

UN TYPE FLAGELLAIRE FONCTIONNEL DE BASE 6 + 0

JOSEPH SCHREVEL et COLETTE BESSE

From the Laboratoire de Zoologie et de Biologie Cellulaire, Service Général de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie, Université de Poitiers, 86022 Poitiers, France

ABSTRACT

The male gamete of the Gregarine *Lecudina tuzetae* has been studied with transmission electron microscopy and microcinematography. It is characterized by a flagellar axoneme of 6 + 0 pattern, a reduction of the chondriome, and the abundance of storage polysaccharide or lipid bodies.

The movements of the flagella are of the undulating type and they are performed in the three dimensions of space. They are very slow, with a cycle time of about 2 s.

The structure of the axoneme components are similar to those of flagella with a 9 + 2 pattern. Each doublet has overall dimensions of $350 \times 220 \text{ \AA}$; the space between the adjacent doublets is about 160 \AA . The A subfiber bears arms like dynein arms. The diameter of the axoneme is about $1,000 \text{ \AA}$. The basal body consists of a cylinder of dense material $2,500 \text{ \AA}$ long and $1,300\text{--}1,400 \text{ \AA}$ in diameter; a microtubule 200 \AA in diameter is present in the axis.

This study shows that a 6 + 0 pattern can generate a flagellar movement. The mechanism of the flagellar movement of the male gamete of *L. tuzetae* does not require the presence of central microtubules and it would include molecular interactions of the dynein-tubulin type between the adjacent peripheric doublets.

The slowness of the movements is discussed in terms of the axoneme's structure and its energy supply. Finally, the phylogenetic significance of this flagella is examined on the basis of the morphopoietic potentialities of the centriolar structures.

L'armature fibrillaire ou axonème des cils et des flagelles présente le caractère structural universel d'être construit sur la base ennéanème (9 doublets périphériques + 2 fibres axiales), aussi la différence entre ces deux organites concerne les mouvements. La flagelle a un mouvement ondulant. Le battement du cil est de type pendulaire, avec un coup actif et un coup de retour ou de repli.

La constance du modèle 9 + 2 a été établie par de nombreux travaux (35, 17, 1, 23) et maintes fois rappelée dans les articles de revues (16, 31, 3, 59, 61, 9). Toutefois des exceptions au schéma 9 + 2 ont été signalées; elles portent, soit sur le nombre de doublets périphériques (48, 2, 12, 39, 47, 43, 8,

65), soit sur le nombre de fibres axiales (57, 2, 58, 13, 36, 11, 26, 40, 28), soit sur la présence de microtubules à l'extérieur des doublets périphériques (2, 39, 47, 40, 18, 7).

Quand une exception au schéma 9 + 2 est signalée, la question la plus importante concerne la motilité ou la non motilité du flagelle ou du cil. Bien que la conservation de la longueur des fibres périphériques démontrée par les travaux de Satir (49, 51), permette de retenir la théorie du glissement des fibres les unes sur les autres et non celle du raccourcissement des fibres, l'origine de la force de glissement n'est pas encore clairement précisée. Cette force de glissement pourrait être engendrée

par l'interaction: (a) soit des fibres périphériques et de la matrice qui les entoure (51); (b) soit des fibres périphériques et des fibres centrales par l'intermédiaire de liens radiaux (68, 70); (c) soit des doublets périphériques adjacents (19-22, 10).

A la suite des travaux de Gibbons (19) il est clairement établi que les tubules A des doublets périphériques portent de petits bras, constitués de dynéine, protéine ayant une forte activité ATPasique. De nombreux arguments indiquent que les bras de dynéine sont impliqués dans le mécanisme qui engendre les mouvements de glissement entre les doublets périphériques (62, 63, 21, 22).

La participation des fibres axiales ou de la gaine centrale au mouvement flagellaire est généralement acceptée (68, 70). L'existence d'un axonème à nombre réduit de doublets périphériques et sans fibres axiales peut être mis en évidence dans les flagelles des gamètes mâles de *Lecudina tuzetae*. L'étude ultrastructurale et physiologique d'un tel flagelle est donc susceptible d'éclairer certains aspects du mécanisme responsable du mouvement flagellaire; elle permet en outre d'aborder la signification phylogénétique des cils et des flagelles.¹

MATERIEL ET METHODES

Obtention des Gamètes

La Grégarine *L. tuzetae* Schr. est un protozoaire parasite intestinal de l'Annélide Polychète *Nereis diversicolor* O. F. Müller. Les Annélides proviennent des stations proches des Laboratoires de Biologie Marine de Wimereux, Roscoff, Luc-sur-Mer, situées sur la côte française de la Manche.

Les kystes de *L. tuzetae*, résultant de l'union d'un gamonte mâle et d'un gamonte femelle, sont prélevés dans les déchets digestifs de l'hôte. Ces kystes sphériques, de 100-120 μm de diamètre, sont placés dans une chambre humide contenant de l'eau de mer additionnée de traces de Pénicilline 100,000 U. L'observation de la gamétogenèse au travers de la paroi kystique transparente s'effectue sans difficulté à l'aide d'un microscope à contraste interférentiel. Chaque gamonte produit plusieurs centaines de gamètes. Les phénomènes de fécondation ou "danse de gamètes" se déclenchent une dizaine d'heures après l'expulsion des kystes dans l'eau de mer; ils durent 2-3 h (52).

¹Ce travail a fait l'objet d'une communication préliminaire au 9ème Colloque de la Société Française de Microscopie Electronique. Dijon, Juin 1973.

Microscopie Electronique

Les kystes, au stade de la "danse de gamètes," sont fixés au glutaraldéhyde 6% dans le tampon phosphate 0.1 M, pH 7.3, à 4°C pendant 12-16 h. Après lavage dans le même tampon additionné de sucrose, la postfixation est effectuée avec du tétraxide d'osmium 2% dans le tampon phosphate 0.1 M, pH 7.3, pendant 1 h.

Les pièces déshydratées à l'acétone sont incluses dans l'Araldite. La présence d'une coque kystique oblige à augmenter les temps d'imprégnation par l'Araldite.

Les coupes, effectuées sur l'ultramicrotome Reichert OMU 2 équipé de couteaux de verre, sont recueillies sur des grilles nues ou couvertes d'un film de Parlodion (Mallinckrodt Chemical Works, St. Louis, Mo.); elles sont contrastées par le citrate de plomb selon Reynolds (44) précédé par un passage rapide dans l'acétate d'uranyle en solution alcoolique.

Les préparations ont été examinées sur un microscope électronique Hitachi HU 11 Cs.

Microcinématographie

Les mouvements du flagelle ont été filmés à l'aide d'un microscope photonique Nachet 300, à contraste interférentiel Nomarski, équipé d'une caméra Arriflex 16 mm. Les prises de vue ont été réalisées à l'objectif à immersion 100, sur des films Kodak Ektachrome type 7242, 125 ASA ou Kodak Plus X négatif 64 ASA (Eastman Kodak Co., Rochester, N. Y.). Les images ont été analysées avec un Analector (De Oude, Delft, Pays-Bas).

