenolepididae) intestinal parasite of *Arvicanthis niloticus* in Senegal. – *Invertebrate Reproduction and Development* 29: 243–247.
- Bâ, C. T. and Marchand, B. 1998. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Vampirolepis microstoma* (Cestoda, Hymenolepididae), intestinal parasite of *Rattus rattus*. – *Microscopy Research and Technique* 42: 218–225.
- Bâ, C. T., Marchand, B. and Mattei, X. 1991. Demonstration of the orientation of the cestodes spermatozoon illustrated by the ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon of a Cyclophyllidea: *Thysaniezia ovilla*, Rivolta, 1874. – *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 23: 605–612.
- Bâ, A., Bâ, C. T. and Marchand, B. 2000. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Sudarikovina taterae* (Cestoda, Cyclophyllidea, Anoplocephalidae) intestinal parasite of *Tatera gambiana* (Rodentia, Gerbillidae). – *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 32: 137–144.
- Bâ, C. T., Bâ, A. and Marchand, B. 2005a. Ultrastructure of the spermatozoon of *Raillietina (Raillietina) baeri* (Cyclophyllidea, Davaineidae) an intestinal parasite of the multimammate rat, *Mastomys huberti* (Rodentia, Muridae). – *Parasitology Research* 97: 173–178.
- Bâ, C. T., Bâ, A. and Marchand, B. 2005b. Ultrastructure of the spermatozoon of *Paroniella reynoldsae* (Cyclophyllidea, Davaineidae) an intestinal parasite of *Corvus albus* (Aves, Corvidae). – *Acta Parasitologica* 50: 208–214.
- Bona, F. V. 1994. Family Dilepididae Railliet & Henry, 1999. In: Khalil, L. F., Jones, A. and Bray, R. A. (Eds): *Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates*, pp. 443–554. CAB International, Wallingford.
- Eira, C., Miquel, J., Vingada, J. and Torres, J. 2006. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the cestode *Mosgovoyia clenoides* (Cyclophyllidea: Anoplocephalidae), an intestinal parasite of *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha: Leporidae). – *Journal of Parasitology* 92: 708–718.
- Euzet, L., Świdzki, Z. and Mokhtar-Maamouri, F. 1981. Ultrastructure comparée du spermatozoïde des Cestodes. Relations avec la phylogénèse. – *Annales de Parasitologie (Paris)* 56: 247–259.
- Hidalgo, C., Miquel, J., Torres, J. and Marchand, B. 2000. Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon in *Catenotaenia pusilla*, an intestinal parasite of *Mus musculus*. – *Journal of Helminthology* 74: 73–81.
- Hoberg, E. P., Mariaux, J., Justine, J.-L., Brooks, D. R. and Weekes, P. J. 1997. Phylogeny of the orders of the Eucestoda (Cercomeromorphae) based on comparative morphology: historical perspectives and a new working hypothesis. – *Journal of Parasitology* 83: 1128–1147.
- Hoberg, E. P., Jones, A. and Bray, R. A. 1999. Phylogenetic analysis among the families of the Cyclophyllidea (Eucestoda) based on comparative morphology, with new hypotheses for co-evolution in vertebrates. – *Systematic Parasitology* 42: 51–73.
- Jones, A., Bray, R. A. and Khalil, L. F. 1994. Order Cyclophyllidea van Beneden in Braun, 1990. In: Khalil, L. F., Jones, A. and Bray, R. A. (Eds): *Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates*, pp. 305–307. CAB International, Wallingford.
- Justine, J.-L. 1991. Phylogeny of parasitic Platyhelminthes: a critical study of synapomorphies proposed on the basis of the ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa. – *Canadian Journal of Zoology* 69: 1421–1440.
- Justine, J.-L. 1997. La classification générale des Platyhelminthes parasites: changements récents et utilisation des caractères ultrastructuraux, en particulier des spermatozoïdes. – *Bulletin de la Société Française de Zoologie* 122: 226–277.
- Justine, J.-L. 1998. Spermatozoa as phylogenetic characters for the Eucestoda. – *Journal of Parasitology* 84: 385–408.
- Justine, J.-L. 2001. Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes. In: Littlewood, D. T. J. and Bray, R. A. (Eds): *Interrelationships of the Platyhelminthes*, pp. 231–238. Taylor and Francis, London.
- Levron, C., Miquel, J., Oros, M. and Scholz, T. 2010. Spermatozoa of tapeworms (Platyhelminthes, Eucestoda): advances in ultrastructural and phylogenetic studies. – *Biological Reviews* 85: 523–543.
- Li, H.-Y., Brennan, J. P. and Halton, D. W. 2003. Spermatogenesis, spermiogenesis and spermatozoon in the cestode (*Moniezia expansa*) (Cyclophyllidea, Anoplocephalidae). – *Acta Zoologica Sinica* 49: 370–379.
- Mariaux, J. 1998. A molecular phylogeny of the Eucestoda. – *Journal of Parasitology* 84: 114–124.
- Miquel, J. and Marchand, B. 1997. Ultrastructure of the spermatozoon of *Dipylidium caninum* (Cestoda, Cyclophyllidea, Dilepididae), an intestinal parasite of *Canis familiaris*. – *Parasitology Research* 83: 349–355.

- Miquel, J. and Marchand, B. 1998. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Anoplocephaloides dentata* (Cestoda, Cyclophyllidea, Anoplocephalidae), an intestinal parasite of Arvicolidae rodents. – *Journal of Parasitology* **84**: 1128–1136.
- Miquel, J., Bâ, C. T. and Marchand, B. 1997. Ultrastructure of the spermatozoon of *Skrjabinotaenia lobata* (Cyclophyllidea, Catenotaeniidae), intestinal parasite of *Apodemus sylvaticus* (Rodentia, Muridae). – *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* **29**: 521–526.
- Miquel, J., Bâ, C. T. and Marchand, B. 1998. Ultrastructure of spermiogenesis of *Dipylidium caninum* (Cestoda, Cyclophyllidea, Dipylidiidae), an intestinal parasite of *Canis familiaris*. – *International Journal for Parasitology* **28**: 1453–1458.
- Miquel, J., Feliu, C. and Marchand, B. 1999. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Mesocestoides litteratus* (Cestoda, Mesocestoididae). – *International Journal for Parasitology* **29**: 499–510.
- Miquel, J., Hidalgo, C., Feliu, C. and Marchand, B. 2000. Sperm ultrastructure of *Taenia mustelae* (Cestoda, Taeniidae), an intestinal parasite of the weasel, *Mustela nivalis* (Carnivora). – *Invertebrate Reproduction and Development* **38**: 43–51.
- Miquel, J., Świdorski, Z., Młocicki, D. and Marchand, B. 2004. Ultrastructure of the spermatozoon of the anoplocephalid cestode *Gallegoides arfaai* (Mobedi and Ghadirian, 1977) Tenora and Mas-Coma, 1978, an intestinal parasite of the wood mouse (*Apodemus sylvaticus* Linnaeus, 1758). – *Parasitology Research* **94**: 460–467.
- Miquel, J., Świdorski, Z. and Marchand, B. 2005a. Spermatological characters in the Dipylidiidae Stiles, 1896 (Cestoda, Cyclophyllidea). – *Acta Parasitologica* **50**: 65–73.
- Miquel, J., Świdorski, Z., Młocicki, D., Eira, C. and Marchand, B. 2005b. Spermatogenesis in the anoplocephalid cestode *Gallegoides arfaai* (Mobedi et Ghadirian, 1977) Tenora et Mas-Coma, 1978. – *Acta Parasitologica* **50**: 132–144.
- Miquel, J., Eira, C., Świdorski, Z. and Conn, D. B. 2007a. *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1782) (Mesocestoididae): new data on sperm ultrastructure. – *Journal of Parasitology* **93**: 545–552.
- Miquel, J., Ndiaye, P. I. and Feliu, C. 2007b. Crest-like bodies in the spermatozoon of Hymenolepididae cestodes from Iberian rodents. – *Revista Ibérica de Parasitología* **67**: 27–33.
- Miquel, J., Świdorski, Z., Foronda, P., Torres, J. and Feliu, C. 2009. Ultrastructure of spermatogenesis of *Taenia taeniaeformis* (Batsch, 1786) (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) and comparison of spermatological characters in the family Taeniidae Ludwig, 1886. – *Acta Parasitologica* **54**: 230–243.
- Miquel, J., Torres, J., Foronda, P. and Feliu, C. 2010. Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the davaineid cestode *Raillietina micracantha* (Fuhrmann, 1909). – *Acta Zoologica (Stockholm)* **91**: 212–221.
- Mokhtar-Maamouri, F. and Azzouz-Draoui, N. 1990. Spermiogénèse et ultrastructure du spermatozoïde de *Nematotaenia chantalae* Dollfus, 1957 (Cestoda, Cyclophyllidea, Nematotaeniidae). – *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **65**: 221–228.
- Ndiaye, P. I., Agostini, S., Miquel, J. and Marchand, B. 2003a. 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* **91**: 175–186.
- Ndiaye, P. I., Miquel, J. and Marchand, B. 2003b. Ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa of *Taenia parva* Baer, 1926 (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae), a parasite of the common genet (*Genetta genetta*). – *Parasitology Research* **89**: 34–43.
- Olson, P. D., Littlewood, D. T. J., Bray, R. A. and Mariaux, J. 2001. Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). – *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**: 443–467.
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. – *Journal of Cell Biology* **17**: 208–212.
- Schmidt, G. D. 1986. *GRC Handbook of Tapeworm Identification*. CRC Press, Boca Raton.
- Świdorski, Z. 1986. Three types of spermiogenesis in cestodes. – *Proceedings of the XIth International Congress of Electron Microscopy*. Kyoto, Japan: 2959–2960.
- Świdorski, Z. and Mackiewicz, J. S. 2002. Ultrastructure of spermatogenesis and spermatozoa of the caryophyllidean cestode *Glariadacris catostomi* Cooper, 1920. – *Acta Parasitologica* **47**: 83–104.
- Świdorski, Z. and Tkach, V. V. 1996. Ultrastructure of mature spermatozoon in dilepidid cestode *Molluscotaenia crassiscolex* (Linstow, 1890). – *Parassitologia* **38**: 97.
- Świdorski, Z., Salamatin, R. V. and Tkach, V. V. 2000. Electron microscopical study of spermatozoa of the cestode *Dilepis undula* (Cyclophyllidea, Dilepididae). – *Vestnik Zoologii* **34**: 3–7.
- Świdorski, Z., Salamatin, R. V. and Korniyushin, V. V. 2002. Ultrastructure of the spermatozoon of the dilepidid cestode *Kowalewskiiella glareola* (Burt, 1940) Lopez-Neyra, 1952. – *Proceedings of the 12th Conference of Ukrainian Society of Parasitologists*. Sevastopoul, Crimea: 132.
- Thiéry, J. P. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. – *Journal of Microscopy* **6**: 987–1018.
- Watson, N. A. and Rohde, K. 1995. Sperm and spermiogenesis of the “Turbellaria” and implications for the phylogeny of the Phylum Platyhelminthes. – *Mémoires du Muséum National d’Histoire Naturelle* **166**: 37–54.
- Willms, K., Robert, L., Jiménez, J. A., Everhart, M. and Kuhn, R. E. 2004. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon in *Taenia crassiceps strobilae* WFU strain (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) from golden hamsters. – *Parasitology Research* **93**: 262–267.
- Yoneva, A., Georgieva, K., Mizinska, Y., Georgiev, B. B. and Stoitsova, S. R. 2006a. Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Skrjabinoporus merops* (Cyclophyllidea, Metadilepididae). – *Acta Parasitologica* **51**: 200–208.
- Yoneva, A., Miquel, J., Świdorski, Z., Georgieva, K., Mizinska, Y. and Georgiev, B. B. 2006b. Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Angularella beema* (Clerc, 1906) (Cestoda, Cyclophyllidea, Dilepididae). – *Acta Parasitologica* **51**: 264–272.
- Yoneva, A., Świdorski, Z., Georgieva, K., Nikolov, P. N., Mizinska, Y. and Georgiev, B. B. 2008. Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Valipora mutabilis* Linton, 1927 (Cestoda, Cyclophyllidea, Gryporhynchidae). – *Parasitology Research* **103**: 1397–1405.
- Yoneva, A., Georgieva, K., Nikolov, P. N., Mizinska, Y., Georgiev, B. B. and Stoitsova, S. R. 2009. Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Trienorhina rectangula* (Cestoda: Cyclophyllidea: Paruterinidae). – *Folia Parasitologica* **56**: 275–283.
- Yoneva, A., Georgieva, K., Mizinska, Y., Nikolov, P. N., Georgiev, B. B. and Stoitsova, S. R. 2010. Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Anonchotaenia globata* (von Linstow, 1879) (Cestoda, Cyclophyllidea, Paruterinidae). – *Acta Zoologica (Stockholm)* **91**: 184–192.



CHAPITRE IV :

DISCUSSION

CHAPITRE IV : DISCUSSION

L'étude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde de six espèces de cestode appartenant à six ordres (Bothriocephalidea, Cyclophyllidea, Diphyllidea, Proteocephalidea, Tetraphyllidea et Trypanorhyncha) nous a permis de corroborer les résultats d'autres auteurs, mais surtout, de mettre en évidence l'existence de nouveaux caractères chez la plupart des espèces.

Dans les tableaux VII à XIX, nous avons indiqué, pour chaque ordre de cestode, les principaux caractères de la spermiogenèse et du spermatozoïde.

IV.1. Spermiogenèse

Chez les cestodes, la spermiogenèse débute par la formation d'une zone de différenciation. Celle-ci est délimitée en avant, par un anneau de membranes arquées. Elle est bordée de microtubules corticaux et contient deux centrioles, associés ou non, à des racines striées et à un corps intercentriolaire. Au cours de la spermiogenèse, les centrioles donnent naissance à un ou deux flagelles qui poussent à l'intérieur ou à l'extérieur de l'expansion cytoplasmique. Quand il y a formation de flagelles externes, ceux-ci sont situés de part et d'autre de l'expansion cytoplasmique médiane. Dans le cas où les flagelles sont externes, ils peuvent effectuer ou non une rotation, et finissent par fusionner dans le sens antéropostérieur avec l'expansion cytoplasmique médiane (fusion proximo-distale).

Actuellement, la classification de la spermiogenèse chez les cestodes se base sur l'étude de Bâ & Marchand (1995). Selon ces auteurs, les cestodes présenteraient quatre types de spermiogenèse (I à IV) (voir Fig. 2 dans l'introduction, page 46). Ces types furent érigés sur la base de caractères que sont :

- le nombre de flagelles dans la zone de différenciation
- l'existence ou non de rotation flagellaire et de fusion proximo-distale
- la présence ou non de corps intercentriolaire
- la présence ou non de racines striées, associées à des centrioles.

Les types I et II se particularisent par la présence de deux racines striées et d'un corps intercentriolaire au niveau de la zone de différenciation, tandis que les types III et IV en sont dépourvus.

Dans le type I, il existe une rotation de deux flagelles, issus de deux centrioles et une fusion proximo-distale de ceux-ci avec une expansion cytoplasmique médiane. Il a été décrit chez un Tetrphyllidea-Phyllobothriidae, les Tetrphyllidea-Onchobothriidae, les Trypanorhyncha, les Spathobothriidea, les Proteocephalidea, les Bothriocephalidea, les Diphyllobothriidea et chez la plupart des Diphyllidea.

Dans le type II, seul un flagelle est rencontré. L'autre avorte durant les premières phases du processus de spermiogenèse ou n'est même pas généré. Le seul flagelle formé, subit une rotation flagellaire avant de fusionner avec l'expansion cytoplasmique. Il se déroule chez la plupart des Tetrphyllidea-Phyllobothriidae, chez un Diphyllidea, chez les Tetrabothriidea, chez les Caryophyllidea, mais aussi chez les Cyclophyllidea-Mesocestoididae.

Les types III et IV, seulement rencontrés chez les Cyclophyllidea, sont tous deux dépourvus de rotation flagellaire. Le type III se distingue par la formation d'un seul flagelle libre qui pousse parallèlement à l'expansion cytoplasmique avec laquelle il fusionne. Il a été décrit chez un Anoplocephalidae, les Davaineidae, les Catenotaeniidae, les Nematotaeniidae, les Metadilepidae, les Paruterinidae, les Dipylidiidae, les Taeniidae et chez la plupart des Hymenolepididae.

Le type IV est caractérisé par la croissance directe d'un unique axonème dans l'expansion cytoplasmique. Ce modèle, dépourvu de fusion proximo-distale, a été décrit chez un Hymenolepididae, la majorité des Anoplocephalidae, les Dilepididae et les Gryporhynchidae.

Il est important de signaler que les Cyclophyllidea appartenant à la famille des Mesocestoididae présentent une spermiogenèse de type II (Miquel *et al.*, 1999, 2007b) Ce fait provoque une controverse sur la position systématique de cette famille parmi les Cyclophyllidea.

Dans les taxons présentant la spermiogenèse de type I, en particulier chez les Spathebothriidea (Bruňanská *et al.*, 2006 ; Bruňanská & Poddubnaya, 2010), les Bothriocephalidea (Bruňanská *et al.*, 2001 ; Levron *et al.*, 2005, 2006b ; Šípková *et al.*, 2010, 2011 ; présente étude) et les Diphyllbothriidea (Justine, 1986 ; Levron *et al.*, 2006a, 2009, 2011), il existe dans la partie apicale de la zone de différenciation une accumulation d'un matériel dense aux électrons. Ce matériel dense a été décrit pour la première fois par Bruňanská *et al.* (2001) chez *Eubothrium crassum*. Nous l'avons retrouvé chez le Bothriocephalidea *Clestobothrium crassiceps*.

Sa présence a également été mentionnée chez les Caryophyllidea (Bruňanská & Poddubnaya, 2006 ; Miquel *et al.*, 2008a ; Bruňanská, 2009 ; Bruňanská & Kostič, 2011 ; Yoneva *et al.*, 2011). Or, cet ordre, considéré comme l'un des moins évolués parmi les eucestodes, présente la spermiogenèse de type II. Ce fait a poussé Bruňanská & Poddubnaya (2010) à supposer que ce caractère pourrait être considéré comme propre aux groupes basaux de cestodes.

Cependant, nous avons signalé la présence de ce matériel dense chez le Proteocephalidea *Barsonella lafoni* durant les premières phases du processus de spermiogenèse. Ainsi, ce caractère antérieurement considéré comme typique des groupes basaux des Eucestoda, est aussi retrouvé dans le groupe, considéré comme plus proche de l'ancêtre des Cyclophyllidea, les Proteocephalidea (Euzet, 1994 ; Levron *et al.*, 2010).

Par contre, chez d'autres groupes présentant la spermiogenèse de type I, en particulier chez les Tetrphyllidea-Onchobothriidae (Mokhtar-Maamouri & Świdorski, 1975 ; Mokhtar-Maamouri, 1982 ; Quilichini *et al.*, 2007 ; présente étude), les Tetrphyllidea-Phyllobothriidae (Sène *et al.*, 1999), les Trypanorhyncha (McKeer, 1985 ; Świdorski, 1976a, 1994 ; présente étude), les Diphyllidea (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984 ; Azzouz-Draoui, 1985 ; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88 ; présente étude), les Proteocephalidea (Sène *et al.*, 1997 ; Bruňanská *et al.*, 2003b, 2004c, 2005) et d'autres groupes présentant la spermiogenèse de type II, tels que les Tetrphyllidea-Phyllobothriidae (Mokhtar-Maamouri, 1979), les Tetrbothriidea (Stoitsova *et al.*, 1995), les Cyclophyllidea-Mesocestoididae (Miquel *et al.*, 1999,

2007b) et les Diphyllidea (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984 ; Azzouz-Draoui, 1985 ; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88), cette présence de matériel dense n'a pas été signalée.

Chez quelques Cyclophyllidea, un caractère, plus ou moins similaire, a aussi été décrit. En effet, Bâ & Marchand (1995) révélèrent la présence d'un matériel dense associé aux centrioles, portant le nom d'adjonction centriolaire, dans la spermiogenèse de type IV (voir Fig. 2 dans l'introduction, page 46). Cette structure a été observée chez les Cyclophyllidea anoplocephalidés, *Thysaniezia ovilla* (Bâ *et al.*, 1991), *Gallegoides arfaai* (Miquel *et al.*, 2005b) et *Mosgovoyia ctenoides* (Eira *et al.*, 2006). Par contre, d'autres anoplocéphalidés, comme *Anoplocephaloides dentata*, *Aporina delafoni* et *Moniezia expansa* (Bâ & Marchand, 1994b ; Miquel & Marchand, 1998a ; Li *et al.*, 2003), les dilepididés *Angularella beema* et *Molluscotaenia crassiscolex* (Yoneva *et al.*, 2006a ; présente étude), le gryporhynchidé *Valipora mutabilis* (Yoneva *et al.*, 2008) et l'hymenolepididé *Rodentolepis nana* (= *Hymenolepis nana*) (Bâ & Marchand 1992a), présentant la spermiogenèse de type IV, sont dépourvus d'adjonction centriolaire. Ainsi, l'étude de *Molluscotaenia crassiscolex* nous a permis de confirmer le fait que, l'adjonction centriolaire n'est pas présente chez toutes les espèces ayant une spermiogenèse de type IV.

D'autres matériels opaques aux électrons ont également été décrits, entre et sous les centrioles, au cours de la spermiogenèse des Anoplocephalidae, *Sudarikovina taterae* et *Mathevotaenia herpestis* (Bâ & Marchand, 1994f ; Bâ *et al.*, 2000) et de l'Hymenolepididae, *Rodentolepis microstoma* (= *Vampirolepis microstoma*) (Bâ & Marchand, 1998).

Le nombre de bandes de matériel opaque aux électrons formant le corps intercentriolaire a été utilisé dans les analyses phylogénétiques récentes réalisées avec des données ultrastructurales seules, ou avec la combinaison de données morphologiques et ultrastructurales (Levron *et al.*, 2010). Le corps intercentriolaire est absent chez les Tetrabothriidea et les Cyclophyllidea à l'exception des mésocestoididés (Miquel *et al.*, 1999, 2007b). Il n'a pas non plus été observé chez *Monobothrioides chalmersius* (Caryophyllidea, Lytocestidae) (Arafa & Hamada, 2004). Par contre, il se présente sous la forme d'une seule bande opaque aux électrons chez les Lecanicephalidea et de

nombreuses bandes opaques aux électrons chez la plupart des ordres (Tableaux VII, VIII, IX, X, XII, XIII et XIV).