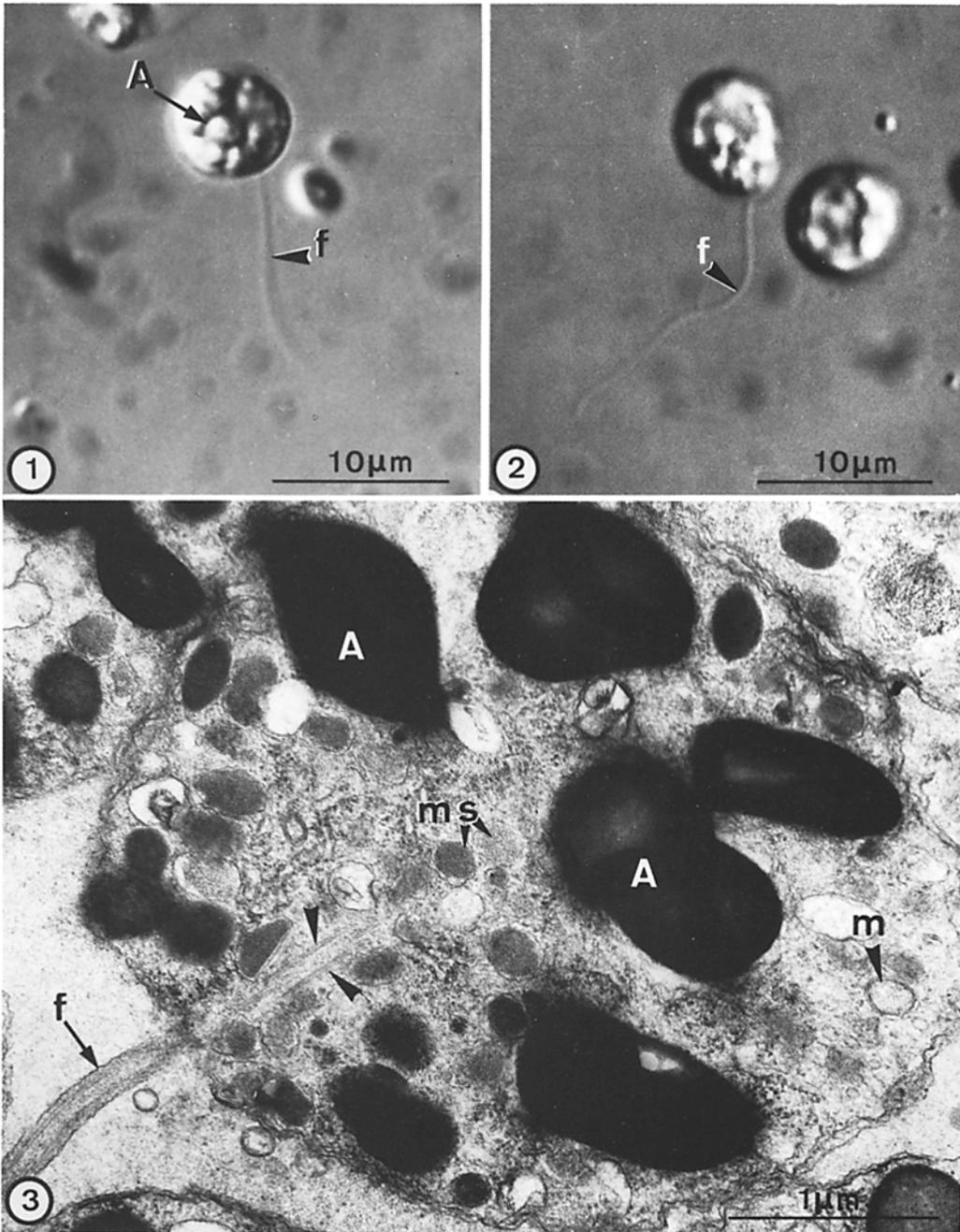
RESULTATS

Morphologie et Structure du Gamète Mâle

Le gamète mâle piriforme mesure de 5-7 μm de longueur pour une largeur de 3-5 μm . Au pôle conique est inséré un long flagelle de 10-12 μm de longueur (Figs. 1 et 2). L'observation in vivo, au microscope photonique, permet de déceler une quinzaine d'inclusions sphériques ou ovoïdes dans le cytoplasme et un cône clair au niveau de l'émergence flagellaire.

Au microscope électronique, les gros grains, opaques après une fixation glutaraldéhyde/osmium et une coloration acétate d'uranyle/plomb, (Fig. 3) correspondent aux inclusions observées précédemment in vivo; ils sont constitués d'amylopectine, polysaccharide de réserve (53, 38).

Les mitochondries sont peu nombreuses et leur membrane interne ne constitue que quelques vésicules ampoulées (Fig. 3). Cette organisation mitochondriale est généralement mise en rapport avec le mode de vie parasitaire de ces Protozoaires (66, 54). L'étude de la zone d'émergence du flagelle montre l'absence de pièce intermédiaire; l'ax-



FIGURES 1-3 Vue d'ensemble du gamète mâle de la Grègarine *Lecudina tuzetae*

FIGURES 1 et 2 Le gamète observé "in vivo", en microscopie à contraste de phase, montre un long flagelle (*f*) et la présence de grosses inclusions cytoplasmiques (*A*). $\times 2,500$.

FIGURE 3 Coupe d'un gamète, examinée en microscopie électronique par transmission. Les inclusions cytoplasmiques, observées in vivo, correspondent à l'amylopectine (*A*), polysaccharide de réserve. Noter la pénétration de l'axonème flagellaire (*f*) dans le cytoplasme (flèches). Les structures mitochondriales (*m*), pauvres en crêtes ou ampoules internes, sont rares. Mucosubstances *ms*. $\times 30,000$.

onème n'est pas entouré par un réseau ou manchon mitochondrial (Fig. 3).

Des vésicules plus petites (Fig. 3), mesurant $0.3 \mu\text{m}$ sur $0.2 \mu\text{m}$, d'aspect floconneux, sont constituées en partie de mucosubstances (55).

L'enveloppe nucléaire présente peu ou pas de pores; quelques amas de chromatine peuvent être observés dans un nucléoplasme peu dense.

Ultrastructure du Flagelle

Le flagelle libre a un diamètre de $0.15\text{--}0.18 \mu\text{m}$ valeur voisine de celle rencontrée dans la majorité des cils et des flagelles ($0.20 \mu\text{m}$, voir 3) et comprise dans l'échelle de $0.15\text{--}0.25 \mu\text{m}$ donnée par Manton (34) ou par Sleigh (59).

En coupe transversale, le flagelle montre de l'extérieur vers l'intérieur: (a) la membrane flagellaire correspondant à la membrane plasmique, de type unitaire, épaisse de 100Å (Figs. 4 et 5); (b) six doublets périphériques (Fig. 5). Chaque doublet mesure 350Å de long sur 220Å de large. La distance entre la membrane plasmique et les doublets périphériques est de l'ordre de 150Å : chaque doublet est séparé de son voisin par un espace compris entre 120 et 160Å .

Par analogie avec la terminologie de Gibbons et Grimstone (23), le microtubule le plus central d'un doublet peut être désigné par le terme de sous-fibre A, le plus périphérique par sous-fibre B. Le diamètre de la sous-fibre A est de 220Å environ. Les deux microtubules de chaque doublet ont une cloison commune de 50Å d'épaisseur.

De petits bras de 120Å de longueur sur les sous-fibres A et des liens entre le tubule A d'un doublet et le tubule B du doublet suivant peuvent être observés (Fig. 5). De telles structures rappellent les bras de dynéine et les liens de nexine dont les caractéristiques ultrastructurales et physiologiques ont été particulièrement étudiées par Gibbons (19), Gibbons et Rowe (24), Grimstone et Klug (25), et Summers et Gibbons (63).

La structure des doublets périphériques du gamète de *L. tuzetae* est donc absolument comparable à celle des doublets des cils et des flagelles de base $9 + 2$ (23, 6, 16, 5).

Les six doublets sont circonscrits par un cercle de $1,050 \text{Å}$ de diamètre; dans le cas des flagelles à base $9 + 2$, ce cercle atteint généralement une valeur supérieure de l'ordre de $1,400 \text{Å}$ (6), $2,100 \text{Å}$ (68), $1,600 \text{Å}$ (45, 9), et $2,000 \text{Å}$ (56).

Aucune fibre axiale n'est observée ni sur les coupes transversales (Figs. 5 et 6) ni sur les coupes longitudinales (Fig. 4). Un examen précis de la

matrice flagellaire, permet l'observation de petites structures en position soit perpendiculaire, soit parallèle à l'axonème (Fig. 4). Ces structures, sans être comparables aux liens radiaux décrits par Warner (68), et Warner et Satir (70), pourraient suggérer néanmoins une structuration de la matrice flagellaire.

La structure $6 + 0$ ne correspond pas qu'aux coupes effectuées à l'extrémité distale d'un flagelle. En effet, l'armature fibrillaire du flagelle s'enfonce profondément dans le cytoplasme du gamète et s'insère en général dans une gouttière cytoplasmique délimitée par l'enveloppe nucléaire. Même les sections transversales réalisées à ce niveau montrent une structure $6 + 0$ identique à celle du flagelle libre (Fig. 9).

Une image avec 5 doublets périphériques + 1 microtubule périphérique a été observée (Fig. 6). Une telle section pourrait correspondre à l'extrémité distale du flagelle. Toutefois, il convient de remarquer que des sections transversales de type $5 + 0$ peuvent exister aussi bien au niveau du flagelle libre que dans la gouttière cytoplasmique délimitée par le noyau.

La Racine Flagellaire

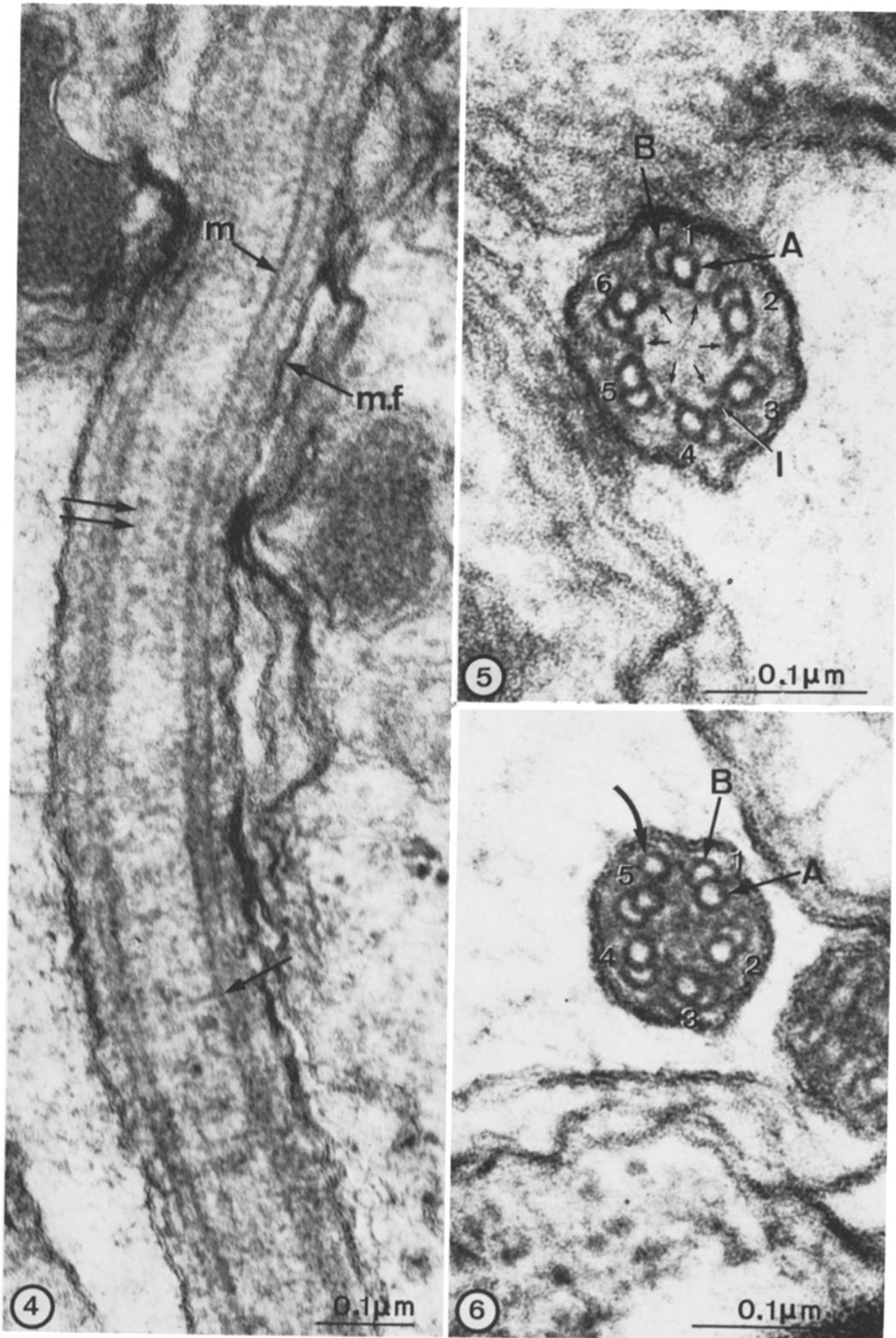
La relation entre un flagelle $6 + 0$ et une formation centriolaire constitue sans doute le point le plus important pour la compréhension de la genèse du flagelle.

L'examen de nombreuses coupes a permis d'obtenir plusieurs clichés correspondant à une racine flagellaire.

La coupe longitudinale d'un flagelle situé dans la gouttière cytoplasmique juxtanucléaire montre que l'extrémité proximale est en relation avec une formation dense, amorphe, mesurant $0.25 \mu\text{m}$ de longueur et toujours disposée dans la région antérieure du noyau (Fig. 7). En coupe transversale cette formation se présente sous la forme d'un anneau dense de $350\text{--}400 \text{Å}$ d'épaisseur dont le diamètre externe est de $1,300\text{--}1,400 \text{Å}$ et le diamètre interne de 600Å (Figs. 8 et 10). A l'intérieur de l'anneau, il est possible de distinguer plusieurs plages claires de 110Å (Figs. 8 et 10). Ces plages, réparties assez régulièrement sur un cercle de $1,100 \text{Å}$ de diamètre, pourraient correspondre à la lumière claire de microtubules. Leur nombre précis n'a pu être déterminé avec certitude.

La coupe transversale de la racine flagellaire montre la présence d'un microtubule de 200Å de diamètre avec une lumière de 100Å (Figs. 8 et 10).

La racine flagellaire du gamète mâle de *L.*



tuzetae n'est donc pas constituée par un centriole classique à 9 triplets. Elle correspond à un cylindre de matériel dense plus ou moins amorphe de 0,25 μm de longueur pour un diamètre de 1,300–1,400 Å, dont l'axe serait parcouru par un microtubule de 200 Å de diamètre. Une telle organisation n'est pas sans rappeler le centriole d'*Eimeria necatrix* décrit par Dubremetz (14); ce centriole de 1,000 Å de longueur et 1,400 Å de diamètre est constitué de 9 singlets périphériques de 200 Å et d'un tubule axial de 250 Å.

Origine de la Racine Flagellaire

L'origine de la racine flagellaire assimilable à un "centriole" simplifié est à rechercher dans l'évolution des centres cinétiques situés au sommet des fuseaux mitotiques.

Les noyaux des gamontes de *Lecudina* se divisent selon un mécanisme différent de l'orthomitose classique. L'enveloppe nucléaire persiste au cours de la mitose (Fig. 11). Selon le stade de la mitose, les noyaux sphériques présentent une ou deux dépressions, dans lesquelles s'insère la base d'un faisceau conique de microtubules cytoplasmiques encore appelé centrocone (Fig. 11). Ces caractères retrouvés chez plusieurs Grégarines (voir 67), définissent le type "cryptoorthomitose à centres extranucléaires" proposé par Hollande (29).

L'examen minutieux des sommets des centrocones (Figs. 11 et 12) montre la présence d'un anneau de matériel dense correspondant aux structures appelées centres cinétiques (29), centres de type non structuré (37, p. 117), plaques centriolaires (46, 32, 4), morphoplasme (30), matrices nématopoiétiques (15), et centres de nucléation (64). Ainsi la mitose de *L. tuzetae* ne met pas en jeu des structures centriolaires caractéristiques, comme dans le cas de nombreuses divisions de

cellules animales (voir 27, 33), mais des centres cinétiques.

Les Figs. 13–15 suggèrent une relation entre la racine flagellaire et le centre cinétique situé au sommet d'un centrocone. La racine flagellaire pourrait définir le pôle antérieur du noyau; elle servirait de centre d'initiation de la polymérisation des tubulines flagellaires. Au cours de sa croissance, le flagelle se rabattrait vers la région postérieure du gamète comme semblent l'indiquer les Figs. 15 et 16. La mise en place du flagelle dans la gouttière cytoplasmique juxtaposée serait un phénomène secondaire.

Analyse Microcinématographique du Mouvement Flagellaire du Gamète de *L. tuzetae*.

Les mouvements du flagelle, étudiés par microcinématographie sur des gamètes libres obtenus par écrasement d'un kyste, sont de type ondulant. Les mouvements ne s'effectuent pas dans un plan, mais dans les trois dimensions de l'espace.

Les mouvements du flagelle sont lents; la durée de chaque battement est de l'ordre de 2 s. La Fig. 17 résume différentes positions prises par le flagelle au cours d'un cycle.