Chez les Eucestodes, le nombre de bandes formant le corps intercentriolaire varie de 1 à 10. Le nombre maximum a été rencontré chez le Diphyllidea, *Echinobothrium affine* (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984 ; Azzouz-Draoui 1985 ; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88). Cependant, chez la plupart des espèces de cestodes ce nombre est réduit et varie entre un et trois (Tableaux VII, VIII, IX, X, XII, XIV et XVII), sauf chez les trypanorhynques qui en présentent au minimum cinq bandes (Tableau XIII). En outre, pour les Proteocephalidea, ce nombre est très réduit et chez la quasi totalité des espèces étudiées le corps intercentriolaire est constitué d'une seule bande opaque aux électrons (Sène *et al.*, 1997 ; Bruňanská *et al.*, 2003b, 2004c, 2005 ; présente étude), tandis que chez tous les bothriocephalidés, excepté *Echinobothrium crassum* (Bruňanská *et al.*, 2001), le corps intercentriolaire est constitué de trois bandes opaques aux électrons (Levron *et al.*, 2005, 2006b ; Šípková *et al.*, 2010, 2011 ; présente étude).

Selon Justine (2001), la réduction progressive de taille du corps intercentriolaire se déroulerait chez les groupes les plus évolués. Ainsi, les Proteocephalidea pourraient être considérés, en prenant en compte la forte réduction du nombre de bandes de leur corps intercentriolaire, comme un groupe proche de ceux dépourvus de corps intercentriolaire, tels que les Tetrabothriidea et les Cyclophyllidea, ou encore les Lecanicephalidea qui, comme eux, présentent une seule bande (Justine, 2001).

Les racines striées, structures souvent associées aux centrioles, ont été décrites chez toutes les espèces présentant une spermiogenèse de type I ou II. Elles ont une forme conique et sont constituées par une alternation de bandes translucides et opaques aux électrons. Cependant, dans notre étude de *Echinobothrium euterpes* mais aussi chez tous les autres Diphyllidea, les racines striées sont remplacées par un matériel opaque aux électrons, d'aspect granulaire, ne présentant pas de striations visibles et ayant une forme triangulaire. Cette structure, uniquement décrite chez les Diphyllidea (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984 ; Azzouz-Draoui, 1985 ; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88 ; présente étude) pourrait jouer le même rôle que les

racines striées. Elle pourrait aussi être une synapomorphie pour l'ensemble des Diphyllidea.

Deux racines striées, accolées l'une à l'autre, reliées à un seul centriole, ont été décrites chez quelques espèces de cestode. Cette particularité a été observée chez le Diphyllbothriidea, *Diphyllbothrium latum* (Levron *et al.*, 2006a), le Caryophyllidea, *Khawia armeniaca* (Bruňanská & Poddubnaya, 2006) et dans notre étude chez le Proteocephalidea, *Barsonella lafoni* (présente étude). Ce caractère pourrait être intéressant dans les études phylogénétiques.

Une autre caractéristique rencontrée chez quelques Tetrephyllidea (Mokhtar-Maamouri & Świdorski, 1975 ; Mokhtar-Maamouri 1979, 1982 ; Sène *et al.*, 1999 ; présente étude), chez les Proteocephalidea (Bruňanská *et al.*, 2003b, 2004c ; présente étude) et chez un Bothriocephalidea (présente étude) est la persistance de racines striées dans le corps de la spermatide après la fusion proximo-distale. Il est important de noter que toutes ces espèces présentent la spermiogenèse de type I.

Selon Bâ & Marchand (1995), les spermiogenèses de types III et IV (ou types Cyclophyllidea de Świdorski, 1986a) seraient dépourvues de racines striées dans leur zone de différenciation. Cependant, des études ultérieures ont permis de mettre en évidence la présence de racines striées chez les Cyclophyllidea. En particulier, des racines striées bien développées ont été décrites chez deux espèces de Dipylidiidae du genre *Joyeuxiella* (Ndiaye *et al.*, 2003a ; Miquel *et al.*, 2005a), des racines striées vestigiales, d'aspect spiralé et filamenteux, ont été observées dans la zone de différenciation des anoplocephalidés, *Anoplocephaloides dentata*, *Gallegoides arfaai*, *Moniezia expansa* et *Mosgovoyia ctenoides* (Miquel & Marchand, 1998a ; Li *et al.*, 2003 ; Miquel *et al.*, 2005b ; Eira *et al.*, 2006), du dipylidiidé, *Dipylidium caninum* (Miquel *et al.*, 1998a, 2005a), du métadilépididé, *Skrjabinoporus merops* (Yoneva *et al.*, 2006b), des paruterinidés, *Triaenorhina rectangula* et *Anonchotaenia globata* (Yoneva *et al.*, 2009, 2010), et du taeniidé, *Taenia taeniaeformis* (Miquel *et al.*, 2009a).

Les microtubules corticaux forment une couche continue de matériel dense aux électrons sous la membrane de l'expansion cytoplasmique. Ils apparaissent, dès le début de la spermiogenèse, parallèles à l'axe de l'expansion.

Contrairement aux autres eucestodes, les Diphyllidea présentent ou pas des microtubules corticaux dans la zone de différenciation de leurs spermatides. En effet, chez *Echinobothrium brachysoma* et *E. typus* (Azzouz-Draoui, 1985), très peu de microtubules corticaux apparaissent durant la phase initiale de la spermiogenèse. Chez *Echinobothrium euterpes* (présente étude), les microtubules corticaux, en nombre très réduit, sont disposés, dans la partie proximale de la zone de différenciation et persistent pendant toute la durée de la spermiogenèse. Chez *E. affine* (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984 ; Azzouz-Draoui, 1985 ; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88), ils forment deux rangées périphériques le long de l'expansion cytoplasmique médiane. Par contre, chez *E. harfordi* (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984 ; Azzouz-Draoui 1985 ; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88), ils sont rares et quelquefois absents. Ce caractère « absence ou carence » de microtubules corticaux, jusqu'ici signalé uniquement chez les Diphyllidea, pourrait être un caractère important, spécifique à ce groupe.

Chez les cyclophyllidés et les tétrabothriidés, les microtubules corticaux deviennent spiralés, à la fin de la spermiogenèse. Cette torsion des microtubules peut, dans certains cas, s'accompagner d'un processus de condensation cytoplasmique qui serait à l'origine de la formation de la gaine périaxonémale, présente dans le spermatozoïde mûr de quelques cyclophyllidés (Ndiaye *et al.*, 2003a ; Miquel *et al.*, 2005a, 2010). Le processus de condensation cytoplasmique et la torsion tardive des microtubules corticaux ont été clairement démontrés chez les dipylidiidés, *Joyeuxiella echinorhynchoïdes* et *J. pasqualei* (Ndiaye *et al.*, 2003a). Une condensation de matériel granulaire, à la périphérie des spermatides, a été observée chez le Cyclophyllidea-Dilepidiidae, *Molluscotaenia crassiscolex* (présente étude), le Taeniidae *Taenia taeniaeformis* (Miquel *et al.*, 2009a) et le Tetrabothriidea *Tetrabothrius erostris* (Stoitsova *et al.*, 1995), mais la formation de la gaine périaxonémale n'a pas été observée durant la spermiogenèse. Il est intéressant de remarquer que les Tetrabothriidea suivent la spermiogenèse de type II, les espèces des genres *Joyeuxiella* et *Taenia* la spermiogenèse de type III et *Molluscotaenia crassiscolex* la spermiogenèse de type IV.

Après la formation de la zone de différenciation, un ou deux flagelles prennent naissance à partir des centrioles. Selon Bâ & Marchand (1995), dans les spermiogénèses de types I et II, les flagelles croissent orthogonalement à l'axe de l'expansion cytoplasmique médiane, puis, pivotent d'un angle de 90° et fusionnent avec celle-ci. Cependant, chez le spathébothriidé, *Cyathocephalus truncatus* et le caryophyllidé, *Wenyonia virilis*, les flagelles subissent une rotation de plus de 90°, puis, fusionnent avec l'expansion cytoplasmique médiane (Bruňanská *et al.*, 2006 ; Miquel *et al.*, 2008a).

Selon la description originale de Bâ & Marchand (1995), les spermiogénèses de types III et IV (ou types cyclophyllidés de Świderski, 1986a), seraient dépourvus de rotation flagellaire. Cependant, une légère rotation flagellaire a été observée chez quelques espèces de Cyclophyllidea. On peut citer, en particulier, le Catenotaeniidae, *Catenotaenia pusilla* (Hidalgo *et al.*, 2000), le Metadilepididae, *Skrjabinoporus merops* (Yoneva *et al.*, 2006b), les Paruterinidae, *Anonchotaenia globata* et *Triaenorhina rectangula* (Yoneva *et al.*, 2009, 2010), et les Taeniidae, *Taenia parva* et *Taenia taeniaeformis* (Ndiaye *et al.*, 2003b ; Miquel *et al.*, 2009a). Ces résultats semblent réfuter l'hypothèse selon laquelle l'absence de rotation flagellaire serait une synapomorphie pour les Cyclophyllidea, proposée par Bâ & Marchand (1995) ainsi que par Justine (1998a, 2001).

Selon de nombreux auteurs, la position systématique des Cyclophyllidea-Mesocestoididae est incertaine. En effet, ils se caractérisent par un cycle biologique et une morpho-anatomie différents de ceux des autres Cyclophyllidea (Khalil *et al.*, 1994). En outre, les études moléculaires (Mariaux, 1998) ont montré la nécessité de les exclure de cet ordre ou bien d'incorporer de nouveau les Tetrabothriidea pour que l'ordre des cyclophyllidés soit considéré comme monophylétique. Également, les caractères ultrastructuraux des spermatozoïdes des Mesocestoididae sont plésiomorphiques, en comparaison avec ceux observés chez les autres Cyclophyllidea (Miquel *et al.*, 1999, 2007b). Ainsi, la spermiogénèse de type II a été rencontrée chez les espèces de Mesocestoididae (Miquel *et al.*, 1999, 2007b).

Durant la spermiogénèse, la rotation du ou des flagelles est suivie de la fusion proximo-distale. Au terme de cette fusion, le ou les flagelles s'incorporent complètement dans

l'expansion cytoplasmique médiane. Cependant, chez les caryophyllidés, *Glaridacris catostomi* et *Monobothrioides chalmersius* (Świdorski 2011 ; Świdorski & Mackiewicz, 2002 ; Arafa & Hamada, 2004), et le Cyclophyllidea-Anoplocephalidae, *Moniexia expansa* (Li *et al.*, 2003), l'axonème ne se serait pas totalement incorporé dans l'expansion cytoplasmique médiane, ce qui donnerait naissance à un spermatozoïde ayant un bout d'axonème libre dans sa partie distale. Mais, en analysant attentivement les images de la partie distale publiées par ces derniers, elles nous ont paru correspondre, en réalité, à des coupes transversales de spermatides, durant la fusion proximo-distale.

IV.2. Spermatozoïde

Les études ultrastructurales du spermatozoïde des plathelminthes ont apporté des précisions d'une grande utilité dans l'interprétation des relations phylogénétiques entre les grands groupes de plathelminthes parasites. Chez les cestodes, en particulier, on peut citer les travaux de Justine (1991a,b, 1995, 1998a,b, 2001), de Bâ & Marchand (1995) et de Levron *et al.* (2010).

Euzet *et al.* (1981), ont utilisé le nombre d'axonème (un ou deux) dans le spermatozoïde des cestodes pour étayer les hypothèses phylogénétiques antérieures, basées sur des caractères morphologiques, entre différents ordres de cestode. Cependant, les contributions les plus amplement considérées, furent celles de Świdorski (1986a), Bâ & Marchand (1995) et Justine (1991a, 1995, 1998a, 2001, 2003). Récemment, à l'instar de Justine (2001), Levron *et al.* (2010) firent une analyse de toutes les données spermatologiques et proposèrent sept types de spermatozoïdes chez les Eucestoda (voir Fig. 4 dans l'introduction, page 50). Ces sept types de spermatozoïdes furent établis sur la base du nombre d'axonèmes, de la présence ou pas de corps en crête hélicoïdal, de la disposition, parallèle ou spiralée, du noyau, de la disposition, parallèle ou spiralée, des microtubules corticaux, de la présence ou pas de gaine périaxonémale et de la présence ou pas de parois intracytoplasmiques de matériel opaque aux électrons.

Ainsi, les types I et II contiennent deux axonèmes. Le type I, caractérisé par la présence de microtubules corticaux parallèles et d'un noyau parallèle se rencontre chez les

Spathebothriidea, les Diphyllbothriidea, les Haplobothriidea et les Trypanorhyncha. Le type II, rencontré chez les Bothriocephalidea, les Tetrephyllidea-Onchobothriidae, les Proteocephalidea et chez quelques Diphyllidea, présente, en plus du noyau parallèle, et des microtubules corticaux parallèles, un corps en crête hélicoïdal dans sa partie antérieure (Levron *et al.*, 2010).

Les types III, IV, V, VI et VII présentent un unique axonème. Le type III est caractérisé par la présence de microtubules corticaux parallèles et un noyau parallèle. Il a été décrit chez les Caryophyllidea. Le type IV, en plus des caractères décrits dans le type III, présente un corps en crête hélicoïdal. Il se rencontre chez les Tetrephyllidea-Phyllobothriidae, les Mesocestoididae et, peut-être, chez les Lecanicephalidea. Les spermatozoïdes de type V, VI et VII se rencontrent uniquement chez les Cyclophyllidea, hormis la famille des Mesocestoididae. Ils contiennent un noyau spiralé et des microtubules corticaux spiralés. Le type V est dépourvu de gaine périaxonémale et de parois intracytoplasmiques de matériel opaque aux électrons. Le type VI est caractérisé par la présence de gaine périaxonémale tandis que le type VII présente, à la fois, une gaine périaxonémale et des parois intracytoplasmiques de matériel opaque aux électrons. Le type VII a aussi été décrit chez les Tetrabothriidea (Levron *et al.*, 2010).

Le nombre d'axonèmes dans le spermatozoïde est un caractère d'une grande importance phylogénétique chez les Eucestoda. En effet, il a permis de distinguer des spermatozoïdes à deux et à un seul axonème. Ces derniers sont considérés comme plus évolués que les premiers (Euzet *et al.*, 1981 ; Justine, 1998a, 2001).

En ce qui concerne les Tetrephyllidea, les Onchobothriidae et Phyllobothriidae présentent un schéma spermatologique différent. Les onchobothriidés ont un spermatozoïde de type II (Mokhtar-Maamouri & Świdorski, 1975 ; Mokhtar-Maamouri, 1982 ; Quilichini *et al.*, 2007 ; présente étude), tandis que chez les phyllobothriidés, deux types de spermatozoïdes sont rencontrés : le type II avec deux axonèmes (Mahendrasingam *et al.*, 1989) et le type IV avec un seul axonème (Mokhtar-Maamouri, 1979 ; MacKinnon & Burt 1984) (Tableau XIV). Par conséquent, les tétraphyllidés sont considérés comme un groupe paraphylétique comme l'ont aussi montré les analyses phylogénétiques (Caira *et al.*, 1999).

Chez les Diphyllidea, les études phylogénétiques (Caira *et al.*, 1999, 2001 ; Ivanov & Hoberg, 1999) montrent que l'ordre est monophylétique. Par contre, les études ultrastructurales de cinq espèces du même genre révèlent la présence de trois types de spermatozoïdes : le type I chez une seule espèce (Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1984 ; Azzouz-Draoui, 1985) ; le type II chez deux espèces (Azzouz-Draoui, 1985) et le type IV chez deux autres espèces (Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1984 ; Azzouz-Draoui 1985 ; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88 ; présente étude) (Tableau XII). Ces différents types de spermatozoïdes rencontrés chez des espèces du même genre posent un grand problème. Il sera donc important d'étudier d'autres espèces de Diphyllidea pour élucider le modèle général du spermatozoïde de cet ordre.

Néanmoins, le Diphyllidea, *Echinobothrium euterpes*, que nous avons étudié, présente un spermatozoïde de type IV, de même que *Echinobothrium harfordi* (Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88). Durant le processus de spermiogenèse, *E. harfordi* présenterait un flagelle long et un bouton flagellaire, *E. euterpes*, *E. typus* et *E. brachysoma* possèderaient un flagelle long et un flagelle court, tandis que chez *E. affine* le flagelle court serait un peu plus développé que chez les autres espèces. Ce flagelle court, par analogie à ce que nous avons observé chez *E. euterpes*, dégénérerait à la fin de la spermiogenèse. Par conséquent le spermatozoïde des Diphyllidea aurait un seul axonème et serait de type IV.

Selon la classification faite par Levron *et al.* (2010), il existe quelques espèces de cestode dont le spermatozoïde est difficile à classer. On peut citer en particulier, le Proteocephalidea, *Sandonella sandoni* (Bâ & Marchand, 1994a), ne possédant qu'un seul axonème (type IV de spermatozoïde), le Tetrephyllidea-Phyllobothriidae, *Trilocularia acanthiaevulgaris* (Mahendrasingam *et al.*, 1989), présentant deux axonèmes (type II de spermatozoïde) et le Diphyllbothriidae, *Duthiersia fimbriata* (Justine, 1986), doté de corps en crête (type II de spermatozoïde).

Chez la plupart des cestodes, l'extrémité antérieure du spermatozoïde est marquée par la présence d'un centriole et/ou d'un ou de plusieurs corps en crête (Bâ & Marchand, 1995 ; Justine, 1998a ; 2001). Le corps en crête hélicoïdal a été décrit, pour la première fois, par Mokhtar-Maamouri & Świdorski (1975) chez *Acanthobothrium benedeni* et

Onchobothrium uncinatum, et il jouerait un rôle important dans la fécondation. Il a été considéré comme une synapomorphie des Eucestoda (Bâ & Marchand, 1995) ou d'une partie des Eucestoda (Justine, 1998a, 2001). En effet, le corps en crête serait absent chez les groupes considérés comme ancestraux tels que les Caryophyllidea (Świdorski & Mackiewicz, 2002 ; Arafa & Hamada, 2004 ; Bruňanská & Poddubnaya, 2006 ; Miquel *et al.*, 2008a ; Bruňanská, 2009 ; Bruňanská & Kostič, 2011 ; Yoneva *et al.*, 2011), les Spathebothriidea (Bruňanská *et al.*, 2006 ; Bruňanská & Poddubnaya, 2010) les Haplobothriidea (MacKinnon & Burt, 1985), les Trypanorhyncha (Miquel & Świdorski 2006a ; Miquel *et al.*, 2007a ; présente étude) et chez le nouvel ordre des Diphylobothriidea (Levron *et al.*, 2006a, 2009, 2011) (Tableaux VII, VIII, IX et XIII).

Le corps en crête est un fin cordon de matériel opaque aux électrons, enroulé en spirale autour de l'extrémité antérieure du spermatozoïde des cestodes. Son épaisseur varie entre 30 et 300 µm chez les cestodes. Nous l'avons évaluée à environ 60-90 nm chez *Barsonella lafoni*, 80 nm chez *Echinobothrium euterpes*, 160 nm chez *Clestobothrium crassiceps*, entre 160 et 330 nm chez *Molluscotaenia crassiscolex* et 200 nm chez *Acanthobothrium crassicolle*.

Le corps en crête présente une morphologie et une conformation variées suivant les espèces. En effet, chez *M. crassiscolex* il est totalement accolé à l'axonème dans les parties antérieure et postérieure de la région I du spermatozoïde. Par contre, il s'en détache dans sa zone médiane.

Par contre, chez le Bothriocephalidea, *Clestobothrium crassiceps* (présente étude), il ne décrit qu'un seul tour de spire autour de l'axonème.

En plus des variations morphologiques, le corps en crête est aussi sujet à des variations numériques. En effet, un à douze corps en crête ont été décrits dans le spermatozoïde des cestodes. Cette variabilité numérique, observée pour la première fois par Bâ *et al.* (1991) chez *Thysaniezia ovilla* (Cyclophyllidea, Anoplocephalidae), a été retrouvée chez d'autres Cyclophyllidea, ainsi que chez le Proteocephalidea, *Nomimoscolex* sp. (Sène *et al.*, 1997). Chez ce dernier, trois corps en crête ont été mentionnés. La variabilité du nombre de corps en crête chez les Cyclophyllidea a surtout été remarquable dans la famille des Hymenolepididae : entre six et neuf chez *Hymenolepis*

sulcata (Miquel *et al.*, 2007c), six chez *Cladogynia serrata* (= *Retinometra serrata*) (Bâ & Marchand, 1993), entre un et huit chez *Echinocotyle dolosa* (Bâ *et al.*, 2002), entre sept et dix chez *Rodentolepis fraterna* (Miquel *et al.*, 2007c), entre un et six chez *Rodentolepis microstoma* (Bâ & Marchand, 1998), entre cinq et neuf chez *Rodentolepis myoxi* (Miquel *et al.*, 2007c), douze chez *Rodentolepis nana* (Bâ & Marchand, 1992a), huit chez *Rodentolepis straminea* (= *Hymenolepis straminea*) (Bâ & Marchand, 1996a), onze chez *Rodentolepis* sp. (Miquel *et al.*, 2007c). Chez les autres familles de Cyclophyllidea (Anoplocephalidae –sauf *Sudarikovina taterae*–, Catenotaeniidae, Nematotaeniidae, Davaineidae, Dilepididae, Metadilepidae, Paruterinidae, Gryporhynchidae, Dipylidiidae, Mesocestoididae, Taeniidae) le nombre de corps en crête varie entre 1 et 2 (Tableau XIX).

Une autre structure, caractéristique de l'extrémité antérieure du spermatozoïde des cestodes est le cône apical. Celui-ci, de forme plus ou moins conique, est généralement opaque aux électrons. Il se situe en avant du centriole constitué de neuf triplets de microtubules, entourés ou non du corps en crête hélicoïdal. Cependant, il n'est pas présent chez tous les cestodes.

Le cône apical a été décrit chez deux Bothriocephalidea (Bâ *et al.*, 2007 ; présente étude), deux Tetrephyllidea-Onchobothriidae (Quilichini *et al.*, 2007 ; présente étude), un Diphyllidea (présente étude), trois Proteocephalidea (Bâ & Marchand, 1994a ; Sène *et al.*, 1997 ; présente étude), et de nombreux Cyclophyllidea dont un Mesocestoididae (Miquel *et al.*, 2007b), tous les Anoplocephalidae (Bâ *et al.*, 1991, 2000 ; Bâ & Marchand, 1992b,c, 1994b,d,e,f,g ; Miquel & Marchand, 1998a ; Li *et al.*, 2003 ; Miquel *et al.*, 2004 ; Eira *et al.*, 2006), deux Catenotaeniidae (Miquel *et al.*, 1997a ; Hidalgo *et al.*, 2000), un Nematotaeniidae (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1990), tous les Davaineidae (Bâ *et al.*, 1994c,d ; Bâ *et al.*, 2005a,b ; Miquel *et al.*, 2010), un Dilepididae (présente étude), un Metadilepidae (Yoneva *et al.*, 2006b), deux Paruterinidae (Yoneva *et al.*, 2009, 2010), un Gryporhynchidae (Yoneva *et al.*, 2008), trois Dipylidiidae (Miquel & Marchand, 1997 ; Ndiaye *et al.*, 2003a ; Miquel *et al.*, 2005a), trois Hymenolepididae (Bâ & Marchand, 1993, 1996a ; Bâ *et al.*, 2002) et quatre Taeniidae (Miquel *et al.*, 2000a, 2009b ; Ndiaye *et al.*, 2003b ; Bâ *et al.*, 2011). Ainsi, le cône apical a été décrit dans cinq des dix sept ordres que compte la classe des cestodes (Tableaux X, XII, XIV, XVII et XIX). Il convient de remarquer que chez les

Diphyllidea, les espèces du genre *Echinobothrium*, précédemment étudiées, étaient toutes dépourvues de cône apical. Nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois, sa présence chez un Diphyllidea, avec *Echinobothrium euterpes*.

Le cône apical n'a pas été pris en compte par Levron *et al.* (2010) dans leur dernière révision systématique et phylogénétique des cestodes. Or, sa présence à l'extrémité antérieure du spermatozoïde des cestodes, appartenant à des ordres différents, pourrait être un caractère clef dans la compréhension de leur phylogénie. Il serait donc convenable de le considérer dans une future analyse des caractères du spermatozoïde des cestodes, d'autant plus qu'il n'a jamais été décrit chez une espèce dépourvue de corps en crête.

Des microtubules corticaux, disposés en arc, ont été décrits, aussi bien dans la partie antérieure que dans la région postérieure du spermatozoïde des cestodes. Un arc de microtubules corticaux a été décrit, à l'avant du spermatozoïde, chez tous les Tetraphyllidea (Mokhtar-Maamouri & Świdorski, 1975 ; Mokhtar-Maamouri, 1979 ; Mokhtar-Maamouri, 1982 ; MacKinnon & Burt, 1984 ; Mahendrasingam *et al.*, 1989 ; Quilichini *et al.*, 2007 ; présente étude), un Rhinebothriidea (Mokhtar-Maamouri & Świdorski, 1976), trois Trypanorhyncha (Miquel & Świdorski, 2006a ; Miquel *et al.*, 2007a ; présente étude), trois Spathebothriidea (MacKinnon & Burt, 1984 ; Bruňanská *et al.*, 2006 ; Bruňanská & Poddubnaya, 2010), quatre Diphyllbothriidea (Justine, 1986, Levron *et al.*, 2006a, 2009, 2011), cinq Caryophyllidea (Arafa & Hamada, 2004 ; Gamil, 2008 ; Bruňanská, 2009 ; Bruňanská & Kostič, 2011 ; Yoneva *et al.*, 2011), un Bothriocephalidea (Bâ *et al.*, 2007) et deux Cyclophyllidea-Mesocestoididae (Miquel *et al.*, 1999, 2007b) (Tableaux VII, VIII, X, XIII, XIV, XV et XIX). Chez les Proteocephalidea, cet arc de microtubules normalement présent qu'au niveau de l'extrémité antérieure du gamète mâle, a été également décrit par les auteurs (Bâ & Marchand, 1994a ; Sène *et al.*, 1997 ; Bruňanská *et al.*, 2003a,c, 2004a,b) dans la zone postérieure. Toutefois, par analogie à ce qui a été jusque là décrit chez plusieurs groupes de cestodes et, en nous basant sur les résultats que nous avons obtenus avec l'étude du Proteocephalidea, *Barsonella lafoni*, nous pouvons considérer que l'arc de microtubules corticaux serait seulement restreint dans la région antérieure du spermatozoïde, comme chez toutes les espèces chez lesquelles ce caractère fut signalé. De plus, chez tous les

Proteocephalidea, cet arc de microtubules corticaux se dessine déjà dans la zone pourvue de corps de crête.

Le nombre de microtubules corticaux formant l'arc varie de 3 à 18, selon le niveau de sections et selon les espèces. Ainsi, l'arc de microtubules corticaux est rencontré chez les espèces dont le spermatozoïde est de type I, II, III ou IV, sauf les Bothriocephalidea et les Diphyllidea (Tableaux VII, VIII, XIII, XIV, XV, XVII et XIX).

Chez les Bothriocephalidea, un anneau, constitué de 25 à 30 microtubules corticaux, très opaques aux électrons, a été signalé, en lieu et place de l'arc de microtubules. A l'exception de *Bothriocephalus claviceps* (Bâ *et al.*, 2007), cet anneau de microtubules a été décrit chez la totalité des espèces de Bothriocephalidea (Świdorski & Mokhtar-Maamouri, 1980 ; Bruňanská *et al.* 2002, 2010 ; Levron *et al.*, 2005, 2006b,c ; Šípková *et al.*, 2010, 2011 ; présente étude). Cependant, chez *Triaenophorus nodulosus* (Levron *et al.*, 2010, 2011 ; présente étude). Cependant, chez *Triaenophorus nodulosus* (Levron *et al.*, 2006c) et *Eubothrium rugosum* (Bruňanská *et al.*, 2010), les microtubules corticaux forment un anneau et demi autour du centriole.

Les microtubules disposés en arc ou en anneau sont plus épais en comparaison aux autres microtubules présents dans le spermatozoïde. Ainsi, on distingue deux types de microtubules corticaux. L'apparition du deuxième type coïncide avec celle du second axonème chez les espèces présentant deux axonèmes dans le spermatozoïde. Ces deux types de microtubules corticaux, énoncés pour la première fois chez *Echeinebothrium beauchampi* par Mokhtar-Maamouri & Świdorski (1976), ont été retrouvés chez de nombreuses espèces de cestodes appartenant aux ordres suivants : Tetraphyllidea (présente étude), Bothriocephalidea (Świdorski & Mokhtar-Maamouri, 1980 ; Bruňanská *et al.*, 2002, 2010 ; Levron *et al.*, 2005, 2006b,c ; Šípková *et al.*, 2010, 2011 ; présente étude), Diphyllbothriidea (Justine, 1986), Trypanorhyncha (Miquel & Świdorski, 2006a, Miquel *et al.*, 2007a ; présente étude), Proteocephalidea (Bruňanská *et al.*, 2003a,c, 2004a,b ; présente étude) et Cyclophyllidea-Mesocestoididae (Miquel *et al.*, 1999, 2007b).

Par contre, chez les Diphyllidea, le spermatozoïde ne contient que quelques microtubules corticaux. Ils ont été décrits dans le spermatozoïde de *Echinobothrium affine* (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984 ; Azzouz-Draoui, 1985 ; Azzouz-

Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88) et *E. euterpes* (présente étude). Chez *E. euterpes*, les microtubules, en nombres très réduits, sont limités dans la région antérieure du spermatozoïde, pourvue de corps en crête.

Dans le spermatozoïde des cestodes, les microtubules corticaux sont parallèles entre eux (caractère primitif ou plésiomorphe) ou spiralés (caractère dérivé ou apomorphe). La présence de microtubules corticaux spiralés a été considérée comme une synapomorphie des Cyclophyllidea et des Tetrabothriidea (Justine, 1998a, 2001). Cependant, chez les Cyclophyllidea-Mesocestoididae, les microtubules corticaux sont parallèles entre eux (Miquel *et al.*, 1999, 2007b). De plus, les Mesocestoididae se distinguent des autres Cyclophyllidea par la présence d'autres caractères plésiomorphes, au cours du processus de la spermiogénèse.

Chez les Cyclophyllidea, l'angle de torsion des microtubules corticaux par rapport au supposé axe longitudinal du spermatozoïde varie selon les familles, mais ne dépasse guère 60° (Tableau XIX). En effet, il a été estimé entre 15 et 50° chez les Anoplocephalidae (Bâ & Marchand, 1992b,c ; Bâ & Marchand, 1994b ; Miquel *et al.*, 2004 ; Eira *et al.*, 2006...), 45 et 60° chez les Davaineidae (Bâ & Marchand, 1994c ; Bâ *et al.*, 2005a ; Miquel *et al.*, 2010...), 30 et 45° chez les Dilepididae (Świdorski *et al.*, 2000 ; Yoneva *et al.*, 2006a ; présente étude), 15 et 30° chez les Hymenolepididae (Bâ & Marchand, 1992a, 1993, 1996a, 1998), 30 et 40° chez les Metadilepididae (Yoneva *et al.*, 2006b), 35 et 40° chez les Paruterinidae (Yoneva *et al.*, 2009, 2010), 40 et 50° chez les Taeniidae (Featherston, 1971 ; Ndiaye *et al.*, 2003b ; Miquel *et al.*, 2009b ; Bâ *et al.*, 2010...), 45° chez les Gryporhynchidae (Yoneva *et al.*, 2008), 40° chez les Catenotaeniidae (Miquel *et al.*, 1997a ; Hidalgo *et al.*, 2000) et les Dipylidiidae (Miquel & Marchand, 1997 ; Ndiaye *et al.*, 2003a).

Des granules de matériel opaque aux électrons ont également été décrits dans le cytoplasme du spermatozoïde de nombreuses espèces de cestodes. Cependant, chez certaines espèces, en particulier, le Caryophyllidea, *Breviscolex orientalis* (Yoneva *et al.*, 2011), les Diphyllbothriidea, *Ligula intestinalis* et *Schistocephalus solidus* (Levron *et al.*, 2009, 2011), les granules de matériel dense sont remplacés par une zone dense aux électrons. D'autre part, de nombreux Cyclophyllidea : Anoplocephalidae (Bâ & Marchand, 1992c, 1994e,f,g), Catenotaeniidae (Miquel *et al.*, 1997a ; Hidalgo *et al.*,

2000), Metadilepididae (Yoneva *et al.*, 2006b), Paruterinidae (Yoneva *et al.*, 2009, 2010) et Dipylidiidae (Miquel & Marchand, 1997 ; Ndiaye *et al.*, 2003a), sont aussi dépourvus de granules. Concernant les Cyclophyllidea-Taeniidae, l'étude de *Taenia taeniaeformis* par Miquel *et al.* (2009b) a montré que les spermatozoïdes de toutes les espèces du genre *Taenia* sont dépourvus de granules de matériel opaque aux électrons. La dernière étude de Bâ *et al.* (2011) sur *Taenia saginata* confirme cette description (Tableau XIX).

Selon l'état dispersé ou en rosettes des granules de matériel opaque aux électrons, on peut distinguer deux types de glycogène : α et β (Świdorski, 1976a, 1994 ; Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984 ; Azzouz-Draoui, 1985 ; McKerr, 1985 ; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88 ; Miquel & Świdorski, 2006a ; Miquel *et al.*, 2007a ; présente étude). La nature glycogénique des granules denses peut être prouvée par le test de Thiéry (1967). Ce test, le plus souvent négligé dans les études ultrastructurales, est d'une importance capitale, surtout chez les Cyclophyllidea où, généralement, la présence de nombreuses inclusions, de matériel opaque aux électrons (granules de glycogène et granules protéiques), a été démontrée. Les granules protéiques, d'aspect plus grossier que les granules de glycogène, ont été mis en évidence par un test cytochimique, en particulier, chez les anoplocephalidés, *Thysaniezia ovilla* (Bâ *et al.*, 1991) et *Aporina delafondi* (Bâ & Marchand, 1994b) et l'hyménolepididé, *Cladogynia serrata* (= *Retinometra serrata*) (Bâ & Marchand, 1993). Chez de nombreuses autres espèces d'Anoplocephalidae, en particulier, *Anoplocephaloides dentata*, *Gallegoides arfaai*, *Moniezia expansa*, *Moniezia benedeni*, *Mosgovoyia ctenoides* et *Paranoplocephala omphalodes* (Bâ & Marchand, 1992b ; Miquel & Marchand, 1998a,b ; Bâ *et al.*, 2000 ; Miquel *et al.*, 2004 ; Eira *et al.*, 2006), des particules granulaires de matériel opaque aux électrons, assimilables à des granules protéiques, dont la nature protéique n'a pas été prouvée, ont été décrites.

Des inclusions d'aspect similaire à celui des granules de glycogène ont été également observées dans le spermatozoïde des Cyclophyllidea-Dilepididae (Świdorski *et al.*, 2002 ; Yoneva *et al.*, 2006a ; présente étude). Cependant, le test cytochimique effectué sur *Molluscotaenia crassiscolex* (présente étude) a montré que ces granules n'étaient pas de nature glycogénique. En conséquence, nous pensons que les granules présents dans le spermatozoïde des Dilepididae ne sont pas de nature glycogénique, contrairement à ce qu'avait supposé Yoneva *et al.* (2006a).

Par ailleurs, la présence de granules de glycogène a été démontrée chez les mesocestoididés, *Mesocestoides litteratus* et *Mesocestoides lineatus* (Miquel *et al.*, 1999, 2007b). Chez ces deux espèces, les auteurs ont pu montrer, pour la première fois, la disposition de ces granules en un cordon spiralé.

D'autres espèces, telles que les dipylidiidés, *Joyeuxiella pasqualei* et *Joyeuxiella echinorhynchoides* (Ndiaye *et al.*, 2003a ; Miquel *et al.*, 2005a) et le nématotaeniidé, *Nematotaenia chantalae* (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1990), présentent également dans leur spermatozoïde des particules, assimilables à des granules de glycogène. Toutefois, la nature glycogénique de ces particules n'a pas été prouvée par un test de Thiéry (1967).

Par ailleurs, de nombreuses espèces d'hyménolepididés, comme *Echinocotyle dolosa*, *Hymenolepis diminuta*, *Rodentolepis straminea*, *Rodentolepis nana*, *Rodentolepis microstoma*, *Cladogynia guberiana*, *Diorchis parvogenitalis* et *Dicranotaenia coronula* (Kelsoe *et al.*, 1977 ; Bâ & Marchand, 1992a, 1996a, 1998 ; Chomicz & Świdorski, 1992a,b ; Świdorski & Chomicz, 1994 ; Bâ *et al.*, 2002) présentent dans leurs spermatozoïdes des inclusions opaques aux électrons, de taille intermédiaire entre les particules protéiques et les granules de glycogène.

Chez les eucestodes, les données considérées comme des synapomorphies sont, entre autres, l'absence de mitochondrie dans le spermatozoïde (Justine, 1991a) et la présence d'un ou de plusieurs corps en crête hélicoïdaux (Bâ & Marchand, 1995). Cependant, le corps en crête n'a pas été observé dans le spermatozoïde de tous les eucestodes.

Dans le cas particulier des Cyclophyllidea et Tetrabothriidea, les caractères synapomorphes sont la présence de microtubules corticaux spiralés et d'une gaine périaxonémale (Justine, 2001). Toutefois, la considération de ce dernier caractère comme une synapomorphie est entravée par le fait que les spermatozoïdes de certaines espèces présentent une gaine périaxonémale, alors que d'autres en sont complètement dépourvues. Les cestodes dont le spermatozoïde est dépourvu de gaine périaxonémale appartiennent à trois familles, les Anoplocephalidae, les Hymenolepididae et les Nematotaeniidae. Parmi les Anoplocephalidae, on peut citer toutes les espèces

d'Anoplocephalidae-Anoplocephalinae et *Thysaniezia ovilla* (Thysanosomatinae) (Bâ *et al.*, 1991, 2000 ; Bâ & Marchand, 1992b, 1994b ; Miquel & Marchand, 1998a,b ; Miquel *et al.*, 2004 ; Eira *et al.*, 2006). Parmi les Hymenolepididae, on peut citer cinq espèces : *Echinocotyle dolosa*, *Rodentolepis straminea*, *Rodentolepis nana*, *Rodentolepis microstoma* et *Retinometra serrata* (Bâ *et al.*, 2002 ; Bâ & Marchand, 1992a, 1993, 1996a, 1998). Parmi les Nematotaeniidae, on peut citer *Nematotaenia chantalae* (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1990). Les cestodes dont le spermatozoïde présente une gaine périaxonémale appartiennent à la famille des Anoplocephalidae (Linstowiinae, Inermicapsiferinae et la plupart des Thysanosomatinae (Bâ & Marchand, 1992c, 1994d,e,f,g)) ; des Catenotaeniidae (Miquel *et al.*, 1997a ; Hidalgo *et al.*, 2000) ; des Davaineidae (Bâ & Marchand, 1994c,d ; Bâ *et al.*, 2005a,b ; Miquel *et al.*, 2008b) ; Dilepididae (Świdorski *et al.*, 2000 ; Yoneva *et al.*, 2006a ; présente étude) ; des Dipylidiidae (Miquel & Marchand, 1997 ; Ndiaye *et al.*, 2003a) ; des Gryporhynchidae (Yoneva *et al.*, 2008) ; des Metadilepididae (Yoneva *et al.*, 2006b) ; des Paruterinidae (Yoneva *et al.*, 2009, 2010) ; des Taeniidae (Feartherston, 1971 ; Miquel *et al.*, 2000a, 2009b ; Ndiaye *et al.*, 2003b ; Bâ *et al.*, 2011) (Tableau XIX).

Un autre caractère décrit dans le spermatozoïde des cestodes Cyclophyllidea est la présence de parois intracytoplasmiques de matériel opaque aux électrons. Les espèces concernées présentent un spermatozoïde de type VII. Ainsi toutes les espèces présentant des parois intracytoplasmiques sont aussi dotées de gaine périaxonémale (Bâ & Marchand, 1994b,c,d,e,g ; Miquel *et al.*, 2000a, 2008b, 2009b, 2010 ; Ndiaye *et al.*, 2003b ; Bâ *et al.*, 2005a,b ; Yoneva *et al.*, 2006b, 2009, 2010...) (Tableau XIX).

Selon Justine (1998a), il existerait une relation entre la présence ou l'absence simultanée de parois intracytoplasmiques et de gaine périaxonémale, et l'absence ou la présence de granules dans le cytoplasme du spermatozoïde. S'il est vrai que certaines études obéissent à ce schéma (Feartherston, 1971 ; Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1990 ; Bâ *et al.*, 1991, 2000, 2002, 2011 ; Bâ & Marchand, 1992a,b, 1993, 1994b,d,e,g, 1996a, 1998 ; Miquel & Marchand, 1998a,b ; Miquel *et al.*, 1999, 2000a, 2004, 2007b, 2009b ; Li *et al.*, 2003 ; Ndiaye *et al.*, 2003b ; Willms *et al.*, 2004 ; Eira *et al.*, 2006 ; Yoneva *et al.*, 2006b, 2009, 2010), la combinaison de ces trois éléments n'est aucunement liée, car tous les types d'arrangements sont rencontrés (Tableau XIX).

Des zones d'attachement ou zones de fusion des flagelles ont été décrites dans l'expansion cytoplasmique médiane des spermatozoïdes, au cours de la spermiogenèse des cestodes. Il s'agit, en coupe transversale, de l'espace délimité par un matériel punctiforme, submembranaire et opaque aux électrons. Elles ont été décrites, en particulier, chez les diphyllbothriidés (Levron *et al.*, 2006a, 2009, 2011); les bothriocéphalidés (Bruňanská *et al.*, 2002, 2010 ; Levron *et al.*, 2006c,b ; Šípková *et al.*, 2011 ; présente étude) ; les trypanorhynques (Miquel & Świdorski, 2006a ; Miquel *et al.*, 2007a ; présente étude) et les spathébothriidés (Bruňanská *et al.*, 2006 ; Bruňanská & Poddubnaya 2010).

Chez les cestodes, l'extrémité postérieure du spermatozoïde est organisée différemment suivant les espèces et les ordres. En effet, elle présente un axonème et/ou un noyau chez les Tetraphyllidea (Mokhtar-Maamouri & Świdorski, 1975 ; Mokhtar-Maamouri, 1979, 1982 ; MacKinnon & Burt, 1984 ; Mahendrasingam *et al.*, 1989 ; Quilichini *et al.*, 2007 ; présente étude) ; les Rhinebothriidea (Mokhtar-Maamouri & Świdorski, 1976), les Trypanorhyncha (Miquel & Świdorski, 2006a ; Miquel *et al.*, 2007a ; présente étude), les Tetrabothriidea (Stoitsova *et al.*, 1995), les Diphyllidea (Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui, 1984 ; Azzouz-Draoui, 1985 ; Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri, 1986/88 ; présente étude), les Spathebothriidea (Bruňanská *et al.*, 2006 ; Bruňanská & Poddubnaya, 2010), les Proteocephalidea (Bâ & Marchand, 1994a ; Sène *et al.*, 1997 ; Bruňanská *et al.*, 2003a,c, 2004a,b), les Bothriocephalidea (Świdorski & Mokhtar-Maamouri, 1980 ; Bruňanská *et al.*, 2002, 2010 ; Levron *et al.*, 2005, 2006c,b ; Šípková *et al.*, 2010, 2011 ; présente étude), les Diphyllbothriidea (Levron *et al.*, 2006a, 2009, 2011), les Caryophyllidea (Arafa & Hamada, 2004 ; Gamil, 2008 ; Bruňanská, 2009 ; Bruňanská & Kostič, 2011; Yoneva *et al.*, 2011) et les Cyclophyllidea (Bâ *et al.*, 1991 ; Bâ & Marchand, 1994e,g ; Miquel & Marchand, 1997 ; Miquel *et al.*, 1999 ; Yoneva *et al.*, 2000, 2006a,b, 2008, 2009, 2010 ; Ndiaye *et al.*, 2003a). Elle ne contient plus que quelques microtubules corticaux chez *Barsonella lafoni* (présente étude), *Stilesia globipunctata*, *Rodentolepis straminea*, et *Rodentolepis nana* (Bâ & Marchand, 1992a,c, 1996a). Elle est caractérisée par la présence de granules de glycogène ou de matériel opaque aux électrons chez quelques Cyclophyllidea (Bâ & Marchand, 1992b, 1994b,f, 1998, Miquel & Marchand, 1998a,b ; Bâ *et al.*, 2000, 2002, 2005a,b ; Miquel *et al.*, 2004, 2009b, 2010 ; Eira *et al.*, 2006...).