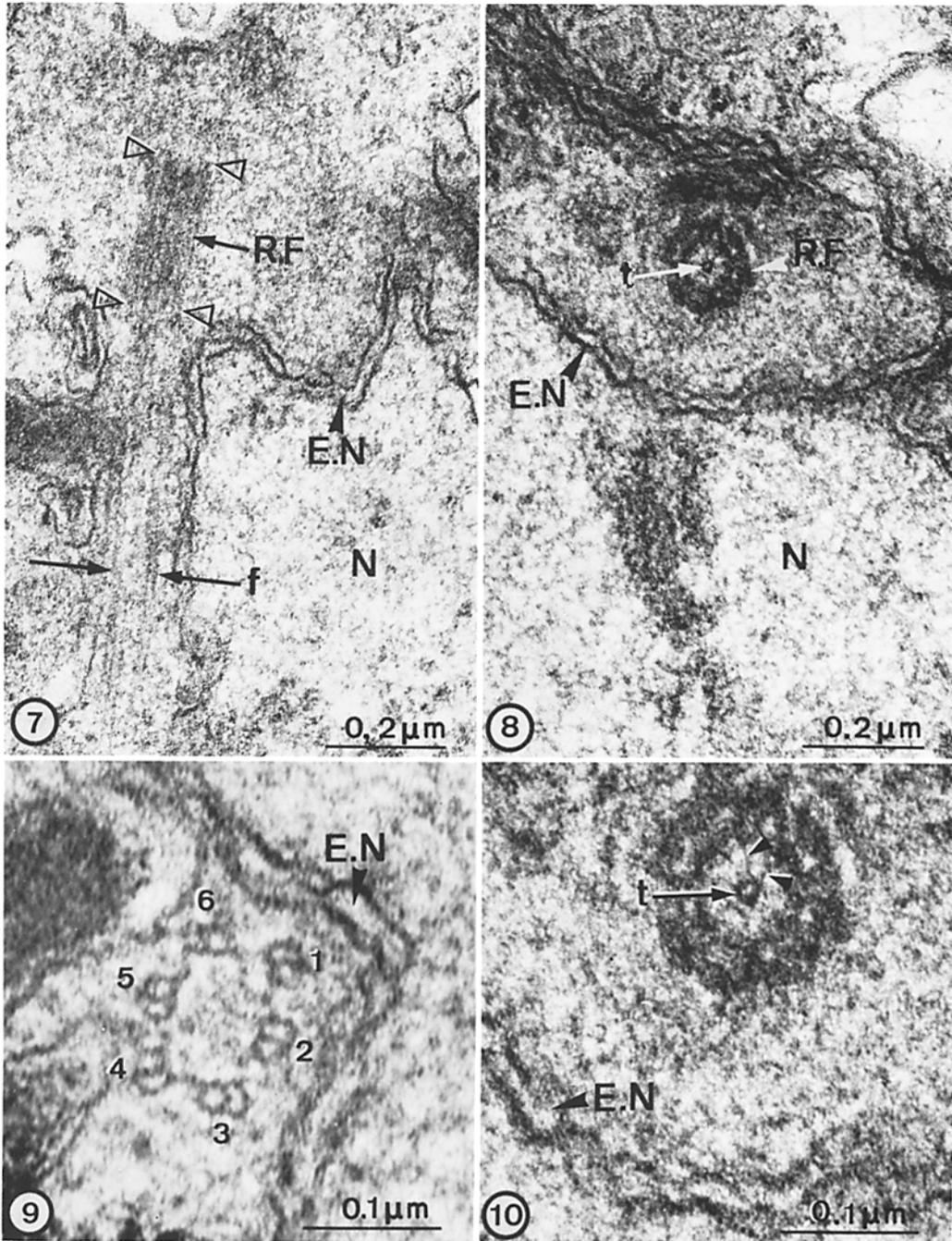
Le mouvement flagellaire provoque le basculement du gamète; la progression vers l'avant est faible, inférieure à 0,6 μm par cycle de battement. Cette faible progression, liée vraisemblablement au volume élevé de la cellule par rapport aux dimensions du flagelle, pourrait indiquer que la propagation de l'onde s'effectue de la base du flagelle vers le sommet. Toutefois, la possibilité d'un mouvement d'oscillation du gamète, sans locomotion véritable, ne peut être écartée; dans ce cas, le centre de gravité situé sur l'axe du gamète

FIGURES 4–6 Organisation de l'axonème flagellaire du gamète mâle de *Lecudina tuzetae*

FIGURE 4 Coupe longitudinale passant par deux doublets, diamétralement opposés. Aucune fibre axiale n'est observée. Des petites structures, en position perpendiculaire (flèche) ou parallèle (double flèche) à l'axonème pourraient suggérer une structuration de la matrice flagellaire. Remarquer la structure unitaire de la membrane flagellaire (*m.f*) et la coupe longitudinale d'un microtubule (*m*). $\times 150,00$.

FIGURE 5 Coupe transversale du flagelle. L'axonème 6 + 0 est constitué par des doublets périphériques caractéristiques. Le microtubule le plus central est appelé sous-fibre A, le microtubule périphérique sous-fibre B. Les microtubules A semblent porter de petits bras (flèches). Un lien (1) peut être observé entre le tubule A du doublet 3 et le tubule B du doublet 4. Aucune fibre axiale ne peut être décelée. $\times 250,000$.

FIGURE 6 Section montrant une structure intermédiaire de 5 doublets plus un microtubule (flèche). Cette section pourrait correspondre à la partie terminale du flagelle. A, sous-fibre A; B, sous-fibre B. $\times 250,000$.



pourrait correspondre à la position de la racine flagellaire.

Le brassage des gamètes ou "danse des gamètes" s'effectue à l'intérieur du kyste; il est assuré par le liquide du copularium qui se déplace sous l'action des battements flagellaires. La "danse des gamètes" dure 2-3 h.

DISCUSSION

L'organisation ultrastructurale du gamète mâle, résumée dans la Fig. 18, montre plusieurs caractères originaux: axonème de base 6 + 0, abondance des réserves glucidiques et lipidiques, réduction du chondriome.

L'existence d'un axonème flagellaire de base 6 + 0 est probablement la plus singulière des exceptions au schéma 9 + 2. L'étude du mouvement engendré par un tel flagelle est de nature à préciser les relations structure-fonctions de l'axonème flagellaire; de plus, la genèse de ce flagelle pose le problème des propriétés morphopoïétiques des structures centriolaires.

*Le Mouvement et l'Axonème Flagellaire du Gamète Mâle de *L. tuzetae**

L'analyse microcinématographique démontre que le mouvement flagellaire de type ondulant s'effectue dans les trois dimensions de l'espace. Le rythme de battement est très lent: un battement toutes les 2 s. Cette fréquence s'écarte considérablement des fréquences de mouvements flagellaires comprises entre 6 et 70 cycles/s (31) ou des fréquences des mouvements ciliaires, comprises

entre 4 et 33 cycles/s (60). Toutefois elle est suffisante pour provoquer la mise en mouvement du liquide contenu dans l'enceinte du kyste. Le mouvement du liquide intrakystique joue certainement un rôle déterminant dans le brassage des gamètes puisque la progression de ces derniers est faible.

Les dimensions du flagelle étudié (10-12 μm \times 0.15-0.18 μm) n'ont pas un caractère exceptionnel par rapport aux flagelles et aux cils normaux. Les valeurs rapportées par Sleigh (59, p. 14 et p. 16), montrent que si certains flagelles atteignent 100 μm de longueur, d'autres mesurent 10-12 μm (cils de *Paramecium*), 3-4 μm (flagelle de *Chromulina pusilla*), et 5 μm (cils de la trachée du rat). Quant au diamètre externe du flagelle, sa valeur (0.15-0.18 μm) est, comme nous l'avons signalé précédemment, proche de la valeur moyenne 0.20 μm des cils et flagelles. En réalité, le caractère important concerne le diamètre de l'axonème. Ce diamètre est de 1,000-1,100 Å; il est égal à la moitié de l'axonème des flagelles et cils de base 9 + 2.

Dans les flagelles de base 9 + 2, les deux doublets adjacents sont séparés par un espace de 180 Å environ (69). La valeur observée dans le flagelle étudié est du même ordre de grandeur. De même, chaque doublet périphérique du gamète mâle de *L. tuzetae* mesure 350 Å \times 220 Å, valeurs identiques à celles des doublets périphériques des cils et flagelles normaux. Le calcul théorique du diamètre d'une circonférence formée par les six doublets de 350 Å et les six intervalles de 180 Å donne une valeur de 1,000 Å, c'est-à-dire la valeur mesurée sur nos photographies. La conséquence du

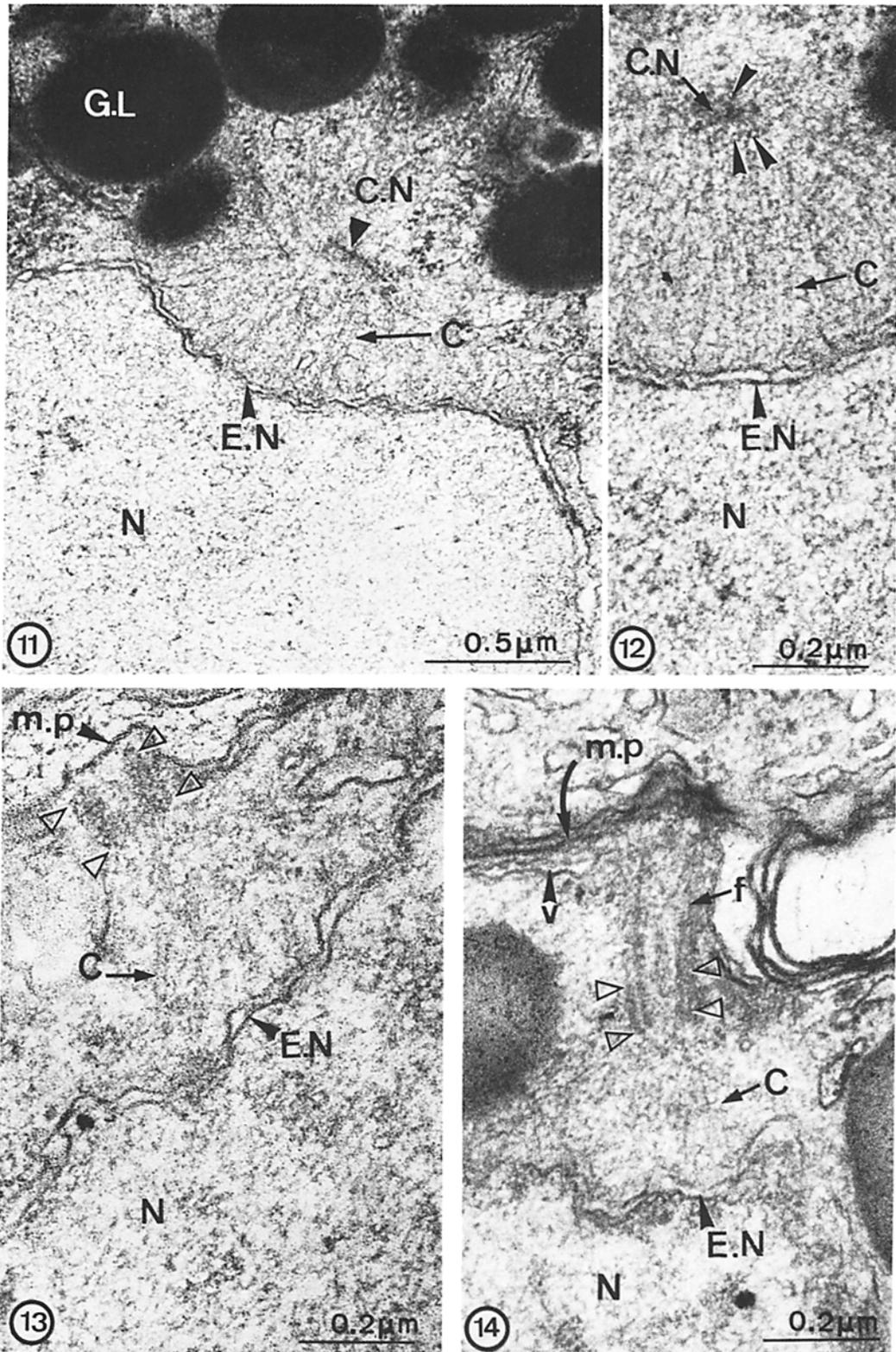
FIGURES 7-10 Structure de la racine flagellaire et du flagelle intracytoplasmique.