CARYOPHYLLIDEA Familles, Genres, Espèces	Spermiogenèse										Spermatozoïde					Références	
	Type	MD	CI	RS	RF	FP	NC	NF	PA	Type	CA	CC	ArcMC	NAx	G		EP
Capingentidae																	
<i>Breviscolex orientalis</i>	II	+	3	1+1	+	C	2	1	+	III	-	-	+	1	-	Ax	Yoneva <i>et al.</i> (2011)
Caryophyllacidae																	
<i>Caryophyllaeus laticeps</i>	II	+	3	1+1	+	+	2	1	+	III	-	-	+	1	+	Ax	Bruňanská & Kostič (2011)
<i>Glaridacris catostomi</i>	II	?	+	1+1	+	Inc	2	1	?	III	-	-	-	1	+	Ax	Świderski & Mackiewicz (2002), Miquel <i>et al.</i> (2008a)
<i>Wenyonia virilis</i>	II	+	3	1+1	>90°	C	2	1	+	III	-	-	+	1	+	Ax	Gamil (2008), Miquel <i>et al.</i> (2008a)
Lytocestidae																	
<i>Khawia armeniaca</i>	II	+	1	1+2	+	C	2	1	?								Bruňanská & Poddubnaya (2006)
<i>Khawia sinensis</i>	II	+	3	+	+	C	2	1	?	III	-	-	+	1	+	Ax	Bruňanská (2009)
<i>Monobothrioides chalmersius</i>	II	?	-	1	?	Inc	1	1	?	III	-	-	+	1	?	Ax	Arafa & Hamada (2004)

Tableau VII : Caractères spermatologiques chez les Caryophyllidea.

ArcMC : arc de microtubules corticaux ; Ax : axonème ; C : complète ; CA : cône apical ; CC : corps en crête ; CI : corps intercentriolaire ; EP : extrémité postérieure ; FP : fusion proximo-distale ; G : granules ; Inc : incomplète ; MD : matériel dense ; NAx : nombre d'axonèmes ; NC : nombre de centrioles ; NF : nombre de flagelles ; PA : point d'attachement ; RF : rotation flagellaire ; RS : racine striée ; +/- : présence/absence du caractère considéré. Les types de spermiogenèse sont d'après Bâ & Marchand (1995). Les types de spermatozoïde sont d'après Levron *et al.* (2010).

SPATHEBOTRHIIDEA	Spermiogénèse										Spermatozoïde					Références				
	Type	CB	MD	CI	MD	CI	RS	RF	FP	NF	PA	Type	CA	CC	ArcMC		NAx	G	ZA	EP
<i>Bothrimonus sturionis</i>																2?				MacKinnon & Burt (1984)
<i>Cyathocephalus truncatus</i>	I	+	+	+	+	+	>90°	+	2	+	I	-	-	+	2	+	+	N		Bruňanská <i>et al.</i> (2006)
<i>Didymobothrium rudolphii</i>	I	+	+	3	+	+	+	+	2	+	I	-	-	+	2	+	+	Ax		Bruňanská & Poddubnaya (2010)

Tableau VIII : Caractères spermatologiques chez les Spathebothriiidea.

ArcMC : arc de microtubules corticaux ; Ax : axonème ; CA : cône apical ; CC : corps en crête ; CI : corps intercentriolaire ; EP : extrémité postérieure ; FP : fusion proximo-distale ; G : granules ; MD : matériel dense ; N : noyau ; NAx : nombre d'axonèmes ; NF : nombre de flagelles ; PA : point d'attachement ; RF : rotation flagellaire ; RS : racine striée ; ZA : zone d'attachement ; +/- : présence/absence du caractère considéré.

Les types de spermiogénèse sont d'après Bâ & Marchand (1995). Les types de spermatozoïde sont d'après Levron *et al.* (2010).

DIPHYLLOBOTHRIIDEA	Spermiogénèse										Spermatozoïde					Références				
	Type	CI	MD	RS	RF	FP	NF	Type	CA	CC	ArcMC	NAx	G	ZA	EP					
Diphyllobothriidae																				
<i>Diphyllobothrium latum</i>	I	3	+	+	+	+	2	I	-	-	-	2	+	+	2	+	+	N		Levron <i>et al.</i> (2006a)
<i>Ligula intestinalis</i>	I	5	+	+	+	+	2	I	-	-	-	2	ZDE	+	2	ZDE	+	Ax		Levron <i>et al.</i> (2009)
<i>Schistocephalus solidus</i>	I	3	+	+	+	+	2	I	-	-	-	2	ZDE	+	2	ZDE	+	N		Levron <i>et al.</i> (2011)
Scyphocephalidae																				
<i>Duthiersia fimbriata</i>								II	-	+	Partiel	2	+	?	?	?	?	?		Justine (1986)

Tableau IX : Caractères spermatologiques chez les Diphyllbothriiidea.

ArcMC : arc de microtubules corticaux ; Ax : axonème ; CA : cône apical ; CC : corps en crête ; CI : corps intercentriolaire ; EP : extrémité postérieure ; FP : fusion proximo-distale ; G : granules ; MD : matériel dense ; N : noyau ; NAx : nombre d'axonèmes ; NF : nombre de flagelles ; RF : rotation flagellaire ; RS : racine striée ; ZA : zone d'attachement ; ZDE : zone dense aux électrons ; +/- : présence/absence du caractère considéré.

Les types de spermiogénèse sont d'après Bâ & Marchand (1995). Les types de spermatozoïde sont d'après Levron *et al.* (2010).

BOTHRIOCEPHALIDEA		Spermiogénèse							Spermatozoïde							Références
Familles, Genres, Espèces	Type	CI	MD	RS	RF	FP	NF	Type	CA	CC	AnMC	NAX	G	ZA	EP	
Bothriocephalidae																
<i>Bothriocephalus clavibothium</i>	I	?	-	+	+	+	2	II	-	-	+	2	+	-	Ax	Świderski & Mokhtar-Maamouri (1980)
<i>Bothriocephalus claviceps</i>								II	+	+	Partiel	2	+		?	Bâ <i>et al.</i> (2007)
<i>Bothriocephalus scorpii</i>	I	3	+	+	+	+	2	II	-	+	+	2	+	+	N	Levtron <i>et al.</i> (2006b)
<i>Clestopothrium crassiceps</i>	I	3	+	+	+	+	2	II	+	+	+	2	+	+	N	Marigo & Miquel (2011), Marigo <i>et al.</i> (2011a)
<i>Oncodiscus sauridae</i>	I	3	+	+	+	+	2	II	-	+	+	2	+	+	N+MC	Šípková (2011), Šípková <i>et al.</i> (2011)
<i>Senga sp.</i>	I	3	+	+	+	+	2	II	-	+	+	2	+	+	MC	Šípková (2011), Šípková <i>et al.</i> (2011)
Echinophallidae																
<i>Parabothriocephalus gracilis</i>	I	3	+	+	+	+	2	II	-	+	+	2	+	-	N+MC	Šípková <i>et al.</i> (2010)
<i>Paraechinophallus japonicus</i>								II	-	+	+	2	+	+	N+MC	Levtron <i>et al.</i> (2006c)
Trienophoridae																
<i>Eubothrium crassum</i>	I	1	+	+	+	+	2	II	-	+	+	2	+	+	Ax	Bruňanská <i>et al.</i> (2001, 2002, 2010)
<i>Eubothrium rugosum</i>								II	-	+	+	2	+	+	Ax	Bruňanská <i>et al.</i> (2010)
<i>Trienophorus nodulosus</i>	I	3	+	+	+	+	2	II	-	+	+	2	+	?	Ax	Levtron <i>et al.</i> (2005)

Tableau X : Caractères spermatologiques chez les Bothriocephalidea.

AnMC : anneau de microtubules corticaux ; Ax : axonème ; CA : cône apical ; CC : corps en crête ; CI : corps intercentriolaire ; EP : extrémité postérieure ; FP : fusion proximo-distale ; G : granules ; MC : microtubules corticaux ; MD : matériel dense ; N : noyau ; NAX : nombre d'axonèmes ; NF : nombre de flagelles ; RF : rotation flagellaire ; RS : racine striée ; ZA : zone d'attachement ; +/- : présence/absence du caractère considéré. Les types de spermiogénèse sont d'après Bâ & Marchand (1995). Les types de spermatozoïde sont d'après Levtron *et al.* (2010).

HAPLOBOTHRIIDEA		Spermiogénèse					Spermatozoïde					Références		
Famille, Genre, Espèce	Type	CI	RS	RF	FP	NF	Type	CA	CC	ArcMC	NAx	G	EP	
Haplobothriidae														
<i>Haplobothrium globuliforme</i>						2			-					MacKinnon <i>et al.</i> (1983), MacKinnon & Burt (1985)

Tableau XI : Caractères spermatologiques chez les Haplobothriidea.

ArcMC : arc de microtubules corticaux ; CA : cône apical ; CC : corps en crête ; CI : corps intercentriolaire ; EP : extrémité postérieure ; FP : fusion proximodistale ; G : granules ; NAx : nombre d'axonèmes ; NF : nombre de flagelles ; RF : rotation flagellaire ; RS : racine striée ; +/- : présence/absence du caractère. Les types de spermiogénèse sont d'après Bâ & Marchand (1995). Les types de spermatozoïde sont d'après Levron *et al.* (2010).

DIPHYLLIDEA		Spermiogénèse					Spermatozoïde					Références				
Famille, Genre, Espèces	Type	CI	MD	RF	FP	MC	NF	Type	CA	CC	MC	NAx	N	G	EP	
Echinobothriidae																
<i>Echinobothrium affine</i>	I	±10	+	+	+	+	2	I		-	+	2	P	α, β	Ax	Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui (1984), Azzouz-Draoui (1985), Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri (1986/88)
<i>Echinobothrium brachysoma</i>	I	3	+	+	+	+	2	II		+	-	2	S	β	Ax	Azzouz-Draoui (1985)
<i>Echinobothrium euterpes</i>	I	3	+	+	+	+	2	IV	+	+	+	1	S	β	Ax	Marigo <i>et al.</i> (2011b)
<i>Echinobothrium harfordi</i>	II	5	+	+	+	+	1+1B	IV		+	-	1	S	β	Ax	Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui (1984), Azzouz-Draoui (1985), Azzouz-Draoui & Mokhtar-Maamouri (1986/88)
<i>Echinobothrium typus</i>	I	3	+	+	+	+	2	II		+	-	2	S	β	Ax	Azzouz-Draoui (1985)

Tableau XII : Caractères spermatologiques chez les Diphyllidea.

CA : cône apical ; CC : corps en crête ; CI : corps intercentriolaire ; EP : extrémité postérieure ; FP : fusion proximodistale ; G : granules ; MC : microtubules corticaux ; MD : matériel dense ; N : noyau ; NAx : nombre d'axonèmes ; NF : nombre de flagelles ; RF : rotation flagellaire ; RS : racine striée ; +/- : présence/absence du caractère considéré.

Les types de spermiogénèse sont d'après Bâ & Marchand (1995). Les types de spermatozoïde sont d'après Levron *et al.* (2010).

TRYPANORHYNCHA Super-familles, Familles, Genres, Espèces	Spermiogénèse					Spermatozoïde							Références			
	Type	CI	RS	RF	FP	NF	Type	EA	CA	CC	ArcMC	NAx		ZA	G	EP
EUTETRARHYNCHOIDEA																
Eutetrarhynchidae																
<i>Dollfusella spinulifera</i>							I	MC	-	-	10	2	+	α, β	Ax	Miquel & Świderski (2006a,b)
<i>Parachristianella trygonis</i>							I	MC	-	-	10	2	+	α, β	Ax	Miquel <i>et al.</i> (2007a)
GYMNORHYNCHOIDEA																
Aporhynchidae																
<i>Aporhynchus menezesi</i>	I	5	+	+	+	2	I	MC	-	-	7	2	+	α	Ax	Marigo <i>et al.</i> (2010a, 2011c)
LACISTORHYNCHOIDEA																
Lacistorhynchidae																
<i>Grillotia erinaceus</i>	I	7	+	+	+	2			-			2		α, β		McKerr (1985)
<i>Lacistorhynchus tenuis</i>	I	5	+	+	+	2			-			2		β		Świderski (1976a, 1994)

Tableau XIII : Caractères spermatologiques chez les Trypanorhyncha.

ArcMC : arc de microtubules corticaux ; CA : cône apical ; CC : corps en crête ; CI : corps intercentriolaire ; EA : extrémité antérieure ; EP : extrémité postérieure ; FP : fusion proximo-distale ; G : granules ; MC : microtubules corticaux ; NAx : nombre d'axonèmes ; NF : nombre de flagelles ; RF : rotation flagellaire ; RS : racine striée ; ZA : zone d'attachement ; +/- : présence/absence du caractère considéré.

Les types de spermiogénèse sont d'après Bâ & Marchand (1995). Les types de spermatozoïde sont d'après Levron *et al.* (2010).

TETRAPHYLLIDEA		Spermiogénèse						Spermatozoïde						Références		
Familles, Genres, Espèces		Type	CI	RS	RF	FP	NF	Type	CA	CC	ArcMC	NAX	G	EP		
Onchobothriidae																
<i>Acanthobothrium crassicolle</i>		I	1	+	+	+	2	II	+	+	+	2	+	Ax	Marigo <i>et al.</i> (2009, 2011d), Marigo (2010)	
<i>Acanthobothrium filicolle</i> var. <i>benedeni</i>		I	5	+	+	+	2	II		+	+	2	+	Ax	Mokhtar-Maamouri & Swiderski (1975)	
<i>Acanthobothrium filicolle</i> var. <i>filicolle</i>		I	1	+	+	+	2	II		+	+	2	+	Ax	Mokhtar-Maamouri (1982)	
<i>Calliobothrium verticillatum</i>								II	+	+	+	2	+	Ax	Quilichini <i>et al.</i> (2007)	
<i>Onchobothrium uncinatum</i>		I	?	+	+	+	2	II		+	+	2	+	Ax	Mokhtar-Maamouri & Swiderski (1975)	
Phyllobothriidae																
<i>Phyllobothrium gracile</i>		II	4-5	+	+	+	1+1B	IV		+	+	1	+	N	Mokhtar-Maamouri (1979)	
<i>Phyllobothrium lactuca</i>		I	3	+	+	+	2								Sène <i>et al.</i> (1999)	
<i>Pseudanthobothrium hanseni</i>								IV		+	+	1		Ax	MacKinnon & Burt (1984)	
<i>Trilocularia acanthiaevulgaris</i>								II		+	+	2	+	N	Mahendrasingam <i>et al.</i> (1989)	

Tableau XIV : Caractères spermatologiques chez les cestodes Tetrephyllidea.

ArcMC : arc de microtubules corticaux ; Ax : axonème ; CA : cône apical ; CC : corps en crête ; CI : corps intercentriolaire ; EP : extrémité postérieure ; G : granules ; N : noyau ; NAX : nombre d'axonèmes ; NF : nombre de flagelles ; RF : rotation flagellaire ; RS : racine striée ; +/- : présence/absence du caractère considéré.

Les types de spermiogénèse sont d'après Bâ & Marchand (1995). Les types de spermatozoïde sont d'après Levron *et al.* (2010).

RHINEBOTHRIIDEA		Spermiogénèse					Spermatozoïde					Références		
Sous-famille, Genre, Espèce	Type	CI	RS	RF	FP	NF	Type	CA	CC	ArcMC	NAX		G	EP
Rhinebothriinae														
<i>Echeneibothrium beauchampi</i>							IV	-	+	+	I	+	N	Mokhtar-Maamouri & Świderski (1976)

Tableau XV : Caractères spermatologiques chez les Rhinebothriidea.

ArcMC : arc de microtubules corticaux ; CA : cône apical ; CC : corps en crête ; CI : corps intercentriolaire ; EP : extrémité postérieure ; FP : fusion proximodistale ; G : granules ; NAX : nombre d'axonèmes ; NF : nombre de flagelles ; RF : rotation flagellaire ; RS : racine striée ; +/- : présence/absence du caractère considéré.

Les types de spermiogénèse sont d'après Bâ & Marchand (1995). Les types de spermatozoïde sont d'après Levron *et al.* (2010).

LECANICEPHALIDEA		Spermiogénèse					Spermatozoïde					Références		
Famille, Genre, Espèce	Type	CI	RS	RF	FP	NF	Type	CA	CC	ArcMC	NAX		G	EP
Tetragonocephalidae														
<i>Tetragonocephalum</i> sp.	I	+	+	+	2	+	IV?			-	I			Justine (2001)

Tableau XVI : Caractères spermatologiques chez les Lecanicephalidea.

ArcMC : arc de microtubules corticaux ; CA : cône apical ; CC : corps en crête ; CI : corps intercentriolaire ; EP : extrémité postérieure ; FP : fusion proximodistale ; G : granules ; NAX : nombre d'axonèmes ; NF : nombre de flagelles ; RF : rotation flagellaire ; RS : racine striée ; +/- : présence/absence du caractère considéré.

Les types de spermiogénèse sont d'après Bâ & Marchand (1995). Les types de spermatozoïde sont d'après Levron *et al.* (2010).

PROTEOCEPHALIDEA Familles, Sous-familles, Genres, Espèces	Spermiogénèse							Spermatozoïde						Références	
	Type	CI	RS	RF	FP	NF	Type	CA	CC		ArcMC	NAx	G		EP
									N	T					
Monticelliidae															
Zygobothriinae															
<i>Nomimoscolex</i> sp.	I	1	+	+	+	2	II	+	3	80	+	2	+	Ax	Sène <i>et al.</i> (1997)
Proteocephalidae															
Corallobothriinae															
<i>Corallobothrium solidum</i>	I	1	+	+	+	2	II	-	1	30-200	+	2	+	Ax	Bruňanská <i>et al.</i> (2004a, 2005)
Gangesiinae															
<i>Electrotaenia malopteruri</i>							II	-	1	60-150	+	2	+	Ax	Bruňanská <i>et al.</i> (2004b)
Proteocephalinae															
<i>Barsonella lafoni</i>	I	1	+	+	+	2	II	+	1	60-90	+	2	+	Ax	Marigo <i>et al.</i> (2011e)
<i>Proteocephalus longicollis</i>	I	5 ou 1?	+	+	+	2	II	-	1	60-100	+	2	+	Ax	Swiderski (1985, 1996), Bruňanská <i>et al.</i> (2003a, 2004c)
<i>Proteocephalus torulosus</i>	I	1	+	+	+	2	II	-	1	80-100	+	2	+	Ax	Bruňanská <i>et al.</i> (2003b,c)
Sandonellinae															
<i>Sandonella sandoni</i>							IV	+	1	50-100	+	1	+	Ax	Bâ & Marchand (1994a)

Tableau XVII : Caractères spermatologiques chez les Proteocephalidea.

ArcMC : arc de microtubules corticaux ; CA : cône apical ; CI : corps en crête ; N : nombre ; T : taille (en nm) ; CC : corps intercentriolaire ; EP : extrémité postérieure ; FP : fusion proximo-distale ; G : granules ; NAx : nombre d'axonèmes ; NF : nombre de flagelles ; RF : rotation flagellaire ; RS : racine striée ; +/- : présence/absence du caractère considéré.

Les types de spermiogénèse sont d'après Bâ & Marchand (1995). Les types de spermatozoïde sont d'après Levron *et al.* (2010).

TETRABOTHRIIDEA		Spermiogénèse						Spermatozoïde						Références		
Famille, Genres, Espèces	Type	CI	RS	RF	FP	NF	Type	CA	CC	MC	NAx	GP	PI		G	EP
Tetrabothriidae																
<i>Tetrabothrius erositis</i>	II	-	+	+	+	2	VII	-	+	S	I	+	+	+	Ax	Stoitsova <i>et al.</i> (1995)

Tableau XVIII : Caractères spermatozoïques chez les Tetrabothriidea.

CA : cône apical ; CC : corps intercentriolaire ; EP : extrémité postérieure ; FP : fusion proximo-distale ; G : granules ; GP : gaine périaxonémale ; MC : microtubules corticaux ; N : noyau ; NAx : nombre d'axonèmes ; NF : nombre de flagelles ; PI : parois intracytoplasmiques ; RF : rotation flagellaire ; RS : racine striée ; S : spiralés ; +/- : présence/absence du caractère considéré.

Les types de spermiogénèse sont d'après Bâ & Marchand (1995). Les types de spermatozoïde sont d'après Levron *et al.* (2010).

CYCLOPHYLLIDEA Familles, Sous-familles Genres, Espèces	Spermiogénèse						Spermatozoïde						Références			
	Type	CI	RS	RF	FP	N Ax	Type	CA (nm)	CC		MC	GP		PI	G	EP
									N	T (nm)						
Anoplocephalidae																
Anoplocephalinae																
<i>Anoplocephaloides dentata</i>	IV	-	RSV	-	-	1	V	+	2	140	30°	-	-	+	MD	Miquel & Marchand (1998a), Miquel <i>et al.</i> (1998b, 2001)
<i>Aporina delafondi</i>	IV	-	-	-	-	1	V	+	5	15-40	15°	-	-	+	MD	Bâ & Marchand (1994b)
<i>Gallegoïdes arfaai</i>	IV	-	RSV- AC	-	-	1	V	+	2	140	35°	-	-	+	MD	Miquel <i>et al.</i> (2004, 2005b), Eira <i>et al.</i> (2005)
<i>Montezia benedenii</i>	IV	-	-	-	-	1	V	+	2	30-40	40°	-	-	+	G	Bâ & Marchand (1992b)
<i>Montezia expansa</i>	IV	-	RSS	-	-	1	V	+	2	30-60	25-45°	-	-	+	G	Świderski (1968), Bâ & Marchand (1992b), Li <i>et al.</i> (2003)
<i>Mosgovoyia ctenoides</i>	IV	-	RSV- AC	-	-	1	V	+	2	70-90	30°	-	-	+	G	Eira (2004, 2006), Eira <i>et al.</i> (2006)
<i>Paranoplocephala omphalodes</i>							V	+	2		25-35°	-	-	+	MD	Miquel & Marchand (1998b), Miquel <i>et al.</i> (2001)
<i>Sudarikovina taterae</i>	IV	-	IDM	-	-	1		+	7	50-100	s	-	-	+	G	Bâ <i>et al.</i> (2000)
Inermicapsiferinae																
<i>Inermicapsifer guineensis</i>							VII	+	2		45°	+	+	-	Ax	Bâ & Marchand (1994d,e)
<i>Inermicapsifer madagascariensis</i>							VII	+	2		45°	+	+	-	Ax	Świderski (1984a,b), Bâ & Marchand (1994d,e)
Linstowiinae																
<i>Mathevoaenia herpestis</i>	III	-	IDM	-	+	1	VI	+	1	?	40°	+	-	-	MD	Bâ & Marchand (1994f, 1996b)
Thysanosomatinae																
<i>Avitellina centripunctata</i>							VII	+	1	150-200	35°	+	+	-	Ax	Bâ & Marchand (1994d,g)
<i>Stilesia globipunctata</i>							VI	+	1		50°	+	-	-	CM	Bâ & Marchand (1992c)
<i>Thysaniezia ovilla</i>	IV	-	AC	-	-	1	V	+	2	80	40-50°	-	-	+	Ax	Bâ <i>et al.</i> (1991)

Catenotaeniidae																			
Catenotaeniinae																			
<i>Catenotaenia pusilla</i>	III	-	-	+	+	+	+	+	+	Torres <i>et al.</i> (1999), Hidalgo <i>et al.</i> (2000)									
Skrjabinotaeniinae																			
<i>Skrjabinotaenia lobata</i>										Miquel <i>et al.</i> (1997a), Torres <i>et al.</i> (1999)									
Davaineidae																			
<i>Cotugnia polyacantha</i>										Bâ & Marchand (1994d)									
<i>Paronietta reynoldsae</i>										Bâ <i>et al.</i> (2005a)									
<i>Raillietina baeri</i>										Bâ <i>et al.</i> (2005b)									
<i>Raillietina micracantha</i>	III	-	-	+	+	+	+	+	+	Miquel <i>et al.</i> (2008b, 2010)									
<i>Raillietina tunetensis</i>	III	-	-	+	+	+	+	+	+	Bâ & Marchand (1994c,d)									
Dilepididae																			
<i>Angularella beema</i>	IV	-	-	-	-	-	-	+	+	Yoneva <i>et al.</i> (2006a)									
<i>Dilepis undula</i>								+	+	Swiderski <i>et al.</i> (2000)									
<i>Kowalewskiella glareola</i>								?	?	Swiderski <i>et al.</i> (2002)									
<i>Molluscotaenia crassiscolex</i>	IV	-	-	-	-	-	-	+	+	Swiderski & Tkach (1996a), Marigo (2010), Valent (2010), Marigo <i>et al.</i> (2010b, 2011f)									
Dipylidiidae																			
<i>Dipylidium caninum</i>	III	-	RSV	-	+	600	1	VI	1	150	40°	+	-	-	+	+	+	+	Miquel & Marchand (1997), Miquel <i>et al.</i> (1998a,b, 2005a)
<i>Joyeuxiella echinorhynchoides</i>	III	-	+	-	+	<2000	1	VI	1	150	40°	+	-	-	+	+	+	+	Agostini <i>et al.</i> (2003), Ndiaye (2003), Ndiaye <i>et al.</i> (2003a), Miquel <i>et al.</i> (2005a)
<i>Joyeuxiella pasqualei</i>	III	-	+	-	+	<2000	1	VI	1	75	40°	+	-	-	+	+	+	+	Ndiaye (2003), Ndiaye <i>et al.</i> (2003a), Miquel <i>et al.</i> (2005a)
Gryporhynchidae																			
<i>Valipora mutabilis</i>	IV	-	-	-	-	-	-	VI	1	55	45°	+	-	-	+	+	+	+	Yoneva <i>et al.</i> (2008)

Hymenolepididae														
<i>Dicranotaenia coronula</i>	III	-	-	-	-	-	1	?	?	?	?	?	MD	Chomicz & Świdorski (1992a)
<i>Diorchis parvogenitalis</i>								?	?	?	?	?	?	Chomicz & Świdorski (1992b)
<i>Echinocoyle dolosa</i>								V	+	1-8	100	s	+	Bâ <i>et al.</i> (2002)
<i>Hymenolepis diminuta</i>	?	?	?	?	?	?	1	?	?	?	s	?	+	Rosario (1964), Lumsden (1965), Sun (1972), Świdorski (1976b), Kelsoe <i>et al.</i> (1977), Robinson & Bogtish (1978), Coil (1991)
<i>Hymenolepis sulcata</i>								?	?	6-9	60-70	?	?	Ndiaye (2002a), Miquel <i>et al.</i> (2007c)
<i>Monorcholepis dujardini</i>								?	?	+		?	?	Świdorski & Tkach (1996b)
<i>Retinometra guberiana</i>								?	?	?		?	+	Świdorski & Chomicz (1994)
<i>Retinometra serrata</i>								V	+	6		25°	+	Bâ & Marchand (1993)
<i>Rodentolepis fraterna</i>								?	?	7-10	40-50	?	?	Ndiaye (2002a), Miquel <i>et al.</i> (2007c)
<i>Rodentolepis microstoma</i>	III	-	IDM	-	-	-	1		?	1-6	100-200	20-30°	+	Bâ & Marchand (1998)
<i>Rodentolepis myoxi</i>								?	?	5-9	40-50	?	?	Ndiaye (2002a), Miquel <i>et al.</i> (2007c)
<i>Rodentolepis nana</i>	IV	-	-	-	-	-	1			12	30-40	15°	+	Rosario (1964), Mehlhorn (1988), Abouzakham <i>et al.</i> (1990), Bâ & Marchand (1992a)
<i>Rodentolepis straminea</i>								V	+	8	50-100	30°	+	Bâ & Marchand (1996a), Ndiaye (2002a), Miquel <i>et al.</i> (2007c)
<i>Rodentolepis sp.</i>								?	?	11	20-30	?	?	Ndiaye <i>et al.</i> (2002a), Miquel <i>et al.</i> (2007b)
Mesocostoididae														
<i>Mesocostoides lineatus</i>	II	3	+	+	+	+	1	IV	+	1	150	p	+	Miquel <i>et al.</i> (2007b)
<i>Mesocostoides litteratus</i>	II	1	+	+	+	+	1	IV		1	125	p	+	Feliu <i>et al.</i> (1999), Hidalgo (1999), Hidalgo <i>et al.</i> (1999), Miquel <i>et al.</i> (1999)
Metadilepididae														
<i>Skrijabinoporus merops</i>	III	-	RSV	<90°	+	+	1	VII	+	1		30-40°	+	Yoneva <i>et al.</i> (2006b)

Nematotaeniidae																	
<i>Nematotaenia chantalae</i>	III	-	-	-	-	+	1		+	1		s	-	-	+	?	Mokhtar-Maamouri & Azzouz-Draoui (1990)
Paruteriinae																	
<i>Anonchotaenia globata</i>	III	-	RSV	<90°	+	+	1	VII	+	1	75	35°	+	+	-	Ax	Yoneva <i>et al.</i> (2010)
<i>Trienorhina rectangula</i>	III	-	RSV	<90°	+	+	1	VII		1	50	40°	+	+	-	Ax	Yoneva <i>et al.</i> (2009)
Taeniidae																	
Taeniinae																	
<i>Taenia crassiceps</i>	III	-	-	-	+	+	1	?	?	1		45°	+	+	-	?	Willms <i>et al.</i> (2004), Wilms & Robert (2007)
<i>Taenia hydatigena</i>	III	-	-	-	+	+	1	VI?	?	?		40-50°	+	+	-	?	Featherston (1971)
<i>Taenia mustelae</i>								?	+	1	75	45°	+	+	-	MD	Hidalgo (1999), Miquel <i>et al.</i> (2000a,b)
<i>Taenia parva</i>	III	-	-	<90°	+	+	1	VII	+	1	60	45°	+	+	-	MD	Ndiaye (2002b), Ndiaye <i>et al.</i> (2003b)
<i>Taenia saginata</i>								VII	+	1	50	40°	+	+	-	N-Ax	Tian <i>et al.</i> (1998a,b), Bâ <i>et al.</i> (2011)
<i>Taenia solium</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?		s	+	?	?	?	Tian <i>et al.</i> (1998a,b), Willms <i>et al.</i> (2003)
<i>Taenia taeniaeformis</i>	III	-	RSV	<90°	+	+	1	VII	+	1	140	40°	+	+	-	MD	Miquel <i>et al.</i> (2009a,b)
Echinococcinae																	
<i>Echinococcus granulosus</i>												35°	-	-	?	?	Morseth (1969)
<i>Echinococcus multilocularis</i>												s	+	?	?	?	Barret & Smyth (1983), Shi <i>et al.</i> (1994)

Tableau XIX : Caractères spermatologiques chez les Cyclophyllidae.

AC : adjonction centriolaire ; CA : cône apical ; CC : corps en crête ; N : nombre ; T : taille (en nm) ; CI : corps intercentriolaire ; EP : extrémité postérieure ; FP : fusion proximo-distale ; G : granules ; GP : gaine périaxonémale ; IDM : intercentriolaire dense masse ; MC : microtubules corticaux ; MD : matériel dense ; NAX : nombre d'axonèmes ; p : parallèle ; PI : parois intracytoplasmiques ; RF : rotation flagellaire ; RS : racine striée ; RSV : racine striée vestigiale ; RSS : racine striée spirale ; s : spirale ; +/- : présence/absence du caractère considéré.

Les types de spermiogénèse sont d'après Bâ & Marchand (1995). Les types de spermatozoïde sont d'après Levron *et al.* (2010).



CHAPITRE V :
CONCLUSIONS

CHAPITRE V : CONCLUSIONS

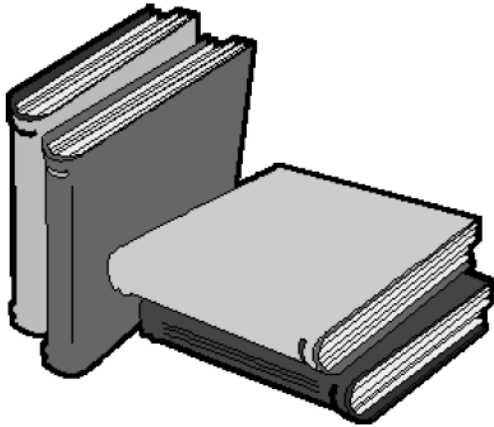
L'analyse des résultats que nous avons pu obtenir au cours de ce présent travail nous a permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

1. *Acanthobothrium crassicolle* a une spermiogenèse de type I et un spermatozoïde de type II. La présente contribution nous a permis de confirmer la présence de l'arc de microtubules corticaux épais chez les Tetraphyllidea-Onchobothriidae.
2. La paraphyllie des Tetraphyllidea n'est plus mise en doute. L'étude du Tetraphyllidea-Onchobothriidae, *Acanthobothrium crassicolle* a permis de valider le type I de spermiogenèse et le type II de spermatozoïde préalablement attribués à ce groupe.
3. *Aporhynchus menezesi* a une spermiogenèse de type I et un spermatozoïde de type I. La présence d'un arc de microtubules corticaux épais dans la partie antérieure du spermatozoïde est constante chez les espèces de l'ordre des Trypanorhyncha.
4. Les légères différences ultrastructurales observées entre *Aporhynchus menezesi* (Gymnorhynchoidea) et les espèces des autres super-familles ne sont pas suffisamment importantes pour établir la polyphylie des Trypanorhyncha.
5. *Barsonella lafoni* présente une spermiogenèse de type I et un spermatozoïde de type II, constants dans l'ordre des Proteocephalidea. La présence d'un corps intercentriolaire, de petite taille, et d'un arc de microtubules corticaux épais semblent aussi être des caractères typiques de cet ordre. Cependant, les caractères ultrastructuraux du spermatozoïde de *Sandonella sandoni* provoquent une certaine ambiguïté par rapport aux modèles spermatogénétiques attribués à cet ordre. L'étude de la spermiogenèse de *S. sandoni* ou de celle d'une autre espèce appartenant à la sous-famille des Sandonellinae serait très importante.
6. Chez *Barsonella lafoni*, un matériel dense a pu être observé durant les phases initiales de la spermiogenèse. Ce matériel dense, détecté pour la première fois

- chez un Proteocephalidea, était un caractère attribué aux groupes basaux de cestodes.
7. *Clestobothrium crassiceps* se caractérise pour une spermiogenèse de type I et un spermatozoïde de type II. Ces modèles sont observés chez toutes les espèces de l'ordre des Bothriocephalidea. La présence d'un matériel dense aux électrons durant les stades initiaux de la spermiogenèse, le corps intercentriolaire réduit et la présence d'un anneau de microtubules corticaux épais dans le spermatozoïde semblent également être des caractères typiques de l'ordre des Bothriocephalidea.
 8. La présence de spermatozoïdes de type I ou II et la présence ou non d'un anneau de microtubules corticaux sont des caractères importants qui soutiennent l'érection des « Diphyllbothriidae » et des « Bothriocephalidae » au statut d'ordre, à partir de l'ancien ordre des « Pseudophyllidea ».
 9. *Echinobothrium euterpes*, a une spermiogenèse de type I. La dégénération de l'axonème court, formé pendant la spermiogenèse, conduit à la formation d'un spermatozoïde de type IV. La disparité qui existe concernant le nombre d'axonèmes chez les espèces étudiées est résolue avec l'étude de *E. euterpes*.
 10. L'absence ou la présence en faible nombre de microtubules corticaux se confirme pour l'ordre des Diphyllidea. Cette réduction serait compensée par une quantité importante de granules de glycogène distribués tout le long du gamète mâle.
 11. Chez les Diphyllidea, la racine striée typique décrite chez les cestodes est remplacée par une masse de matériel opaque aux électrons, de forme triangulaire, d'aspect granulaire et ne présentant pas de striations visibles. Ce caractère, seulement signalé chez les Diphyllidea, pourrait constituer une autapomorphie pour cet ordre.
 12. *Molluscotaenia crassiscolex* est caractérisé par une spermiogenèse de type IV et un spermatozoïde de type VI. Ces deux modèles se confirment chez les

Dilepididae *sensu stricto*. Chez *M. crassiscolex*, la présence d'un corps en crête d'une morphologie tout à fait particulière a été mise en évidence.

13. L'analyse globale des données spermatologiques sur les Dilepididae *sensu lato*, a permis de discerner les Dilepididae *sensu stricto* des Dipylidiidae, Metadilepididae et Paruterinidae, familles anciennement incluses dans les Dilepididae *sensu lato*. Cependant, elle n'a pas permis de distinguer les Dilepididae *sensu stricto* des Gryporhynchidae.



BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abouzakham A.A., Romia S.A., Hegazi M.M. & El-Kholy E.-S.I. (1990).** An electron microscope study on spermatogenesis in *Hymenolepis nana*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **20** : 215-220.
- Agostini S., Ndiaye P.I., Feliu C., Miquel J. & Marchand B. (2003).** Ultrastructural study of the spermatozoon of *Joyeuxiella echinorhyncoides* (Cestoda, Cyclophyllidea, Dipylidiidae), intestinal parasite of the red fox. *Proceedings of the IX International Helminthological Symposium*, Stara Lesna : 30.
- Ammann M. & de Chambrier A. (2008).** *Ophiotaenia gilberti* sp. n. (Eucestoda : Proteocephalidea), a parasite of *Thamnodynastes pallidus* (Serpentes : Colubridae) from Paraguay. *Revue Suisse de Zoology*, **115** : 541-551.
- Arafa S.Z. & Hamada S.F. (2004).** Spermatogenesis and sperm ultrastructure of the caryophyllidean cestode, *Monobothrioides chalmersius* (Woodland, 1924) Hunter, 1930. *Egyptian Journal of Zoology*, **43** : 49-70.
- Arredondo N.J. & Gil de Pertierra A.A. (2010).** *Monticellia santafesina* n. sp. (Cestoda : Proteocephalidea), a parasite of *Megalonema platanum* (Günther) (Siluriformes : Pimelodidae) in the Paraná River basin, Argentina. *Systematic Parasitology*, **76** : 103-110.
- Azzouz-Draoui N. (1985).** *Étude ultrastructurale comparée de la spermiogenèse et du spermatozoïde de quatre Cestodes Diphyllidea*. Thèse de 3^e Cycle, Université de Tunis, Tunis.
- Azzouz Draoui N. & Maamouri F. (1997).** Observations sur le développement de *Clestobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819) (Cestoda, Pseudophyllidea) parasite intestinal de *Merluccius merluccius* Linnaeus, 1758 (Teleostei). *Parasite*, **4** : 81-82.
- Azzouz-Draoui N. & Mokhtar-Maamouri F. (1986/88).** Ultrastructure comparée de la spermiogenèse et du spermatozoïde de *Echinobothrium affine* Diesing, 1863 et *E. harfordi* Mac Vicar, 1976 (Cestoda, Diphyllidea). *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles de Tunisie*, **18** : 9-20.

B

- Bâ A., Bâ C.T. & Marchand B. (1996).** Étude morpho-anatomique et ultrastructure de la gamétogénèse des Cestodes de rongeurs du Sénégal. *Vie et Milieu*, **46** : 382.
- Bâ A., Bâ C.T. & Marchand B. (2000).** Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Sudarikovina taterae* (Cestoda, Cyclophyllidea, Anoplocephalidae) intestinal parasite of *Tatera gambiana* (Rodentia, Gerbillidae). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, **32** : 137-144.
- Bâ A., Bâ C.T. & Marchand B. (2002).** Ultrastructural study of the spermatozoon of *Echinocotyle dolosa* (Cestoda, Cyclophyllidea, Hymenolepididae). *Acta Parasitologica*, **47** : 131-136.
- Bâ A., Bâ C.T., Quilichini Y., Dieng T. & Marchand B. (2011).** Ultrastructure of the spermatozoon of *Taeniarhynchus saginatus* (syn. *Taenia saginata*) (Goeze, 1782) Weinland, 1858 (Cestoda, Taeniidae) an intestinal parasite of human. *Parasitology Research*, **108** : 831-836.
- Bâ C.T., Bâ A. & Marchand B. (2005a).** Ultrastructure of the spermatozoon of *Paroniella reynoldsae* (Cyclophyllidea, Davaineidae) an intestinal parasite of *Corvus albus* (Aves, Corvidae). *Acta Parasitologica*, **50** : 208-214.
- Bâ C.T., Bâ A. & Marchand B. (2005b).** Ultrastructure of the spermatozoon of *Raillietina (Raillietina) baeri* (Cyclophyllidea, Davaineidae) an intestinal parasite of the multimammate rat, *Mastomys huberti* (Rodentia, Muridae). *Parasitology Research*, **97** : 173-178.
- Bâ C.T., Bâ A. & Marchand B. (2007).** Ultrastructure of the spermatozoon of *Bothriocephalus claviceps* (Cestoda, Pseudophyllidea) : a parasite of *Anguilla anguilla* (Fish, Teleostei). *Parasitology Research*, **101** : 77-83.
- Bâ C.T. & Marchand B. (1992a).** Reinvestigation of the ultrastructure and the spermatozoon of *Hymenolepis nana* (Cestoda, Cyclophyllidea), parasite of the small intestine of *Rattus rattus*. *Molecular Reproduction and Development*, **33** : 39-45.
- Bâ C.T. & Marchand B. (1992b).** Étude ultrastructurale sur le spermatozoïde de *Moniezia expansa* et *M. benedeni* (Cestoda, Cyclophyllidea, Anoplocephalidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **67** : 111-115.
- Bâ C.T. & Marchand B. (1992c).** Ultrastructural particularities of the spermatozoon of *Stilesia globipunctata* (Cestoda) parasite of the small intestine of sheep and goats in Senegal.

- Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, **24** : 29-34.
- Bâ C.T. & Marchand B. (1993).** Ultrastructure of the *Retinometra serrata* spermatozoon (Cestoda) intestinal parasite of turtle-doves in Senegal. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, **25** : 233-238.
- Bâ C.T. & Marchand B. (1994a).** Ultrastructure of the spermatozoon of *Sandonella sandoni* (Cestoda, Proteocephalidea, Sandonellinae). *Invertebrate Reproduction and Development*, **25** : 9-17.
- Bâ C.T. & Marchand B. (1994b).** Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Aporina delafondi* (Cyclophyllidea, Anoplocephalidae) intestinal parasite of turtle doves in Senegal. *International Journal for Parasitology*, **24** : 225-235.
- Bâ C.T. & Marchand B. (1994c).** Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Raillietina (Raillietina) tunetensis* (Cyclophyllidea, Davaineidae) intestinal parasite of turtle doves in Senegal. *International Journal for Parasitology*, **24** : 237-248.
- Bâ C.T. & Marchand B. (1994d).** Similitude ultrastructurale des spermatozoïdes de quelques Cyclophyllidea. *Parasite*, **1** : 51-55.
- Bâ C.T. & Marchand B. (1994e).** Comparative ultrastructure of the spermatozoa of *Inermicapsifer guineensis* and *I. madagascariensis* (Cestoda, Anoplocephalidae, Inermicapsiferinae) intestinal parasites of rodents in Senegal. *Canadian Journal of Zoology*, **72** : 1633-1638.
- Bâ C.T. & Marchand B. (1994f).** Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Mathevotaenia herpestis* (Cestoda), intestinal parasite of *Atelerix albiventrix* in Sénégal. *Acta Zoologica (Stockholm)*, **75** : 167-175.
- Bâ C.T. & Marchand B. (1994g).** Ultrastructure of the spermatozoon of *Avitellina centripunctata* (Cestoda, Cyclophyllidea), a parasite of the small intestine of cattle in Senegal. *Acta Zoologica (Stockholm)*, **75** : 161-166.
- Bâ C.T. & Marchand B. (1995).** Spermiogenesis, spermatozoa and phyletic affinities in the Cestoda. Dans : Jamieson B.G.M., Ausió J. & Justine J.-L. (eds.), *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, **166** : 87-95.
- Bâ C.T. & Marchand B. (1996a).** Ultrastructure of the spermatozoon of *Hymenolepis straminea* (Cyclophyllidea, Hymenolepididae) intestinal parasite of *Arvicanthis niloticus* in Senegal. *Invertebrate Reproduction and Development*, **29** : 243-247.
- Bâ C.T. & Marchand B. (1996b).** Spermatides et spermatozoïdes : outils phylogénétiques exemple de *Mathevotaenia herpestis* parasite du hérisson à ventre blanc *Atelerix*

albiventris. *Vie et Milieu*, **46** : 382.