FIGURE 7 La racine flagellaire (*R.F.*), délimitée par les triangles, se présente en coupe longitudinale comme une formation dense mesurant 0.25 μm de longueur. Elle est toujours située dans la région antérieure du noyau (*N.*). L'axonème flagellaire (*f*) longe l'enveloppe nucléaire (*E.N.*) \times 90,000.

FIGURE 8 Coupe transversale de la racine flagellaire (*R.F.*). Dans l'anneau de matériel dense, il est possible de distinguer des sections claires. Un microtubule (*t*) occupe l'axe de la racine flagellaire. De fines liaisons relient le microtubule à l'anneau. *E.N.* enveloppe nucléaire; *N.* nucléoplasme. \times 90,000.

FIGURE 9 Section transversale de l'axonème flagellaire intracytoplasmique. Le flagelle est généralement situé dans une gouttière cytoplasmique délimitée par le noyau. La structure 6 + 0 de l'axonème est retrouvée indiquant la réalité de cette organisation. *E.N.* enveloppe nucléaire. \times 200,000.

FIGURE 10 Agrandissement de la figure 8 permettant d'observer nettement le microtubule axial (*t*) et les liens (pointes de flèche) entre le microtubule et l'anneau. \times 200,000.



faible diamètre de l'axonème étudié (0.10 μm) est de diminuer de moitié le glissement des doublets périphériques estimé par la relation établie par Satir (50), $\Delta l = (2\pi d\alpha)/360$ où d représente le diamètre de l'axonème, α étant l'angle de l'arc. Dans le cas d'un flagelle 9 + 2, pour un arc localisé au point d'origine (c'est-à-dire près de la racine flagellaire) ayant un angle de 51° pour un rayon minimum de courbure de 1.97 μm , le Δl est égal à 1.78 μm . Dans les mêmes conditions, le Δl calculé pour le flagelle 6 + 0 des gamètes mâles de *L. tuzetae* est de 0.89 μm .

Ainsi, les caractéristiques du flagelle du gamète mâle de *L. tuzetae* tant sur le plan du mouvement que sur le plan de la structure des composants de l'axonème, rappellent incontestablement celles des flagelles normaux; le mécanisme du mouvement de ce flagelle peut être recherché parmi les hypothèses retenues pour les cils et les flagelles constitués par un axonème classique 9 + 2.

Mécanisme du Mouvement Flagellaire du Gamète de *L. tuzetae*

L'ultrastructure du flagelle étudié montre que les fibres axiales ne sont pas nécessaires pour engendrer un mouvement ondulant. Ce résultat est intéressant car la participation des fibres axiales dans le mécanisme des mouvements flagellaires fait l'objet de situations contradictoires.

Les études expérimentales de Randall et coll. (42) et de Warr et coll. (71), démontrent que des mutants non motiles de *Chlamydomonas*, présentent un flagelle de structure anormale où les fibres

centrales sont absentes ou altérées. Toutefois, les flagelles de base 9 + 0 du spermatozoïde du ver *Myzostomum* (2), du gamète mâle de la Grégarine *Stylocephalus* (13) et du spermatozoïde du Turbellarié *Childia* (11) sont motiles. Costello (10) propose d'ailleurs une hypothèse sur la motilité de l'axonème 9 + 0 où une impulsion issue de la plaque basale produirait des vagues de courbure des doublets périphériques selon un ordre séquentiel. Les flagelles de base "12 + 0"; "14 + 0" des spermatozoïdes de *Protura* (8) sont immobiles l'axonème étant interprété comme un cytosquelette. De même le gamète mâle de l'*Eimeria* parasite de *Cypridopsis* sp., de base 8 + 0, est interprété comme non motile (43). Par contre, les spermatozoïdes de *Sciara* constitués de 70 doublets sont motiles mais incapables de contorsions complexes (39).

L'étude du gamète mâle de *L. tuzetae* démontre qu'un mouvement flagellaire ondulant peut être engendré par un axonème réduit à six doublets périphériques.

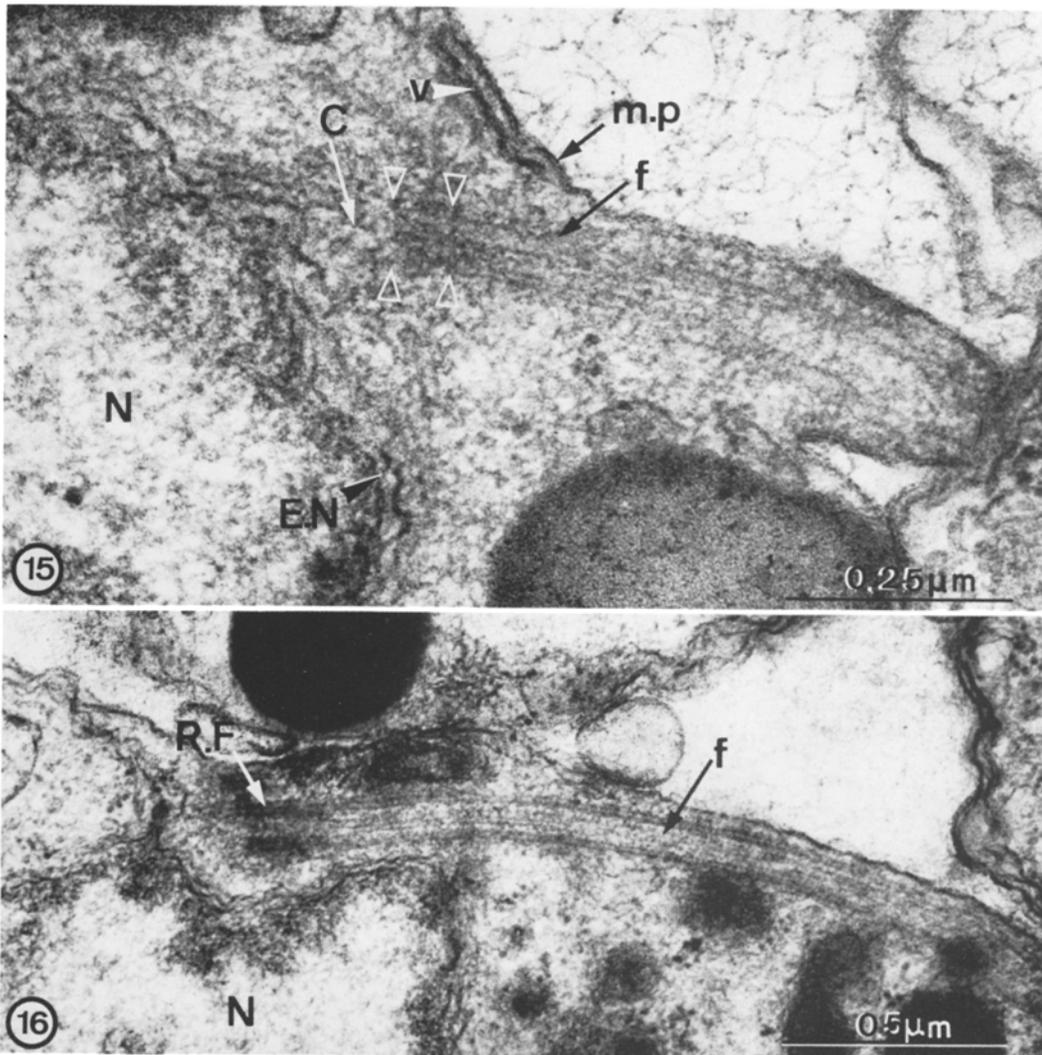
La force impliquée dans le mouvement flagellaire du gamète mâle de *Lecudina* semble liée à des interactions entre les fibres périphériques essentiellement. Certaines densifications situées dans la matrice et en relation avec les fibres périphériques sont observables mais leur interprétation comme des liens radiaux comparables à ceux décrits par Warner (68), et Warner et Satir (70), ne peut être avancée car aucune périodicité n'a pu être établie et leurs connections à une gaine axiale (par l'existence de liaisons transitoires) ne peuvent être envisagées d'après nos photographies.