- Bâ C.T. & Marchand B. (1998)**. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Vampirolepis microstoma* (Cestoda, Hymenolepididae), intestinal parasite of *Rattus rattus*. *Microscopy Research and Technique*, **42** : 218-225.
- Bâ C.T., Marchand B. & Mattei X. (1991)**. Demonstration of the orientation of the Cestodes spermatozoon illustrated by the ultrastructural study of spermiogenesis of a Cyclophyllidea : *Thysaniezia ovilla*, Rivolta, 1874. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, **23** : 606-612.
- Baguña J. & Riutort M. (2004)**. Molecular phylogeny of the Plathelminthes. *Canadian Journal of Zoology*, **82** : 168-193.
- Barrett N.J. & Smyth J.D. (1983)**. Observations on the structure and ultrastructure of sperm development in *Echinococcus multilocularis*, both in vitro and in vivo. *Parasitology*, **87** : li.
- Bauchot M.-L. (1987)**. Raies et autres batoides. Dans : Fischer W., Bauchot M.L. & Schneider M. (eds.), *Fiches FAO d'identification pour les besoins de la pêche. (rev. 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Vol. II*. Commission des Communautés Européennes and FAO, Rome : 845-886.
- Beveridge I. (2008)**. Redescriptions of species of *Tetrarhynchobothrium* Diesing, 1850 and *Didymorhynchus* Beveridge & Campbell, 1988 (Cestoda : Trypanorhyncha), with the description of *Zygorhynchus borneensis* n. sp. *Systematic Parasitology*, **69** : 75-88.
- Beveridge I. & Campbell R.A. (2005)**. Three new genera of trypanorhynch cestodes from Australian elasmobranch fishes. *Systematic Parasitology*, **60** : 211-224.
- Beveridge I. & Justine J.-L. (2006)**. Two new species of *Pseudochristianella* Campbell & Beveridge, 1990 (Cestoda : Trypanorhyncha) from elasmobranch fishes from the Gulf of California, Mexico. *Parasite*, **13** : 275-281.
- Beveridge I. & Justine J.-L. (2007a)**. *Pseudolacistorhynchus nanus* n. sp. (Cestoda : Trypanorhyncha) Parasitic in the Spiral Valve of the Zebra Shark, *Stegostoma fasciatum* (Hermann, 1783). *Transactions of the Royal Society of South Australia*, **132** : 175-181.
- Beveridge I. & Justine J.-L. (2007b)**. *Paragrillotia apecteta* n. sp. and redescription of *P. spratti* (Campbell & Beveridge, 1993) n. comb. (Cestoda, Trypanorhyncha) from Hexanchid and Carcharhinid sharks off New Caledonia. *Zoosystema*, **29** : 381-391.
- Beveridge I. & Justine J.-L. (2010)**. Two new species of *Prochristianella* Dollfus, 1946 (Platyhelminthes, Cestoda) from the blue-spotted stingray, *Neotrygon kuhlii* (Müller & Henle, 1841) off New Caledonia. *Zoosystema*, **32** : 643-652.

- Bona F.V. (1994).** Family Dilepididae Railliet & Henry, 1909. Dans : Khalil L.F., Jones A. & Bray R.A. (eds.), *Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates*. CAB International, Wallingford : 443-554.
- Bonsdorff C.H. v. & Telkkä A. (1965).** The spermatozoon flagella in *Diphyllobothrium latum* (fish tapeworm). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische-Anatomie*, **66** : 643-648.
- Brabec J., Kuchta R. & Scholz T. (2006).** Paraphyly of the Pseudophyllidea (Platyhelminthes : Cestoda) : circumscription of monophyletic clades based on phylogenetic analysis of ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology*, **36** : 1535-1541.
- Brooks D.R., O'Grady R.T. & Glen D.R. (1985).** The phylogeny of the Cercomeria Brooks, 1982 (Platyhelminthes). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, **52** : 1-20.
- Bruňanská M. (2009).** Spermatological characters of the caryophyllidean cestode *Khawia sinensis* Hsü, 1935, a carp parasite. *Parasitology Research*, **105** : 1603-1610.
- Bruňanská M. (2010).** Recent insights into spermatozoa development and ultrastructure in the Eucestoda. Dans : Lejeune T. & Delvaux P. (eds.), *Human Spermatozoa : Maturation, Capacitation and Abnormalities*. Nova Science Publishers Inc., New York : 327-354.
- Bruňanská M., Fagerholm H.-P., Nebesářová J. & Kostič B. (2010).** Ultrastructure of the mature spermatozoon of *Eubothrium rugosum* (Batsch, 1786) with a re-assessment of the spermatozoon ultrastructure of *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779) (Cestoda : Bothriocephalidea). *Helminthologia*, **47** : 257-263.
- Bruňanská M. & Kostič B. (2011).** Revisiting caryophyllidean type of spermiogenesis in the Eucestoda based on spermatozoon differentiation and ultrastructure of *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781). *Parasitology Research*, sous presse.
- Bruňanská M., Nebesářová J. & Scholz T. (2003b).** Spermiogenesis in the proteocephalidean cestode *Proteocephalus torulosus* (Batsch, 1786). *Parasitology Research*, **90** : 318-324.
- Bruňanská M., Nebesářová J. & Scholz T. (2003c).** Ultrastructure of the spermatozoon of the proteocephalidean cestode *Proteocephalus torulosus* (Batsch, 1786). *Parasitology Research*, **89** : 345-351.
- Bruňanská M., Nebesářová J., Scholz T. & Fagerholm H.P. (2001).** Spermiogenesis in the pseudophyllid cestode *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779). *Parasitology Research*, **87** : 579-588.
- Bruňanská M., Nebesářová J., Scholz T. & Fagerholm H.P. (2002).** Ultrastructure of the spermatozoon of the pseudophyllidean cestode *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779).

Parasitology Research, **88** : 285-291.

- Bruňanská M. & Poddubnaya L.G. (2006).** Spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Khawia armeniaca* (Cholodkovski, 1915). *Parasitology Research*, **99** : 449-454.
- Bruňanská M. & Poddubnaya L.G. (2010).** Spermatological characters of the spathebothriidean tapeworm *Didymobothrium rudolphii* (Monticelli, 1890). *Parasitology Research*, **106** : 1435-1442.
- Bruňanská M., Scholz T., Dezfuli B.S. & Poddubnaya L.G. (2006).** Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Cyathocephalus truncatus* (Pallas, 1781) Kessler, 1868 (Cestoda : Spathebothriidea). *Journal of Parasitology*, **92** : 884-892.
- Bruňanská M., Scholz T. & Ibraheem M.H. (2004a).** Ultrastructural characters of the spermatozoon of the cestode *Corallobothrium solidum* Fritsch, 1886 (Cestoda : Proteocephalidea), a parasite of the electric catfish *Malapterurus electricus*. *Parasitology Research*, **94** : 421-426.
- Bruňanská M., Scholz T. & Ibraheem M.H. (2004b).** Ultrastructural particularities of the spermatozoon of the cestode *Electrotaenia malopteruri* (Fritsch, 1886) (Proteocephalidae : Gangesiinae), a parasites of *Malapterurus electricus* (Siluriformes : Malapteruridae) from the river Nile, Egypt. *Parasitology Research*, **93** : 114-120.
- Bruňanská M., Scholz T. & Ibraheem M.H. (2005).** Spermiogenesis in the cestode *Corallobothrium solidum* Fritsch, 1886 (Proteocephalidea : Corallobothriinae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, **86** : 55-61.
- Bruňanská M., Scholz T. & Nebesářová J. (2003a).** Reinvestigation of the spermatozoon ultrastructure of the cestode *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800), a parasite of salmonid fish. *Parasitology Research*, **91** : 357-362.
- Bruňanská M., Scholz T. & Nebesářová J. (2004c).** Reinvestigation of spermiogenesis in the proteocephalidean cestode *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800). *Journal of Parasitology*, **90** : 23-29.
- Burseý C.R., Goldberg S.R. & Kraus F. (2006).** New genus, new species of Cestoda (Proteocephalidae) from the lizard *Sphenomorphus aignanus* (Squamata : Scincidae) from Papua New Guinea. *Comparative Parasitology*, **73** : 184-187.
- Burseý C.R., Goldberg S.R. & Kraus F. (2008).** A New Species of *Proteocephalus* (Cestoda : Proteocephalidae), description of the male of *Desmogathiema papuensis* (Nematoda : Quimperiidae), and other endoparasites in *Sylvirana supragrisea* (Anura : Ranidae) from Papua New Guinea. *Comparative Parasitology*, **75** : 33-48.

C

- Caira J.N., Jensen K. & Healy C.J. (1999).** On the phylogenetic relationships among tetraphyllidean, lecanicephalidean and diphyllidean tapeworm genera. *Systematic Parasitology*, **42** : 77-151.
- Caira J.N., Jensen K. & Healy C.J. (2001).** Interrelationships among tetraphyllidean and lecanicephalidean cestodes. Dans : Littlewood D.T.J. & Bray R.A. (eds.), *Interrelationships of the Plathelminthes*. Taylor and Francis, London : 135-158.
- Caira J.N., Jensen K. & Rajan C. (2007).** Seven new *Yorkeria* species (Cestoda : Tetraphyllidea) from Borneo and Australia and their implications for identification of *Chiloscyllium* (Elasmobranchii : Orectolobiformes) species. *Journal of Parasitology*, **93** : 357-376.
- Caira J.N., Kuchta R. & Desjardins L. (2010).** A new genus and two new species of Aporhynchidae (Cestoda : Trypanorhyncha) from catsharks (Carcharhiniformes : Scyliorhinidae) off Taiwan. *Journal of Parasitology*, **96** : 1185-1190.
- Campbell R.A. & Beveridge I. (2002).** The genus *Acanthobothrium* (Cestoda : Tetraphyllidea : Onchobothriidae) parasitic in Australian elasmobranch fishes. *Invertebrate Systematics*, **16** : 237-344.
- Campbell R.A. & Beveridge I. (2006).** Two new species of *Pseudochristianella* Campbell & Beveridge, 1990 (Cestoda : Trypanorhyncha) from elasmobranch fishes from the Gulf of California, Mexico. *Parasite*, **13** : 275-281.
- Campbell R.A. & Beveridge I. (2007a).** A new species and new records of *Parachristianella* Dollfus, 1946 (Cestoda : Trypanorhyncha) from the Gulf of California, Mexico. *Comparative Parasitology*, **74** : 218-228.
- Campbell R.A. & Beveridge I. (2007b).** Revision of the *Grillotia erinaceus* (van Beneden, 1858) species complex (Cestoda : Trypanorhyncha), with the description of *G. brayi* n. sp. *Systematic Parasitology*, **68** : 1-31.
- Casanova J.C. (1993).** *Análisis ecológico de las helmintofaunas de Mamíferos silvestres : Genetta genetta (Linnaeus, 1758) (Carnivora : Viverridae), Clethrionomys glareolus Schreber, 1790 (Rodentia : Arvicolidae) y Talpa occidentalis Cabrera, 1907 (Insectivora : Talpidae)*. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 734 pp.
- Chandra P. & Gupta N. (2007).** *Proteocephalus bufonis* n. sp. (Cestoda : Proteocephalidae) from the toad *Bufo melanostictus* collected from Uttar Pradesh, Indian. *Zoological Survey*

of India, **6** : 105-112.

- Cheng G., Yuguang L. & Zaohe W. (2007).** A new cestode species *Ophiotaenia wuyiensis* n. sp. (Proteocephalidea : Proteocephalidae La Rue, 1911) from China. *Journal of Parasitic Diseases*, **31** : 150-151.
- Chervy L. (2002).** The terminology of larval cestodes or metacestodes. *Systematic Parasitology*, **52** : 1-33.
- Chomicz L. & Świdorski Z. (1992a).** Spermiogenesis and ultrastructure of the ultrastructure of the Cestode *Dicranotaenia coronula* (Dujardin, 1845) (Cyclophyllidea, Hymenolepididae). *Proceedings of the 5th Asia-Pacific Electron Microscopy Conference*, Beijing : 324-325.
- Chomicz L. & Świdorski Z. (1992b).** Ultrastructure of the spermatozoon of the Cestode *Diorchis parvogenitalis* (Cyclophyllidea, Hymenolepididae). *Proceedings of the 5th Asia-Pacific Electron Microscopy Conference*, Beijing : 330-331.
- Coil W.H. (1991).** Platyhelminthes : Cestoidea. Dans : Harrison F.W. & Bogitsh B.J. (eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Wiley-Liss, New York : 211-283.
- Conn D.B. (2001).** Early spermatogenesis, sperm ultrastructure and spermatoferic duct cytoarchitecture in *Mesocestoides lineatus* (Platyhelminthes : Cestoda). *Proceedings of the 9th International Congress on Invertebrate Reproduction and Development*, Grahamstown : 71.
- Coquille S.C. & de Chambrier A. (2008).** *Cairaella henrii* gen. n., sp. n., a parasite of *Norops trachyderma* (Polychrotidae), and *Ophiotaenia nicoleae* sp. n. (Eucestoda : Proteocephalidea), a parasite of *Thecadactylus rapicauda* (Gekkonidae), in Ecuador. *Folia Parasitologica*, **55** : 197-206.

D

- de Chambrier A., Rego A.A., Gil de Pertierra A.A. (2005).** Redescription of two cestodes parasites (Eucestoda : Proteocephalidea), parasites of *Phractocephalus hemiliopterus* (Siluriformes) from the Amazon and proposition of *Scholzia* gen. n. *Revue Suisse de Zoologie*, **112** : 735-752.
- de Chambrier A., Sène A., Mahmoud Z., Mariaux J. & Scholz T. (2008).** Redescription of *Sandonella sandoni* (Lynsdale, 1960) (Cestoda : Proteocephalidea), an enigmatic parasite of *Heterotis niloticus* (Osteoglossiformes : Arapaimidae) in Africa. *Journal of Parasitology*, **94** : 202-211.

- de Chambrier A., Ammann M. & Scholz T. (2010).** First species of *Ophiotaenia* (Cestoda : Proteocephalidea) from Madagascar : *O. georgievi* sp. n., a parasite of the endemic snake *Leioheterodon geayi* (Colubridae). *Folia Parasitologica*, **57** : 197-205.
- de Chambrier A., Coquille S.C. & Brooks D.R. (2006a).** *Ophiotaenia bonneti* n. sp. (Eucestoda : Proteocephalidea), a parasite of *Rana vaillanti* (Anura : Ranidae) in Costa Rica. *Folia Parasitologica*, **53** : 125-133.
- de Chambrier A., Scholz T., Beletew M. & Mariaux J. (2009).** A new genus and species of Proteocephalidea (Cestoda) from *Clarias* Catfishes (Siluriformes : Clariidae) in Africa. *Journal of Parasitology*, **95** : 160-168.
- de Chambrier A., Scholz T., Kuchta R., Posel P., Mortenthaler M. & Chuquipiondo Guardia C. (2006b).** Tapeworms (Cestoda : Proteocephalidea) of fishes from the Amazon River in Peru. *Comparative Parasitology*, **73** : 111-120.
- de Chambrier A., Takemoto R.M. & Pavanelli G.C. (2006c).** *Nomimoscolex pertierra* n. sp. (Eucestoda : Proteocephalidea), a parasite of *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes : Pimelodidae) in Brazil and redescription of *N. sudobim* Woodland, 1935 ; a parasite of *P. fasciatum*. *Systematic Parasitology*, **64** : 191-202.
- de Chambrier A. & Vaucher C. (1999).** Proteocephalidae et Monticelliidae (Eucestoda : Proteocephalidea) parasites de poissons d'eau douce au Paraguay, avec descriptions d'un genre nouveau et de dix espèces nouvelles. *Revue Suisse de Zoologie*, **106** : 165-240.
- de Chambrier A., Zehnder A., Vaucher C. & Mariaux J. (2004).** The evolution of the Proteocephalidea (Platyhelminthes, Eucestoda) based on an enlarged molecular phylogeny, with comments on their uterine development. *Systematic Parasitology*, **57** : 159-171.

E

- Ehlers U. (1984).** Phylogenetisches System der Plathelminthes. *Verhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg (NF)*, **27** : 291-294.
- Ehlers U. (1985a).** Phylogenetic relationships within the Platyhelminthes. Dans : Conway-Morris S., George J.D., Gibson R. & Platt H.M. (eds.), *The Origins and relationships of lower invertebrates*. Oxford University Press, Oxford : 143-158.
- Ehlers U. (1985b).** *Das Phylogenetische System der Plathelminthes*. G. Fischer, Stuttgart. Akademie der Wissenschaften und der Literatur (Germany), 317 pp.

- Ehlers U. (1986).** Comments on a phylogenetic system of the Platyhelminthes. *Hydrobiologia*, **132** : 1-12.
- Ehlers U. (1988).** The Prolecithophora - a monophyletic taxon of the Platyhelminthes? *Fortschritte der Zoologie*, **36** : 359-365.
- Eira C. (2004).** *Mosgovoyia ctenoides* (Cestoda: Anoplocephalidae), parásito intestinal de *Oryctolagus cuniculus* en Dunas de Mira (Portugal). *Estudio multidisciplinar*. Memoria de Diploma de Estudios Avanzados (D.E.A.) de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 61 pp.
- Eira C. (2006).** *Multidisciplinary study of the helminthfauna of the red fox *Vulpes vulpes* L. and of its preys, the wood mouse *Apodemus sylvaticus* L. and the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* L. in Dunas de Mira, Portugal.* Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 168 pp.
- Eira C., Miquel J., Świdorski Z., Młocicki D., Torres J. & Marchand B. (2005).** Spermatogenesis in the cestode *Gallegoides arfaai* (Anoplocephalidae). *Acta Parasitológica Portuguesa*, **12** : 477-478.
- Eira C., Miquel J., Vingada J. & Torres J. (2006).** Spermogenesis and spermatozoon ultrastructure of the cestode *Mosgovoyia ctenoides* (Cyclophyllidea : Anoplocephalidae), an intestinal parasite of *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha : Leporidae). *Journal of Parasitology*, **92** : 708-718.
- Euzet L. (1959).** *Recherches sur les cestodes tétraphyllidés des sélaciens des côtes de France.* Thesis. Université de Montpellier, 263 pp.
- Euzet L. (1994).** Order Tetracyllidea Carus, 1863. Dans : Khalil L.F., Jones A. & Bray R.A. (eds.), *Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates*. CAB International, Wallingford : 149-194.
- Euzet L., Świdorski Z. & Mokhtar-Maamouri F. (1981).** Ultrastructure comparée du spermatozoïde des Cestodes. Relations avec la phylogénèse. *Annales de Parasitologie (Paris)*, **56** : 247-259.

F

- Falavigna D.L.M., Velho L.F.M. & Pavanelli G.C. (2003).** Proteocephalidean Larvae (Cestoda) in Naturally Infected Cyclopid Copepods of the Upper Paraná River Floodplain, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98** : 69-72.

- Faliex E., Tyler G. & Euzet L. (2000).** A new species of *Ditrachybothridium* (Cestoda : Diphyllidea) from *Galeus* sp. (Selachii, Scyliorhynidae) from the South Pacific Ocean, with a revision of the diagnosis of the order, family, and genus and notes on descriptive terminology of microtriches. *Journal of Parasitology*, **86** : 1078-1084.
- Featherston D.W. (1971).** *Taenia hydatigena*. Light and electron microscope study of spermatogenesis. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **37** : 148-168.
- Feliu C., Hidalgo C., Miquel J. & Marchand B. (1999).** Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon as a tool in phylogeny and taxonomy. The example of *Mesocestoides litteratus* (Cestoda, Mesocestoididae). *Helminthologia*, **36** : 8-9.
- Friggins M.M. & Duszynski D.W. (2005).** Four new cestode species from the spiral intestine of the round stingray, *Urobatis halleri*, in the northern Gulf of California, Mexico. *Comparative Parasitology*, **72** : 136-149.

G

- Gamil I.S. (2008).** Ultrastructural studies of the spermatogenesis and spermiogenesis of the caryophyllidean cestode *Wenyonia virilis* (Woodland, 1923). *Parasitology Research*, **103** : 777-785.
- Genov T. (1984).** *Helminths of insectivores and rodents in Bulgaria*. Publishing House of the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, 348 pp.
- Georgiev B.B. (2003).** Cestoda (Tapeworms). Dans : Thoney D.A. & Schlager. N. (eds.), *Grzimek's Animal Life Encyclopedia. Volume 1. Lower Metazoans and Lesser Deuterostomes*. Gale, Detroit : 225-243.
- Georgiev B.B., Bray R.A. & Littlewood D.T.J. (2006).** Cestode of small mammals : Taxonomy and life cycles. Dans : Morand S., Krasnov B.R. & Poulin R. (eds.), *Micromammals and Macroparasites from Evolutionary Ecology to Management*. Springer-Verlag, Tokyo, Berlin, Heidelberg, New York : 29-59.
- Gil de Pertierra A.A. (2009).** *Luciaella ivanovae* n. g., n. sp. (Eucestoda : Proteocephalidea : Peltidocotylineae), a parasite of *Ageneiosus inermis* (L.) (Siluriformes : Auchenipteridae) in Argentina. *Systematic Parasitology*, **73** : 71-80.
- Gil de Pertierra A.A., Incorvaia I.S. & Arredondo N.J. (2011).** Two new species of *Clestobothrium* (Cestoda : Bothriocephalidea), parasites of *Merluccius australis* and *M. hubbsi* (Gadiformes : Merlucciidae) from the Patagonian shelf of Argentina, with

comments on *Clestobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819). *Folia Parasitologica*, **58** : 121-134.

H

- Healy C., Caira J.N., Jensen K., Webster B., Littlewood, D.T.J. (2009).** Proposal for a new tapeworm order, Rhinebothriidea. *International Journal for Parasitology*, **39** : 497-511.
- Hendelberg J. (1969).** On the development of different types of spermatozoa from spermatids with two flagella in the Turbellaria with remarks on the ultrastructure of the flagella. *Zoologiska Bidrag fran Uppsala*, **38** : 1-50.
- Hidalgo C. (1999).** *Estudio ultraestructural de la espermiogénesis y el espermatozoide de diversos Cestodos del orden Cyclophyllidea*. Màster Experimental en Ciències Farmacèutiques (Parasitologia), Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 95 pp.
- Hidalgo C., Miquel J., Muro J., Feliu C. & Marchand B. (1999).** Reflexiones acerca del desarrollo espermático de *Mesocestoides litteratus*. ¿Es un Cyclophyllidea? *Resúmenes del XI Congreso Ibérico de Parasitología*, Córdoba : 16.
- Hidalgo C., Miquel J., Torres J. & Marchand B. (2000).** Ultrastructural study of spermiogenesis and the spermatozoon in *Catenotaenia pusilla*, an intestinal parasite of *Mus musculus*. *Journal of Helminthology*, **74** : 73-81.
- Hoberg E.P. (1986).** Evolution and historical biogeography of a parasite-host assemblage, *Alcataenia* spp. (Cyclophyllidea : Dilepididae) in Alcidae (Charadriiformes). *Canadian Journal of Zoology*, **64** : 2576-2589.
- Hoberg E.P., Gardner S.L. & Campbell R.A. (1999).** Systematics of the Eucestoda : advances toward a new phylogenetic paradigm, and observations on the early diversification of tapeworms and vertebrates. *Systematic Parasitology*, **42** : 1-12.
- Hoberg E.P., Mariaux J. & Brooks D.R. (2001).** Phylogeny among orders of the Eucestoda (Cercomeromorphae) : Integrating morphology, molecules and total evidence. Dans : Littlewood D.T.J. & Bray R.A. (eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor & Francis, London : 112-126.
- Hoberg E.P., Mariaux J., Justine J.L., Brooks D.R. & Weekes P.J. (1997).** Phylogeny of the orders of the Eucestoda (Cercomeromorphae) based on comparative morphology : historical perspectives and a new working hypothesis. *Journal of Parasitology*, **83** : 1128-1147.

Hypša V., Škeříková A. & Scholz T. (2005). Phylogeny, evolution and host-parasite relationships of the order Proteocephalidea (Eucestoda) as revealed by combined analysis and secondary structure characters. *Parasitology*, **130** : 359-371.

I

IUCN (International Union for Conservation of Nature) : [http :
//www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/29661/0/rangemap](http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/29661/0/rangemap)

Ivanov V.A. & Hoberg E.P. (1999). Preliminary comments on a phylogenetic study of the order Diphyllidea van Beneden in Carus, 1863. *Systematic Parasitology*, **42** : 21-27.

Ivanov V.A. & Lipshitz A. (2006). Description of a new diphyllidean parasite of triakid sharks from the deep Red Sea. *Journal of Parasitology*, **92** : 841-846.

J

Jensen K. (2005). *Tapeworms of Elasmobranchs, Part I. A Monograph on the Lecanicephalidea. (Platyhelminthes : Cestoda)*. Bulletin of the University of Nebraska State Museum, vol 18, 241 pp.

Jones M.K. (1989). Ultrastructure of the cirrus pouch of *Cylindrotaenia hickmani* (Cestoda, Cyclophylloidea). *International Journal for Parasitology*, **19**(8): 919-930.

Jones M.K. (1994). Ultrastructure of the male accessory glands and sperm ducts of *Cylindrotaenia hickmani* (Cestoda, Cyclophylloidea). *Acta Zoologica (Stockholm)*, **75** : 269-275.

Jourdane J. (1972). Etude expérimentale du cycle biologique de deux espèces de *Choanotaenia* intestinaux des Soricidae. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **38** : 333-343.

Justine J.-L. (1986). Ultrastructure of the spermatozoon of the cestode *Duthiersia fimbriata* (Pseudophylloidea, Diphyllbothriidae). *Canadian Journal of Zoology*, **64** : 1545-1548.

Justine J.-L. (1991a). Phylogeny of parasitic Platyhelminthes : a critical study of synapomorphies proposed on the basis of the ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa. *Canadian Journal of Zoology*, **69** : 1421-1440.

Justine J.-L. (1991b). Spermatozoa as a tool for taxonomy of the species and supraspecific taxa in the Plathelminthes. Dans : Bacceti B. (ed.), *Comparative Spermatology 20 years After*. Raven Press, New York : 981-984.

- Justine J.-L. (1995).** Spermatozoal ultrastructure and phylogeny of the parasitic Platyhelminthes. Dans : Jamieson B.G.M., Ausió J. & Justine J.-L. (eds.), *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, **166** : 55-86.
- Justine J.-L. (1997).** La classification générale des Plathelminthes parasites : changements récents et utilisation des caractères ultrastructuraux, en particulier des spermatozoïdes. *Bulletin de la Société Française de Zoologie*, **122** : 226-277.
- Justine J.-L. (1998a).** Spermatozoa as phylogenetic characters for the Eucestoda. *Journal of Parasitology*, **84** : 385-408.
- Justine J.-L. (1998b).** Systématique des grands groupes de plathelminthes parasites : quoi de neuf ? *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, **16** : 34-52.
- Justine J.-L. (1999).** Spermatozoa of Plathelminthes : Comparative Ultrastructure, Tubulin Immunocytochemistry and Nuclear Labeling. Dans : Gagnon C. (ed.), *The Male Gamete. From Basic Science to Clinical Applications*. Cache River Press, Vienna : 352-362.
- Justine J.-L. (2001).** Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes. Dans : Littlewood D.T.J. & Bray R.A. (eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor & Francis, London : 231-238.
- Justine J.-L. (2003).** Ultrastructure des spermatozoïdes et phylogénie des Neodermata. Dans : Combes C. & Jourdane J. (eds.), *Taxonomie, écologie et évolution des métazoaires parasites*. Presses Universitaires de Perpignan, Perpignan : 359-380.

K

- Kelsoe G.H., Ubelaker J.E. & Allison V.F. (1977).** The fine structure of spermiogenesis in *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) with a description of the mature spermatozoon. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **54** : 175-187.
- Khalil L.F., Jones A. & Bray R.A. (1994).** *Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates*. CAB International, Cambridge, 751 pp.
- Kisielewska K. (1958).** The life cycle of *Choanotaenia crassiscolex* (Linstow, 1890) (Dilepididae) and some data relating to the formation of its cysticercoïds. *Bulletin de l'Académie Polonaise des Sciences*, **6** : 79-84.
- Kuchta R. (2007).** *Revision of the paraphyletic 'Pseudophyllidea' (Eucestoda) with description of two new orders Bothriocephalidea and Diphyllbothriidea*. PhD Thesis, Faculty of

Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, 97 pp.

- Kuchta R. & Caira J.N. (2010).** Three new species of *Echinobothrium* (Cestoda : Diphyllidea) from Indo-Pacific stingrays of the genus *Pastinachus* (Rajiformes : Dasyatidae). *Folia Parasitologica*, **57** : 185-196.
- Kuchta R. & Scholz T. (2007).** Diversity and distribution of fish tapeworms of the 'Bothriocephalidea' (Eucestoda). *Parassitologia*, **49** : 21-38.
- Kuchta R., Scholz T., Brabec J. & Bray R.A. (2008a).** Suppression of the tapeworm order Pseudophyllidea (Platyhelminthes : Eucestoda) and the proposal of two new orders, Bothriocephalidea and Diphyllbothriidea. *International Journal for Parasitology*, **38** : 49-55.
- Kuchta R., Scholz T. & Bray R.A. (2008b).** Revision of the order Bothriocephalidea Kuchta R., Scholz T., Brabec J. & Bray R.A., 2008 (Eucestoda) with amended generic diagnoses and keys to families and genera. *Systematic Parasitology*, **71** : 81-136.

ℒ

- Langeron M. (1949).** *Précis de Microscopie*. T. I et II. Paris, 1430 pp.
- Levron C., Bruňanská M., Kuchta R., Freeman M. & Scholz T. (2006c).** Spermatozoon ultrastructure of the pseudophyllidean cestode *Paraechinophallus japonicus*, a parasite of deep-sea fish *Psenopsis anomala* (Perciformes, Centrolophidae). *Parasitology Research*, **100** : 115-121.
- Levron C., Bruňanská M. & Marchand B. (2005).** Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the pseudophyllidean cestode *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781). *Parasitology Research*, **98** : 26-33.
- Levron C., Bruňanská M. & Poddubnaya L.G. (2006a).** Spermatological characters in *Diphyllbothrium latum* (Cestoda, Pseudophyllidea). *Journal of Morphology*, **267** : 1110-1119.
- Levron C., Bruňanská M. & Poddubnaya L.G. (2006b).** Spermatological characters of the pseudophyllidean cestode *Bothriocephalus scorpii* (Muller, 1781). *Parasitology International*, **55** : 113-120.
- Levron C., Miquel J., Oros M. & Scholz T. (2010).** Spermatozoa of tapeworms (Platyhelminthes, Eucestoda) : advances in ultrastructural and phylogenetic studies. *Biological Reviews*, **85** : 523-543.

- Levron C., Sítko J. & Scholz T. (2009).** Spermiogenesis and spermatozoon of the tapeworm *Ligula intestinalis* (Diphyllobothriidea) : phylogenetic implications. *Journal of Parasitology*, **95** : 1-9.
- Levron C., Yoneva A. & Kalbe M. (2011).** Spermatological characters in the diphyllbothriidean *Schistocephalus solidus* (Cestoda). *Acta Zoologica (Stockholm)*, sous presse.
- Li H.T. & Wang Y.H. (2007).** A new species of Macrobothriidae (Cestoda : Diphyllidea) from thornback ray *Platyrrhina sinensis* in China. *Journal of Parasitology*, **93** : 897-900.
- Li H.-Y., Brennan J.P. & Halton D.W. (2003).** Spermatogenesis, spermiogenesis and spermatozoon in the cestode (*Moniezia expansa*) (Cyclophyllidea, Anoplocephalidae). *Acta Zoologica Sinica*, **49** : 370-379.
- Littlewood D.T.J., Rohde K. & Clough K.A. (1998).** The phylogenetic position of *Udonella* (Platyhelminthes). *International Journal for Parasitology*, **28** : 1241-1250.
- Lumsden R.D. (1965).** Microtubules in the peripheral cytoplasm of cestodes spermatozoa. *Journal of Parasitology*, **51** : 929-931.

M

- MacKinnon B.M. & Burt M.D.B. (1984).** The comparative ultrastructure of spermatozoa from *Bothrimonus sturionis* Duv. 1842 (Pseudophyllidea), *Pseudanthobothrium hanseni* Baer, 1956 (Tetraphyllidea), and *Monoecocestus americanus* Stiles, 1895 (Cyclophyllidea). *Canadian Journal of Zoology*, **62** : 1059-1066.
- MacKinnon B.M. & Burt M.D.B. (1985).** Ultrastructure of spermatogenesis and the mature spermatozoon of *Haplobothrium globuliforme* Cooper, 1914 (Cestoda : Haplobothrioidea). *Canadian Journal of Zoology*, **63** : 1478-1487.
- MacKinnon B.M., Jarecka L. & Burt M.D.B. (1983).** Ultrastructure of the spermatozoa of *Haplobothrium globuliforme* (Cestoda : Haplobothriidae) from the bowfin, *Amia calva*. *Parasitology*, **87** : li.
- Mahendrasingam S., Fairweather I. & Halton D.W. (1989).** Spermatogenesis and the fine structure of the mature spermatozoon in the free proglottis of *Trilocularia acanthiaevulgaris* (Cestoda, Tetraphyllidea). *Parasitology Research*, **75** : 287-298.
- Mariaux J. (1998).** A molecular phylogeny of the Eucestoda. *Journal of Parasitology*, **84** : 114-124.

- Marigo A.M. (2010).** *Estudio ultraestructural comparado del espermatozoide de dos cestodos: Acanthobothrium crassicolle (Tetraphyllidea) y Molluscotaenia crassiscolex (Cyclophyllidea).* Máster de Biodiversidad, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, 30 pp.
- Marigo A.M., Bâ C.T. & Miquel J. (2011f).** Spermogenesis and spermatozoon ultrastructure of the dilepidid cestode *Molluscotaenia crassiscolex* (von Linstow, 1890), an intestinal parasite of the common shrew *Sorex araneus*. *Acta Zoologica (Stockholm)*, **92** : 116-125.
- Marigo A.M., Delgado E., Torres J., Bâ C.T. & Miquel J. (2011a).** Spermogenesis and spermatozoon ultrastructure of the bothriocephalidean cestode *Clestobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819), a parasite of the teleost fish *Merluccius merluccius* (Gadiformes : Merlucciidae). *Parasitology Research*, sous presse.
- Marigo A.M., Eira C., Bâ C.T. & Miquel J. (2009).** Spermogenesis in *Acanthobothrium crassicolle* Wedl, 1855 (Tetraphyllidea, Onchobothriidae), a parasite of the common stingray *Dasyatis pastinaca*. *Acta Parasitologica Portuguesa*, **16** : 346-347.
- Marigo A.M., Eira C., Bâ C.T. & Miquel J. (2011b).** Spermogenesis and spermatozoon ultrastructure of the diphyllidean cestode *Echinobothrium euterpes* (Neifar, Tyler and Euzet 2001) Tyler 2006, a parasite of the common guitarfish *Rhinobatos rhinobatos*. *Parasitology Research*, **109** : 809-821.
- Marigo A.M., Eira C., Bâ C.T. & Miquel J. (2011d).** Spermatological characters of *Acanthobothrium crassicolle* Wedl, 1855 (Tetraphyllidea, Onchobothriidae), a parasite of the common stingray *Dasyatis pastinaca*. *Acta Parasitologica*, **56** : 191-201.
- Marigo A.M., Levron C., Bâ C.T. & Miquel J. (2011e).** Ultrastructural study of spermogenesis and the spermatozoon of the proteocephalidean cestode *Barsonella lafoni* de Chambrier *et al.*, 2009, a parasite of the catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Siluriformes, Clariidae). *Zoologischer Anzeiger*, sous presse.
- Marigo A.M. & Miquel J. (2011).** El espermatozoide de los Bothriocephalidea (Cestoda) : nuevos datos referentes a *Clestobothrium crassiceps*. *Biologia de la Reproducció*, **12** : 29-32.
- Marigo A.M., Świdorski Z., Bâ C.T., Feliu C. & Miquel J. (2010b).** Ultrastructure of the spermatozoon of *Molluscotaenia crassiscolex* (von Linstow, 1890) (Cestoda, Cyclophyllidea, Dilepididae). *XII International Congress of Parasitology*, Melbourne : 1689.
- Marigo A.M., Świdorski Z., Bâ C.T. & Miquel J. (2010a).** Spermogenesis in the trypanorhynch cestode *Aporhynchus menezesi*, a parasite of *Etmopterus spinax*. *XII*

International Congress of Parasitology, Melbourne : 1857.

- Marigo A.M., Świdorski Z., Bâ C.T. & Miquel J. (2011c).** Spermiogenesis and ultrastructure of the spermatozoon of the trypanorhynch cestode *Aporhynchus menezesi* (Aporhynchidae), a parasite of the Velvet Belly lanternshark *Etmopterus spinax* (Elasmobranchii, Etmopteridae). *Folia Parasitologica*, **58** : 69-78.
- Marsella C.M.V. & de Chambrier A. (2008).** *Ophiotaenia alessandrae* sp. n. (Eucestoda : Proteocephalidea), a parasite of *Hyla boans* (Anura : Hylidae) from Amazonia in Ecuador. *Revue Suisse de Zoologie*, **115** : 553-563.
- Matevosyan E.M. (1963).** Dilepidoidea, tapeworm helminths of domestic and wild animals. *Osnovy Tsestodologii*, **3** : 688.
- McKerr G. (1985).** *The fine structure and physiology of a trypanorhynch tapeworm Grillotia erinaceus*. PhD Thesis, The Queen's University of Belfast.
- Mehlhorn H. (1988).** Reproduction, Platyhelminthes. Dans : Mehlhorn H. (ed.), *Parasitology in Focus*. Springer-Verlag, Berlin : 330-344.
- Miquel J., Bâ C.T. & Marchand B. (1997a).** Ultrastructure of the spermatozoon of *Skrjabinotaenia lobata* (Cyclophyllidea, Catenotaeniidae), intestinal parasite of *Apodemus sylvaticus* (Rodentia, Muridae). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, **29** : 521-526.
- Miquel J., Bâ C.T. & Marchand B. (1998a).** Ultrastructure of spermiogenesis of *Dipylidium caninum* (Cestoda, Cyclophyllidea, Dipylidiidae), an intestinal parasite of *Canis familiaris*. *International Journal for Parasitology*, **28** : 1453-1458.
- Miquel J., Bâ C.T. & Marchand B. (1998b).** Striated rootlets in spermatids of *Anoplocephaloides dentata* (Anoplocephalidae) and *Dipylidium caninum* (Dipylidiidae) : a new finding in the Cyclophyllidea. *Wiadomosci Parazytologiczne*, **44** : 597.
- Miquel J., Bâ C.T., Resina O. & Marchand B. (1997b).** Ultraestructura del espermatozoide de *Dipylidium caninum* (Dilepididae) en relación a otros Cestodos Cyclophyllidea. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **4** : 100.
- Miquel J., Bâ C.T., Torres J., Feliu C. & Marchand B. (2000b).** Sperm ultrastructure in the genus *Taenia* (Cestoda). *Acta Parasitologica*, **45** : 171.
- Miquel J., Eira C., Świdorski Z. & Conn D.B. (2007b).** *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1782) (Mesocestoididae) : new data on sperm ultrastructure. *Journal of Parasitology*, **93** : 545-552.
- Miquel J., Feliu C. & Marchand B. (1999).** Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Mesocestoides litteratus* (Cestoda, Mesocestoididae). *International*

- Journal for Parasitology*, **29** : 499-510.
- Miquel J., Foronda P., Espinosa A., Torres J. & Feliu C. (2008b)**. Ultrastructural characters of the spermatozoon of *Raillietina micracantha* (Cestoda, Cyclophyllidea, Davaineidae). *Xth European Multicollloquium of Parasitology*, Paris : 144-145.
- Miquel J., Foronda P., Torres J., Świdorski Z. & Feliu C. (2009b)**. Ultrastructural study of the spermatozoon of *Taenia taeniaeformis* (Batsch, 1786) (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae), an intestinal parasite of *Felis catus* from La Palma (Canary Islands, Spain). *Parasitology Research*, **104** : 1477-1483.
- Miquel J., Hidalgo C., Feliu C. & Marchand B. (2000a)**. Sperm ultrastructure of *Taenia mustelae* (Cestoda, Taeniidae), an intestinal parasite of the weasel, *Mustela nivalis* (Carnivora). *Invertebrate Reproduction and Development*, **38** : 43-51.
- Miquel J. & Marchand B. (1997)**. Ultrastructure of the spermatozoon of *Dipylidium caninum* (Cestoda, Cyclophyllidea, Dilepididae), an intestinal parasite of *Canis familiaris*. *Parasitology Research*, **83** : 349-355.
- Miquel J. & Marchand B. (1998a)**. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Anoplocephaloides dentata* (Cestoda, Cyclophyllidea, Anoplocephalidae), an intestinal parasite of Arvicolidae rodents. *Journal of Parasitology*, **84** : 1128-1136.
- Miquel J. & Marchand B. (1998b)**. Ultrastructure of the spermatozoon of the bank vole tapeworm, *Paranoplocephala omphalodes* (Cestoda, Cyclophyllidea, Anoplocephalidae). *Parasitology Research*, **84** : 239-245.
- Miquel J., Ndiaye P.I. & Feliu C. (2007c)**. Crest-like bodies in the spermatozoon of Hymenolepididae cestodes from Iberian rodents. *Revista Ibérica de Parasitología*, **67** : 27-33.
- Miquel J., Ndiaye P.I., Feliu C. & Marchand B. (2001)**. Similitudes ultraestructurales en el espermatozoide de dos Cestodos de la familia Anoplocephalidae : *Anoplocephaloides dentata* y *Paranoplocephala omphalodes*. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **8** : 16.
- Miquel J. & Świdorski Z. (2006a)**. Ultrastructure of the spermatozoon of *Dollfusiiella spinulifera* (Beveridge & Jones, 2000) Beveridge, Neifar & Euzet, 2004 (Trypanorhyncha, Eutetrarhynchidae). *Parasitology Research*, **99** : 37-44.
- Miquel J. & Świdorski Z. (2006b)**. Ultrastructure of spermatozoa of the trypanorhynch cestodes : new and supplementary characters for analysis of cestode evolution. *10th Evolutionary Biology Meeting at Marseilles*, Marseille : 91.
- Miquel J., Świdorski Z., Foronda P., Torres J. & Feliu C. (2009a)**. Ultrastructure of spermatogenesis of *Taenia taeniaeformis* (Batsch, 1786) (Cestoda, Cyclophyllidea,

- Taeniidae) and comparison of spermatological characters in the family Taeniidae Ludwig, 1886. *Acta Parasitologica*, **54** : 230-243.
- Miquel J., Świdorski Z., Mackiewicz J.S. & Ibraheem M.H. (2008a).** Ultrastructure of spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Wenyonia virilis* Woodland, 1923, with re-assessment of flagellar rotation in *Glaridacris catostomi* Cooper, 1920. *Acta Parasitologica*, **53** : 19-29.
- Miquel J., Świdorski Z. & Marchand B. (2005a).** Spermatological characters in the Dipylidiidae Stiles, 1896 (Cestoda, Cyclophyllidea). *Acta Parasitologica*, **50** : 65-73.
- Miquel J., Świdorski Z., Młocicki D., Eira C. & Marchand B. (2005b).** Spermatogenesis in the anoplocephalid cestode *Gallegoides arfaai* (Mobedi & Ghadirian, 1977) Tenora & Mas-Coma, 1978. *Acta Parasitologica*, **50** : 132-144.
- Miquel J., Świdorski Z., Młocicki D. & Marchand B. (2004).** Ultrastructure of the spermatozoon of the anoplocephalid cestode *Gallegoides arfaai* (Mobedi & Ghadirian, 1977) Tenora & Mas-Coma, 1978, an intestinal parasite of the wood mouse (*Apodemus sylvaticus* Linnaeus, 1758). *Parasitology Research*, **94** : 460-467.
- Miquel J., Świdorski Z., Neifar L. & Eira C. (2007a).** Ultrastructure of the spermatozoon of *Parachristianella trygonis* Dollfus, 1946 (Trypanorhyncha, Eutetrarhynchidae). *Journal of Parasitology*, **93** : 1296-1302.
- Miquel J., Torres J., Foronda P. & Feliu C. (2010).** Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the davaineid cestode *Raillietina micracantha* (Fuhrmann, 1909). *Acta Zoologica (Stockholm)*, **91** : 212-221.
- Mokhtar-Maamouri F. (1976).** *Étude ultrastructurale de la gamétogenèse et des premiers stades du développement de deux Cestodes Tetraphyllidea*. Thèse d'Etat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, France, 224 pp.
- Mokhtar-Maamouri F. (1979).** Étude en microscopie électronique de la spermiogenèse et du spermatozoïde de *Phyllobothrium gracile* Weld, 1855 (Cestoda, Tetraphyllidea, Phyllobothriidae). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **59** : 245-258.
- Mokhtar-Maamouri F. (1980).** Particularités des processus de la fécondation chez *Acanthobothrium filicolle* Zschokke, 1888 (Cestoda, Tetraphyllidea, Onchobothriidae). *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, **57** : 191-205.
- Mokhtar-Maamouri F. (1982).** Étude ultrastructurale de la spermiogenèse de *Acanthobothrium filicolle* var. *filicolle* Zschokke, 1888 (Cestoda, Tetraphyllidea, Onchobothriidae). *Annales de Parasitologie (Paris)*, **57** : 429-442.