FIGURES 11-14 Centres cinétiques et racine flagellaire.

FIGURE 11 Lors de la mitose programique de *L. tuzetae*, l'enveloppe nucléaire (*E.N*) persiste. Elle présente deux dépressions, diamétralement opposées où s'insère un faisceau conique de microtubules appelé centrocône (*C*). Le sommet du centrocône est occupé par un centre cinétique (*C.N*). *G.L*, globule lipidique; *N*, nucléoplasme. $\times 45,000$.

FIGURE 12 Centre cinétique (*C.N*) situé au sommet d'un centrocône (*C*). Le centre cinétique s'apparente aux centres du type plaque centriolaire ou centres non structurés: aucun centriole caractéristique ne peut être observé. Au niveau du centre cinétique, il est possible d'observer des sections de microtubules (flèches). *E.N*, enveloppe nucléaire; *N*, nucléoplasme. $\times 90,000$.

FIGURES 13 et 14 Relations entre les centrocônes mitotiques (*C*) et la base du flagelle. Ces images suggèrent une relation directe entre centre cinétique et racine flagellaire délimitée par les triangles. *E.N*, enveloppe nucléaire; *N*, nucléoplasme; *m.p*, membrane plasmique; *v*, vésicule doublant la membrane plasmique; *f*, axonème flagellaire. $\times 90,000$.



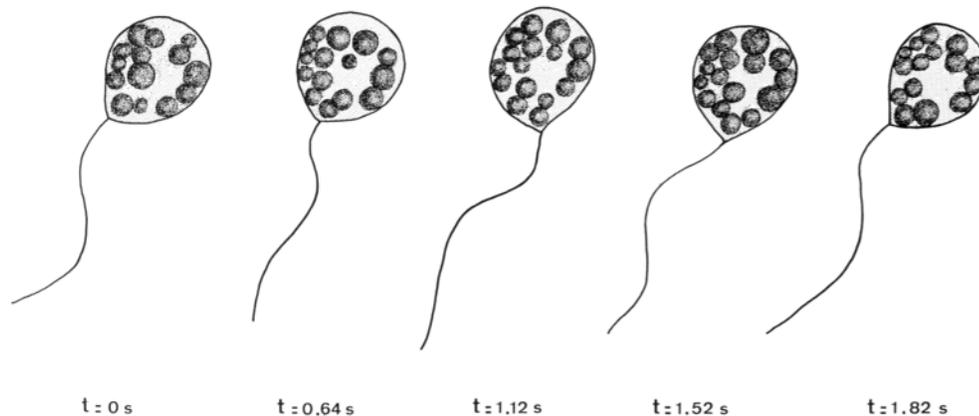
FIGURES 15 et 16 Photographies suggérant la croissance du flagelle

FIGURE 15 La croissance du flagelle (*f*) se ferait à partir de la racine (délimitée par les triangles) et entraînerait la membrane plasmique (*m.p.*). La relation centrocyône (*C*) et racine flagellaire peut être à nouveau constatée. *E.N.*, enveloppe nucléaire; *N*, nucléoplasme; *v*, vésicule doublant la membrane plasmique. $\times 120,000$.

FIGURE 16 Au cours de sa croissance, l'axonème flagellaire (*f*) se rabat en position postérieure; la racine flagellaire (*R.F.*) occupe toujours une dépression de l'extrémité antérieure du noyau (*N*). $\times 60,000$.

La distance entre les doublets périphériques et l'existence de petits bras sur les tubules A de l'axonème du gamète mâle de *L. tuzetae* sont en faveur d'une interaction de type dynéine-tubuline, selon les données de Gibbons et collaborateurs (19-22, 62, 63).

La lenteur du mouvement flagellaire pourrait s'expliquer par la structure même de l'axonème. L'extraction des bras de dynéine par le KCl provoque une diminution de 50% de la fréquence des battements flagellaires des spermatozoïdes d'oursin tandis que le mouvement ondulant reste



17

FIGURE 17 Schéma d'un battement flagellaire d'après un enregistrement microcinématographique. Remarquer la lenteur du cycle de battement. t = le temps.

pratiquement inchangé (21). Ainsi la vitesse de glissement des microtubules est proportionnelle au nombre de bras de dynéine. La présence de 6 doublets périphériques chez le gamète étudié, permettrait de supposer que le nombre de bras de dynéine, moins important que celui des flagelles normaux à 9 doublets, serait responsable du rythme plus lent observé.

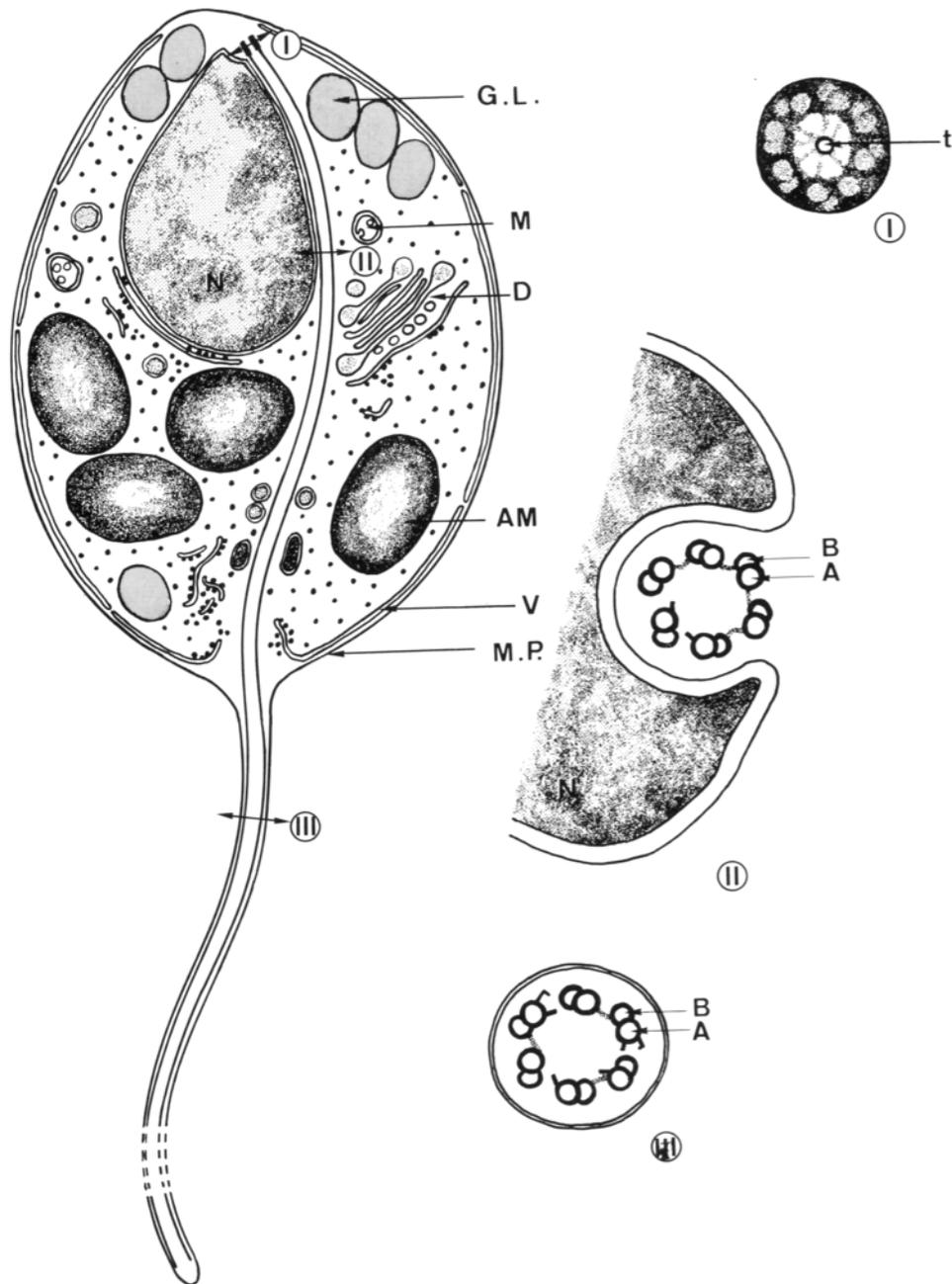
L'origine de l'énergie nécessaire au mouvement flagellaire pourrait intervenir sur la fréquence, toutefois cet aspect est discutable. Le nucléotide nécessaire au glissement des microtubules, dans les flagelles de spermatozoïde d'oursin, est l'ATP dont l'apport s'effectue par diffusion de l'ATP produit par le chondriome (22). Il existe généralement une bonne corrélation entre l'activité du système de motilité cellulaire et le développement du chondriome. Le gamète mâle de *L. tuzetae* présente un chondriome réduit à quelques mitochondries pauvres en structures internes; par contre les réserves glucidiques représentées par les grains d'amylopectine et les globules lipidiques sont importantes. Dans une telle cellule, la production d'ATP pourrait s'effectuer pour une part essentielle par la dégradation de l'amylopectine selon un processus glycolytique et pour une part accessoire sinon nulle, par oxydation phosphorylative au niveau mitochondrial. Le premier mécanisme semble vraisemblable. En effet chez la