- Mokhtar-Maamouri F. & Azzouz-Draoui N. (1984).** Spermiogenèse et ultrastructure du spermatozoïde de deux Cestodes Diphylloidea. *4ème Ecole Franco-Africaine de Biologie Moléculaire*, Djerba : 467-469.
- Mokhtar-Maamouri F. & Azzouz-Draoui N. (1990).** Spermiogenèse et ultrastructure du spermatozoïde de *Nematotaenia chantalae* Dollfus, 1957 (Cestoda, Cyclophylloidea, Nematotaeniidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **65** : 221-228.
- Mokhtar-Maamouri F. & Świdorski Z. (1975).** Étude en microscopie électronique de la spermatogénèse de deux Cestodes *Acanthobothrium filicolle benedenii* Loennberg, 1889 et *Onchobothrium uncinatum* (Rud., 1819) (Tetraphylloidea, Onchobothriidae). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **47** : 269-281.
- Mokhtar-Maamouri F. & Świdorski Z. (1976).** Ultrastructure du spermatozoïde d'un Cestode Tetraphylloidea Phyllobothriidae, *Echeneibothrium beauchampi* Euzet, 1959. *Annales de Parasitologie (Paris)*, **51** : 673-674.
- Morseth D.J. (1969).** Spermtail finestructure of *Echinococcus granulosus* and *Dicrocoelium dendriticum*. *Experimental Parasitology*, **24** : 47-53.

N

- Ndiaye P.I. (2002a).** *Estudio ultraestructural del espermatozoide de diversos representantes de la familia Hymenolepididae (Ariola, 1899) Railliet & Henry, 1909 (Cestoda, Cyclophylloidea) : las crestas helicoidales.* Memoria de Diploma de Estudios Avanzados (D.E.A.) de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 51 pp.
- Ndiaye P.I. (2002b).** *Estudio ultraestructural de la espermiogénesis y del espermatozoide de un Trematodo Notocotylus neyrari González Castro, 1945 (Digenea, Notocotylidae) y de un Cestodo Taenia parva Baer, 1926 (Cyclophylloidea, Taeniidae).* Màster Experimental en Ciències Farmacèutiques (Parasitologia), Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 95 pp.
- Ndiaye P.I. (2003).** *Systématique et Phylogénie de Plathelminthes parasites (Trematoda et Cestoda) : apports des études ultrastructurales de la reproduction.* Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 293 pp.
- Ndiaye P.I., Agostini S., Miquel J. & Marchand B. (2003a).** Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon in the genus *Joyeuxiella* Fuhrmann, 1935 (Cestoda, Cyclophylloidea, Dipylidiidae) : Comparative analysis of *J. echinorhynchoides* (Sonsino, 1889) and *J.*

pasqualei (Diamare, 1893). *Parasitology Research*, **91** : 175-186.

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

Neifar L., Tyler G.A. & Euzet L. (2001). Two new species of *Macrobothridium* (Cestoda, Diphyllidea) from rhinobatid elasmobranches in the Gulf of Gabès, Tunisia, with notes on the status of the genus. *Journal of Parasitology*, **87** : 673-680.

Noever C., Caira J.N., Kuchta R. & Desjardins L. (2010). Two new species of *Aporhynchus* (Cestoda : Trypanorhyncha) from deep water lanternsharks (Squaliformes : Etmopteridae) in the Azores, Portugal. *Journal of Parasitology*, **96** : 1176-1184.

O

Olson P.D., Littlewood D.T.J., Bray R.A. & Mariaux J. (2001). Interrelationships and Evolution of the Tapeworms (Platyhelminthes : Cestoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **19** : 443-467.

Olson P.D., Ruhnke T.R., Sanney J. & Hudson T. (1999). Evidence for host-specific clades of tetraphyllidean tapeworms (Platyhelminthes : Eucestoda) revealed by analysis of 18S ssrDNA. *International Journal for Parasitology*, **29** : 1465-1476.

Olson P.D. & Tkach V.V. (2005). Advances and trends in the molecular systematics of the parasitic plathelminthes. *Advances in Parasitology*, **60** : 165-243.

P

Palm H.W. (2004). *The Trypanorhyncha Diesing, 1863*. PKSPL-IPB Press, Bogor, 710 pp.

Palm H.W. (2010). *Nataliella marcelli* n. g., n. sp. (Cestoda : Trypanorhyncha : Rhinoptercolidae) from Hawaiian fishes. *Systematic Parasitology*, **75** : 105-115.

Palm H.W., Waeschenbach A., Olson P.D. & Littlewood D.T.J. (2009). Molecular phylogeny and evolution of the Trypanorhyncha Diesing, 1863 (Platyhelminthes : Cestoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52** : 351-367.

Planetary Biodiversity Inventory : A Survey of Tapeworms from Vertebrate Bowels of the Earth : <http://sites.google.com/site/tapewormpbi/about-tapeworm-orders/tetraphyllidea>

Polyakova-Krusteva O. & Vassilev I. (1973). On the ultrastructure of the tail of *Raillietina carneostrobilata* spermatozoa. *Bulletin of the Central Helminthological Laboratory (Sofia)*, **16** : 153-160.

Q

Quilichini Y. (2007). *Etude ultrastructurale des Plathelminthes parasites de poissons. Parasitologie et Ecotoxicologie des Salmonidés de Corse.* Thèse doctorale, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Corse, volume I, 192 pp.

Quilichini Y., Foata J., Bâ C.T. & Marchand B. (2007). Ultrastructure of the spermatozoon of *Calliobothrium verticillatum* (Cestoda, Tetraphyllidea, Oncobothriidae). *Acta Parasitologica*, **52** : 219-224.

R

Rego A.A. (1994). The order Proteocephalidea Mola, 1938. Dans : Khalil L.F., Jones A. & Bray R.A. (eds.), *Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates*. CAB International, Wallingford : 257-293.

Rego A.A. (1995). A new classification of the cestode order Proteocephalidea Mola. *Revista Brasileira de Zoologia*, **12** : 791-814.

Rego A.A., Chubb J.C. & Pavanelli G.C. (1999). Cestodes in South American freshwater teleost fishes : keys to genera and brief description of species. *Revista Brasileira de Zoologia*, **16** : 299-367.

Rego A.A., de Chambrier A., Hanzelová V., Hoberg E.P., Scholz T., Weekes P. & Zehnder M. (1998). Preliminary phylogenetic analysis of subfamilies of the Proteocephalidea (Eucestoda). *Systematic Parasitology*, **40** : 1-19.

Reynolds E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, **17** : 208-212.

Robinson J.M. & Bogitsh B.J. (1978). A morphological and cytochemical study of sperm development in *Hymenolepis diminuta*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **56** : 81-92.

Rosario B. (1964). An electron microscope study of spermatogenesis in cestodes. *Journal of Ultrastructure Research*, **11** : 412-427.

S

- Schmidt G.D. (1986).** *CRC Handbook of Tapeworm identification*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 688 pp.
- Schmidt G.D. & Beveridge I. (1990).** *Cathetocephalus australis* n. sp. (Cestoidea : Cathetocephalidae) from Australia, with a proposal for Cathetocephalidea n. ord. *Journal of Parasitology*, **76** : 337-339.
- Scholz T. & de Chambrier A. (2003).** Taxonomy and biology of the proteocephalidean cestodes : current state and perspectives. *Helminthologia*, **40** : 65-77.
- Sène A., Bâ C.T. & Marchand B. (1997).** Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of *Nomimoscolex* sp. (Cestoda, Proteocephalidea) intestinal parasite of *Claroates laticeps* (Fish, Teleost) in Senegal. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, **29** : 1-6.
- Sène A., Bâ C.T. & Marchand B. (1999).** Ultrastructure of spermiogenesis of *Phyllobothrium lactuca* (Cestoda, Tetraphyllidea, Phyllobothriidae). *Folia Parasitologica (Praha)*, **46** : 191-198.
- Sène A., Bâ C.T., Miquel J. & Marchand B. (1998).** Implication of *Phyllobothrium lactuca* (Cestoda, Tetraphyllidea, Phyllobothriidae) spermiogenesis on phylogenesis within the Tetraphyllidea. *Wiadomosci Parazytologiczne*, **44** : 600.
- Shi D.Z., Liu D.S., Wang S.K. & Craig P.S. (1994).** The ultrastructure of *Echinococcus multilocularis*. *Chinese Journal of Parasitic Disease Control*, **7** : 40-41.
- Šípková L. (2011).** *Spermatological characters in Bothriocephalidea (Cestoda)*. Master Thesis, Faculty of Science, University of South Bohemia, 51 pp.
- Šípková L., Levron C., Freeman M. & Scholz T. (2010).** Spermiogenesis and spermatozoon of the tapeworm *Parabothriocephalus gracilis* (Bothriocephalidea) : Ultrastructural and cytochemical studies. *Acta Parasitologica*, **55** : 58-65.
- Šípková L., Levron C., Oros M. & Justine J.-L. (2011).** Spermatological characters of bothriocephalideans (Cestoda) inferred from an ultrastructural study on *Oncodiscus sauridae* and *Senga* sp. *Parasitology Research*, **109** : 9-18.
- Sophie Querouil** : http://www.horta.uac.pt/ppl/sophie_querouil/
- Spurr A.R. (1969).** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy of the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Trematoda : Digenea). *Parasitology*, **101** : 395-407.

- Stoitsova S.R., Georgiev B.B. & Dacheva R.B. (1995).** Ultrastructure of spermiogenesis and the mature spermatozoon of *Tetrabothrius erostris* Loennberg, 1896 (Cestoda, Tetrabothriidae). *International Journal for Parasitology*, **25** : 1427-1436.
- Sun C.N. (1972).** The fine structure of sperm tail of cotton rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. *Cytobiologie*, **6** : 382-386.
- Świdorski Z. (1968).** The fine structure of the spermatozoon of sheep tapeworm, *Moniezia expansa* (Rud., 1810) (Cyclophyllidea, Anoplocephalidae). *Zoologia Poloniae*, **18** : 475-486.
- Świdorski Z. (1970).** An electron microscope study of spermatogenesis in cyclophyllidean cestodes with emphasis on the comparison of fine structure of mature spermatozoa. *Journal of Parasitology*, **56** : 337-338.
- Świdorski Z. (1976a).** Fine structure of the spermatozoon of *Lacistorhynchus tenuis* (Cestoda, Trypanorhyncha). *Proceedings of the 6th European Congress on Electron Microscopy*, Jerusalem : 309-310.
- Świdorski Z. (1976b).** Fertilization in the cestode *Hymenolepis diminuta* (Cyclophyllidea, Hymenolepididae). *Proceedings of the 6th European Congress on Electron Microscopy*, Jerusalem : 311-312.
- Świdorski Z. (1984a).** Spermatogenesis in the davaineid cestode *Inermicapsifer madagascariensis*, a parasite of man and rodents : SEM observations. *Proceedings of the Electron Microscopical Society of South Africa, 23th Annual Conference*, Stellenbosch : 129-130.
- Świdorski Z. (1984b).** Ultrastructure of the spermatozoon of the davaineid cestode *Inermicapsifer madagascariensis*. *Proceedings of the Electron Microscopical Society of South Africa, 23th Annual Conference*, Stellenbosch : 131-132.
- Świdorski Z. (1985).** Spermiogenesis in the proteocephalid cestode *Proteocephalus longicollis*. *Proceedings of the Electron Microscopical Society of South Africa, 24th Annual Conference*, Pietermaritzburg : 181-182.
- Świdorski Z. (1986a).** Three types of spermiogenesis in cestodes. *Proceedings of the 11th International Congress of Electron Microscopy*, Kyoto : 2959-2960.
- Świdorski Z. (1986b).** Sperm differentiation, spermatozoon ultrastructure and phylogenetic relationships in the cestodes. *Development, Growth and Differentiation*, **28** : 59-60.
- Świdorski Z. (1994).** Spermiogenesis in the Trypanorhynchid Cestode *Lacistorhynchus tenuis*. *Proceedings of the 13th International Congress on Electron Microscopy*, Paris : 691-692.

- Świdorski Z. (1996).** Fertilization in proteocephalid cestode *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800). *Proceedings of the 11th European Congress on Electron Microscopy*, Dublin : 495-496.
- Świdorski Z. (2001).** Ultrastructure of spermatogenesis and the mature spermatozoon of *Glaridacris catostomi* Cooper, 1920 (Cestoidea : Caryophyllidea). *Proceedings of the 9th International Congress on Invertebrate Reproduction and Development*, Grahamstown : 91.
- Świdorski Z. & Chomicz L. (1994).** An ultrastructure study of the spermatozoa of hymenolepidid cestode *Retinometra guberiana* Czaplinski, 1965. *Proceedings of the 13th International Congress of Electron Microscopy*, Paris : 707-708.
- Świdorski Z. & Eklun-Natey R.D. (1978).** Fine structure of the spermatozoon of *Proteocephalus longicollis* (Cestoda. Proteocephalidea). *Proceedings of the 9th International Congress of Electron Microscopy*, Toronto : 572-573.
- Świdorski Z. & Mackiewicz J.S. (1976).** Fine structure of the spermatozoon of *Glaridacris catostomi* (Cestoidea, Caryophyllidea). *Proceedings of the 6th European Congress of Electron Microscopy*, Jerusalem : 307-308.
- Świdorski Z. & Mackiewicz J.S. (2002).** Ultrastructure of spermatogenesis and spermatozoa of the caryophyllidean cestode *Glaridacris catostomi* Cooper, 1920. *Acta Parasitologica*, **47** : 83-104.
- Świdorski Z. & Mokhtar-Maamouri F. (1980).** Étude de la spermatogénèse de *Bothriocephalus clavibothrium* Ariola, 1899 (Cestoda : Pseudophyllidea). *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, **57** : 323-347.
- Świdorski Z., Salamatin R.V. & Korniyushin V.V. (2002).** Ultrastructure of the spermatozoon of the dilepidide cestode *Kowalewskiella glareola* (Burt, 1940) Lopez-Neyra, 1952. *Proceedings of the 12th Conference of Ukrainian Society of Parasitologists*, Sevastopoul, Crimea : **132**.
- Świdorski Z., Salamatin R.V. & Tkach V.V. (2000).** Electron microscopical study of spermatozoa of the cestode *Dilepis undula* (Cyclophyllidea, Dilepididae). *Vestnik Zoologii*, **34** : 3-7.
- Świdorski Z. & Subilia L. (1985).** Ultrastructure of the spermatozoon of the cestode *Oochoristica agamae* (Cyclophyllidea, Linstowiidae). *Proceedings of the Electron Microscopical Society of South Africa, 24th Annual Conference*, Pietermaritzburg : 185-186.

Świderski, Z.P. & Tkach V.V. (1996a). Ultrastructure of mature spermatozoon in dilepidid cestode *Molluscotaenia crassiscolex* (von Linstow, 1890). *Parassitologia*, **38** : 97.

Świderski Z.P. & Tkach V.V. (1996b). Ultrastructure of the spermatozoon of the cestode *Monorcholepis dujardini* (Cyclophyllidea, Hymenolepididae). *Proceedings of the 6th Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy*, Hong Kong : 507-508.

T

Thiéry J.P. (1967). Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *Journal of Microscopy*, **6** : 987-1018.

Tian X., Yuan L., Huo X., Han X., Li Y., Xu M., Lu M., Dai J. & Dong L. (1998a). Ultrastructural observations on the transformation of the spermatozoon in spermatogenesis of taeniid cestodes. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, **16** : 269-273.

Tian X., Yuan L., Li Y., Huo X., Han X., Xu M., Lu M., Dai J. & Dong L. (1998b). Ultrastructural observation on spermatocytogenesis in taeniid cestode. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, **16** : 209-212.

Torres J., Hidalgo C., Miquel J., Bâ C.T. & Marchand B. (1999). Comparative sperm ultrastructure of two Catenotaeniidae cestodes : *Catenotaenia pusilla* (Catenotaeniinae) and *Skrjabinotaenia lobata* (Skrjabinotaeniinae). *Helminthologia*, **36** : 9.

Twohig M.E., Caira J.N. & Fyler C.A. (2008). Two new cestode species from the dwarf whipray, *Himantura walga* (Batoidea : Dasyatidae), from Borneo, with comments on site and mode of attachment. *Journal of Parasitology*, **94** : 1118-1127.

Tyler G.A. II (2006). *Tapeworms of Elasmobranchs (Part II). A Monograph on the Diphyllidea (Platyhelminthes, Cestoda)*. Bulletin of the University of Nebraska State Museum, vol 20, 152 pp.

V

Valent S. (2010). *Estudi ultraestructural de l'espermatozou del cestode Molluscotaenia crassiscolex (von Linstow, 1890) (Cyclophyllidea, Dilepididae)*. Treball Dirigit de Salut Pública i Sanitat Ambiental I, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, 36 pp.

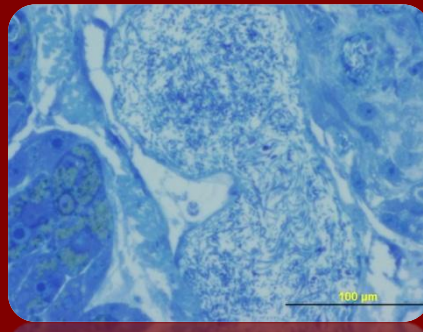
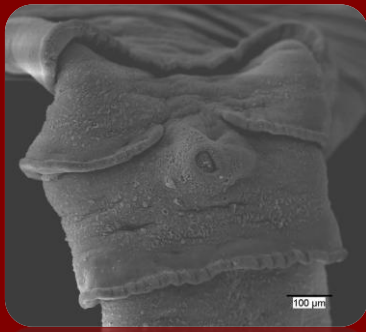
W

- Waeschenbach A., Webster B.L., Bray R.A. & Littlewood D.T.J. (2007).** Added resolution among ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes : Cestoda) with complete small and large subunit nuclear ribosomal RNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **45** : 311-325.
- Wardle R.A. & McLeod J.A. (1952).** *The zoology of tapeworms*. The University of Minnesota Press, Minneapolis, 780 pp.
- Watson N.A. & Rohde K. (1995).** Sperm and spermiogenesis of the « Turbellaria » and implications for the phylogeny of the Phylum Platyhelminthes. Dans : Jamieson B.G., Ausio J., & Justine J.-L. (eds.), *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, **166** : 37-54.
- Weekes P.J. (1987).** *Studies on the biology of some nippotaenid cestodes*. Ph.D. Thesis, Victoria University of Wellington, New Zealand.
- Willms K., Caro J.A. & Robert L. (2003).** Ultrastructure of spermatogonia and spermatocyte lobules in *Taenia solium* strobilae (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) from golden hamsters. *Parasitology Research*, **90** : 479-488.
- Willms K. & Robert L. (2007).** Ultrastructure of a spermatid transport system in the mature proglottids of experimental *Taenia crassiceps* (WFU strain). *Parasitology Research*, **101** : 967-973.
- Willms K., Robert L., Jiménez J.A., Everhart M. & Kuhn R.E. (2004).** Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon in *Taenia crassiceps* strobilae WFU strain (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) from golden hamster. *Parasitology Research*, **93** : 262-267.

Y

- Yoneva A., Georgieva K., Mizinska Y., Georgiev B.B. & Stoitsova S.R. (2006b).** Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Skrjabinoporus merops* (Cyclophyllidea, Metadilepididae). *Acta Parasitologica*, **51** : 200-208.
- Yoneva A., Georgieva K., Mizinska Y., Nikolov P.N., Georgiev B.B. & Stoitsova S.R. (2010).** Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Anonchotaenia globata* (von Linstow, 1879) (Cestoda, Cyclophyllidea, Paruterinidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, **91** : 184-192.

- Yoneva A., Georgieva K., Nikolov P.N., Mizinska Y., Georgiev B.B. & Stoitsova S.R. (2009).** Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Triaenorhina rectangula* (Cestoda : Cyclophyllidea : Paruterinidae). *Folia Parasitologica*, **56** : 275-283.
- Yoneva A., Levron C., Oros M., Orosová M. & Scholz T. (2011).** Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Breviscolex orientalis* (Cestoda : Caryophyllidea). *Parasitology Research*, **108** : 997-1005.
- Yoneva A., Miquel J., Świdorski Z., Georgieva K., Mizinska Y. & Georgiev B.B. (2006a).** Ultrastructure of spermiogenesis and mature spermatozoon of *Angularella beema* (Clerc, 1906) (Cestoda, Cyclophyllidea, Dilepididae). *Acta Parasitologica*, **51** : 264-272.
- Yoneva A., Świdorski Z., Georgieva K., Nikolov P.N., Mizinska Y. & Georgiev B.B. (2008).** Spermiogenesis and sperm ultrastructure of *Valipora mutabilis* Linton, 1927 (Cestoda, Cyclophyllidea, Gryporhynchidae). *Parasitology Research*, **103** : 1397-1405.



Abstract:

The present Thesis constitutes a contribution to the knowledge of ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon of cestodes. New spermatological data concerning species belonging to six orders of Eucestoda are presented. These species are *Clestobothrium crassiceps* (Rudolphi, 1819) (Bothriocephalidea), *Echinobothrium euterpes* (Neifar *et al.*, 2001) (Diphyllidea), *Aporhynchus menezesi* Noever *et al.*, 2010 (Trypanorhyncha), *Acanthobothrium crassicolle* Wedl, 1855 (Tetraphyllidea), *Barsonella lafoni* de Chambrier *et al.*, 2009 (Proteocephalidea), and *Molluscotaenia crassiscolex* (von Linstow, 1890) (Cyclophyllidea). The obtained results on spermiogenesis and the spermatozoon are compared with the available data on the remaining eucestodes, particularly with the orders discussed in the present study. Moreover, the usefulness of different spermatological characters for Taxonomy, Systematics and Phylogeny is discussed.

Key words: Ultrastructure, Spermiogenesis, Spermatozoon, Taxonomy, Systematics, Phylogeny, Platyhelminthes, Eucestoda, Bothriocephalidea, Cyclophyllidea, Diphyllidea, Proteocephalidea, Tetraphyllidea, Trypanorhyncha, *Acanthobothrium crassicolle*, *Aporhynchus menezesi*, *Barsonella lafoni*, *Clestobothrium crassiceps*, *Echinobothrium euterpes*, *Molluscotaenia crassiscolex*.