Grégarine, *Gregarina blaberae*, au stade végétatif, l'organisation du cytoplasme rappelle la situation rencontrée chez le gamète mâle de *L. tuzetae*: absence de mitochondries, et abondance des réserves glucidiques et lipidiques. Or, chez *G. blaberae* une forte activité lactico-déshydrogénasique a été détectée, aucune activité succinodéshydrogénasique ou monoamine oxydasique n'a été enregistrée (R. Cottin et J. Schrével, en cours). Toutefois l'existence d'un système glycolytique dans les conditions anaérobies ne constitue pas pour autant l'explication indiscutable de la faible fréquence des mouvements flagellaires du gamète mâle de *L. tuzetae*.

Signification d'un Axonème Fonctionnel de Base 6 + 0

Parmi les hypothèses permettant d'envisager l'origine d'un modèle de base 6 + 0, seules celles faisant intervenir les propriétés morphopoiétiques des structures centriolaires méritent d'être retenues.

L'organisation caractéristique 9 + 2 des cils et flagelles moteurs et celle des centrioles à 9 triplets sont apparues très tôt dans l'évolution des cellules eucaryotes puisque les Phytoflagellés, notamment les *Chlamydomonas*, possèdent ces types d'organisation structurale. Si ces modèles se retrouvent



18

FIGURE 18 Reconstitution du gamète mâle de *Lecudina tuzetae*. Section I: au niveau de la racine flagellaire; Section II: au niveau de la gouttière cytoplasmique délimitée par l'enveloppe nucléaire; Section III: au niveau de l'axonème libre. Remarquer la structure 6 + 0 de l'axonème aux niveaux II et III. Chaque doublet présente une sous-fibre A et une sous-fibre B. Entre les doublets, il existe des liaisons. La sous-fibre A possède de petits bras. AM, amylopectine; D, dictyosome; G.L., globule lipidique; M, mitochondrie; M.P., membrane plasmique; N, noyau; t, microtubule; V, vésicule doublant la membrane plasmique.

dans tous les groupes d'animaux, il est possible d'admettre que leur sélection pourrait être liée à une plus grande efficacité. Dans le modèle exceptionnel de base 6 + 0 du gamète mâle de *L. tuzetae*, deux hypothèses peuvent être avancées.

Première hypothèse: Le flagelle du gamète mâle de *L. tuzetae* résulterait de l'évolution régressive d'un modèle de base 9 (modèle ennéanème).

Deuxième hypothèse: Le flagelle du gamète mâle de *L. tuzetae* résulterait de l'évolution d'un centre cinétique ou matrice nématopœïétique.

La genèse du flagelle du gamète mâle de *L. tuzetae* à partir d'un centre cinétique ou matrice nématopœïétique, c'est-à-dire d'un centre intracytoplasmique, de nature protéique, impliqué dans les processus de structuration microtubulaire (15), poserait le problème de l'expression des potentialités morphopœïétiques des structures centriolaires ou des centres cinétiques. Ainsi les centrioles classiques à 9 triplets induiraient les 9 doublets périphériques dans le modèle 9 + 2, tandis que les centres cinétiques moins structurés induiraient des flagelles plus simples avec un nombre variable de doublets, par exemple: 6 + 0 ou 5 + 0 chez le gamète mâle de *L. tuzetae*, ou 3 doublets chez le gamète mâle de *Diplauxis hatti* (41) et peut-être 8 + 0 chez le gamète d'*Eimeria* parasite d'Ostracode (43).

Ce travail a bénéficié de l'aide du Centre National de la Recherche Scientifique (A.T.P. Différenciation Cellulaire 4302). Nous tenons à remercier le Service du Film de Recherche Scientifique pour sa participation matérielle et Monsieur Glénat pour les enregistrements microcinématographiques. Nos remerciements vont également à Mesdames E. Caigneaux, F. Chevalier, D. Thévenet, Mademoiselle D. Decourt, et Monsieur E. Blanchard pour leur aide efficace et amicale

Received for publication 11 February 1975, and in revised form 8 May 1975.

REFERENCES

1. AFZELIUS, B. A. 1959. Electron microscopy of the sperm tail. Results obtained with a new fixative. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**:269-279.
2. AFZELIUS, B. A. 1963. Cilia and flagella that do not conform to the 9 + 2 pattern. I. Aberrant members within normal population. *J. Ultrastruct. Res.* **9**:381-392.
- AFZELIUS, B. A. 1969. Ultrastructure of cilia and flagella. *Handbook of Molecular Cytology*. A. Lima-de-Faria, éditeur. North-Holland Publishing Co., Amsterdam. 1220-1242.
4. AIKAWA, M., et R. L. BEAUDOIN. 1968. Studies on nuclear division of a malarial parasite under pyrimethamine treatment. *J. Cell Biol.* **39**:749-754.
5. ALLEN, R. D. 1968. A reinvestigation of cross-sections of cilia. *J. Cell Biol.* **37**:825-831.
6. ANDRE, J. 1961. Sur quelques détails nouvellement connus de l'ultrastructure des organites vibratiles. *J. Ultrastruct. Res.* **5**:86-108.
7. BACCETTI, B., et R. DALLAI. 1973. The spermatozoon of Arthropoda. XXI. New accessory tubule patterns in the sperm tail of *Diplura*. *J. Microsc. (Paris)*. **16**:341-344.
8. BACCETTI, B., R. DALLAI, et B. FRATELLO. 1973. The spermatozoon of Arthropoda. XXII. The "12 + 0", "14 + 0" or a flagellate sperm of *Protura*. *J. Cell Sci.* **13**:321-336.
9. BLUM, J. J., et J. LUBLINER. 1973. Biophysics of flagellar motility. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **2**:181-219.
10. COSTELLO, D. P. 1973. A new theory on the mechanics of ciliary and flagellar motility. II. Theoretical considerations. *Biol. Bull. (Woods Hole)*. **145**:292-309.
11. COSTELLO, D. P., C. HENLEY, et C. R. AULT. 1969. Microtubules in spermatozoa of *Chilidia* (Turbellaria, Acoela) revealed by negative staining. *Science (Wash. D. C.)*. **163**:678-679.
12. DAHL, H. A. 1963. Fine structure of cilia in rat cerebral cortex. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **60**:369-386.
13. DESPORTES, I. 1966. L'ultrastructure du gamète mâle de l'Eugrègarine *Stylocephalus longicollis*. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **263**:517-520.
14. DUBREMETZ, J. F. 1971. L'ultrastructure du centriole et du centrocône chez la Coccidie *Eimeria necatrix*. Etude au cours de la schizogonie. *J. Microsc. (Paris)*. **12**:453-458.
15. FAURE-FREMIET, E. 1970. Microtubules et mécanismes morphopœïétiques. *Année Biol.* **9**:1-61.
16. FAWCETT, D. W. 1961. Cilia and flagella. *Dans The Cell*. J. Brachet et A. E. Mirsky, éditeurs. Academic Press, Inc., New York. **2**:217-297.
17. FAWCETT, D. W., et K. R. PORTER. 1954. A study of the fine structure of ciliated epithelia. *J. Morphol.* **94**:221-283.
18. FOLLIOU, R. 1970. Evolution des structures caudales terminales des spermatozoïdes de divers insectes Homoptères. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **271**:508-511.
19. GIBBONS, I. R. 1965. Chemical dissection of cilia. *Arch. Biol.* **76**:317-352.
20. GIBBONS, B. H., et I. R. GIBBONS. 1972. Flagellar movement and adenosine triphosphatase activity in sea urchin sperm extracted with triton X-100. *J. Cell Biol.* **54**:75-97.
21. GIBBONS, B. H., et I. R. GIBBONS. 1973. The effect of partial extraction of dynein arms on the movement

- of reactivated sea-urchin sperm. *J. Cell Sci.* **13**:337-358.
22. GIBBONS, B. H., et I. R. GIBBONS. 1974. Properties of flagellar "rigor waves" formed by abrupt removal of adenosine triphosphate from actively swimming sea urchin sperm. *J. Cell Biol.* **63**:970-985.
 23. GIBBONS, I. R., et A. V. GRIMSTONE. 1960. On flagellar structure in certain Flagellates. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**:697-716.
 24. GIBBONS, I. R., et A. J. ROWE. 1965. Dynein: a protein with adenosine triphosphatase activity from Cilia. *Science (Wash. D. C.)*. **149**:424-425.
 25. GRIMSTONE, A. V., et A. KLUG. 1966. Observations on the substructure of flagellar fibres. *J. Cell Sci.* **1**:351-362.
 26. HANDO, T., D. M. OKADA, et L. ZAMBONI. 1969. Atypical cilia in human endometrium. *J. Cell Biol.* **39**:475-481.
 27. DE HARVEN, E. 1968. The centriole and the mitotic spindle. *Dans The Nucleus*. A. J. Dalton et F. Haguenaou, éditeurs. Academic Press, Inc., New York. 197-227.
 28. HENLEY, C., D. P. COSTELLO, M. B. THOMAS, et W. D. NEWTON. 1969. The "9 + 1" pattern of microtubules in spermatozoa of *Mesostoma* (Plathelminthes. Turbellaria). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **64**:849-856.
 29. HOLLANDE, A. 1972. Le déroulement de la cryptomitose et les modalités de la ségrégation des chromatides dans quelques groupes de Protozoaires. *Année Biol.* **11**:427-466.
 30. HOLLANDE, A., et J. VALENTIN. 1967. Morphologie et infrastructure du genre *Barbulanympha*. Hypermastigine symbiotique de *Cryptocercus punctulatus* Scudder. *Protistologica*. **3**:257-267.
 31. HOLWILL, M. E. 1966. Physical aspects of flagellar movement. *Physiol. Rev.* **46**:696-785.
 32. JENKINS, R. A. 1967. Fine structure of division in ciliate Protozoa. I. Micronuclear mitosis in *Blepharisma*. *J. Cell Biol.* **34**:463-481.
 33. LUYKX, P. 1970. Cellular mechanisms of chromosome distribution. *Int. Rev. Cytol.*, **2** (Suppl.): 1-173.
 34. MANTON, I. 1959. Electron microscopical observations on a very small flagellate: the problem of *Chromulina pusilla* Butcher. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **38**:319-333.
 35. MANTON, I., et B. CLARKE. 1952. An electron microscope study of the spermatozoid of *Sphagnum*. *J. Exp. Bot.* **3**:265-275.
 36. MANTON, I., et H. A. VON STOSCH. 1966. Observations on the fine structure of the male gamete of the marine centric diatom *Lithodesmium undulatum*. *J. R. Microsc. Soc.* **85**:119-134.
 37. MAZIA D. 1961. Mitosis and the physiology of cell division. *Dans The Cell*. J. Brachet et A. E. Mirsky, éditeurs. Academic Press, Inc., New York. **3**:77-472.
 38. MERCIER, C., J. SCHREVEL, et J. R. STARK. 1973. The storage polysaccharide (paraglycogen) of the gregarine, *Gregarina blaberae*: cytology and biochemistry. *Comp. Biochem. Physiol.* **44B**:1001-1010.
 39. PHILIPPS, D. M. 1962. Fine structure of *Sciara coprophila* sperm. *J. Cell Biol.* **30**:499-517.
 40. PHILIPPS, D. M. 1969. Exceptions to the prevailing pattern of tubules (9 + 9 + 2) in the sperm flagella of certain insect species. *J. Cell Biol.* **40**:28-43.
 41. PRENSIER, G. 1973. Formation d'un flagelle atypique, sans structure centriolaire basale, au cours de la gamétogenèse chez *Diplauxis hatti*. *J. Microsc. (Paris)*. **17**:88 a (Abstr.).
 42. RANDALL, J., J. R. WARR, J. M. HOPKINS, et A. MCVITTIE. 1964. A single gene mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* affecting motility: a genetic and electron microscope study. *Nature (Lond)*. **203**:912-914.
 43. REGER, J. F., et N. T. FLORENDO. 1970. Observations on microgamonts and microgametes of the coccidian, *Eimeria* sp. parasitic in the ostracod, *Cypridopsis* sp. *J. Submicrosc. Cytol.* **2**:69-78.
 44. 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.
 45. RHODIN, J., et T. DALHAMN. 1956. Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **44**:345-412.
 46. ROBINOW, C. F., et J. MARAK. 1966. A fiber apparatus in the nucleus of the yeast cell. *J. Cell Biol.* **29**:129-151.
 47. ROSS, M. M. R. 1967. Modified cilia in sensory organs of juvenile stages of a parasitic nematode. *Science (Wash. D. C.)*, **156**:1494-1495.
 48. SATIR, P. 1960. On the evolutionary stability of the 9 + 2 pattern. *J. Cell Biol.* **12**:181-184.
 49. SATIR, P. 1965. Studies on cilia. II. Examination of the distal region of the ciliary shaft and the role of the filaments in motility. *J. Cell Biol.* **26**:805-834.
 50. SATIR, P. 1967. Morphological aspects of ciliary motility. *J. Gen. Physiol.* **50**:241-258.
 51. SATIR, P. 1968. Studies on cilia. III. Further studies on the cilium tip and a "sliding filament" model of ciliary motility. *J. Cell Biol.* **39**:77-94.
 52. SCHREVEL, J. 1969. Recherche sur le cycle des *Lecudinidae* Grégarines parasites d'Annélides Polychètes. *Protistologica*. **5**:561-588.
 53. SCHREVEL, J. 1970. Recherches ultrastructurales et cytochimiques sur le paraglycogène, réserve glucidique des Grégarines et Coccidies. *J. Microsc. (Paris)*. **9**:593-610.
 54. SCHREVEL, J. 1971. Contribution à l'étude des *Selenidiidae* parasites d'Annélides Polychètes. II. Ultrastructure de quelques trophozoïtes. *Protistologica*. **7**:101-130.
 55. SCHREVEL, J. 1972. Les polysaccharides associés à la surface cellulaire des Grégarines (Protozoaires

- parasites). I. Ultrastructure et cytochimie. *J. Microsc. (Paris)*. **15**:21-40.
56. SEDAR, A. W., et K. R. PORTER. 1955. The fine structure of cortical components of *Paramecium multimicronucleatum*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**:583-604.
 57. SHAPIRO, J. E., B. R. HERSHENOV, et G. S. TULLOCH. 1961. The fine structure of *Haematoloechus* spermatozoan tail. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**:211-217.
 58. SILVEIRA, M., et K. R. PORTER. 1964. The spermatozooids of flatworms and their microtubular systems. *Protoplasma*. **59**:240-265.
 59. SLEIGH, M. A. 1962. The biology of cilia and flagella. Pergamon Press, Inc., Elmsford, N. Y. 1-229.
 60. SLEIGH, M. A. 1968. Patterns of ciliary beating. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **22**:131-150.
 61. SLEIGH, M. A. 1969. The physiology and biochemistry of cilia and flagella. *Dans Handbook of Molecular Cytology*. A. Lima-de-Faria, éditeur. North-Holland Publishing Co., Amsterdam. 1244-1258.
 62. SUMMERS, K. E., et I. R. GIBBONS. 1971. Adenosine triphosphate induced sliding of tubules in trypsin treated flagella of sea urchin sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**:3092-3096.
 63. SUMMERS, K. E., et I. R. GIBBONS. 1973. Effects of trypsin digestion on flagellar structures and their relationship to motility. *J. Cell Biol.* **58**:618-629.
 64. TILNEY, L. G. 1971. Origin and continuity of microtubules. *Dans Origin and Continuity of Cell Organelles*. J. Reinert et H. Ursprung, éditeurs. Springer-Verlag Inc., New York. 222-260.
 65. VAN DEURS, B. 1973. Axonemal 12 + 0 pattern in the flagellum of the motile spermatozoon of *Nymphon leptocheles*. *J. Ultrastruct. Res.* **42**:594-598.
 66. VIVIER, E., et J. SCHREVEL. 1966. Les ultrastructures cytoplasmiques de *Selenidium hollandei* n. sp., Grégarine parasite de *Sabellaria alveolata* L. *J. Microsc. (Paris)*. **5**:213-228.
 67. VIVIER, E., et K. VINCKERMAN. 1974. Divisions nucléaires chez les Protozoaires. *Actualités Protozoologiques*. P. De Puytorac et J. Grain, éditeurs. Université de Clermont-Ferrand. **1**:161-177.
 68. WARNER, F. D. 1970. New observations on flagellar fine structure. The relationship between matrix structure and the microtubule component of the axoneme. *J. Cell Biol.* **47**:159-182.
 69. WARNER, F. D., et P. SATIR. 1973. The substructure of ciliary microtubules. *J. Cell Sci.* **12**:313-326.
 70. WARNER, F. D., et P. SATIR. 1974. The structural basis of ciliary bend formation. Radial spoke positional changes accompanying microtubule sliding. *J. Cell Biol.* **63**:35-63.
 71. WARR, J. R., A. MCVITTIE, J. T. RANDALL, et J. M. HOPKINS. 1966. Genetic control of flagellar structure in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genet. Res.* **7**:335-351.