

Contribution à la connaissance
de la reproduction chez la
TIQUE
Ornithodoros moubata, Murray, 1877;
sensu Walton, 1962 (Ixodoidea: Argasidae).

THESE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du grade de docteur ès sciences

par

Jacques DUCOMMUN

Travail réalisé avec l'appui du Fonds national suisse
de la Recherche scientifique

-1984-

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Contribution à la connaissance de la reproduction chez la Tique Ornithodoros moubata, Murray, 1877 sensu Walton, 1962 (Ixodoidea: Argasidae)

de Monsieur Jacques Ducommun

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,

Messieurs P.A. Diehl, A. Aeschlimann,

J.-L. Connat et H. Huggel (Genève)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 6 août 1984

Le doyen:



H. Beck

TABLE DES MATIERES

	Page
1. <u>INTRODUCTION</u>	1
2. <u>MATERIEL ET METHODES</u>	8
2.1. <u>Matériel d'étude, élevage</u>	8
2.1.1. Obtention de femelles nourries et ayant copulé	9
2.1.2. Obtention de femelles vierges nourries	9
2.1.3. Obtention de femelles ayant copulé tardivement	9
2.1.4. Obtention de femelles ayant copulé à jeun	9
2.2. <u>Stimulation chimique de la ponte</u>	10
2.2.1. Injections	10
2.2.2. Préparation de la substance active contenue dans le spermiphore des mâles	10
2.2.3. Détermination du poids moléculaire	10
2.2.4. Préparation des broyats de testicules, glandes annexes et vésicules séminales	11
2.2.5. Digestion enzymatique	12
2.3. <u>Stimulation mécanique de la ponte</u>	14
2.3.1. Stimulation par introduction de billes d'acier dans le vagin	14
2.3.2. Contrôle des résultats	14
2.4. <u>Broyats et transplantations de "cerveaux"</u>	14
2.4.1. Injection des broyats de "cerveaux"	14
2.4.2. Transplantations de "cerveaux"	15
2.4.3. Contrôle des résultats	15
2.5. <u>Traitements aux hormones juvéniles</u>	17
2.6. <u>Traitements aux "Precocene"</u>	18
2.7. <u>Vitellogénines et vitellines</u>	18
2.7.1. Extraction et purification partielle des protéines solubles de l'oeuf	18
2.7.1.1. Extraction	19

	Page
2.7.1.2. Précipitation au sulfate d'ammonium	19
2.7.1.3. Filtration sur gel	20
2.7.1.4. Colonne échangeuse d'ions	20
2.7.1.5. Récolte de l'hémolymphe	20
2.7.2. Electrophorèse sur polyacrylamide	22
2.7.3. Electrophorèse SDS sur polyacrylamide	22
2.7.4. Electrofocalisation	23
2.7.5. Techniques immunologiques	23
2.7.5.1. Obtention d'anticorps	23
2.7.5.2. Microimmunodiffusions	23
2.7.5.3. Immunoélectrophorèses	24
2.8. <u>Tests statistiques</u>	24
3. <u>RESULTATS</u>	25
3.1. <u>Copulation, vitellogénèse et ponte; mesure de quelques paramètres de notre élevage</u>	25
3.1.1. Variation du poids des femelles de notre élevage	25
3.1.2. Corrélation entre le poids gorgé et le poids à jeun des femelles	31
3.1.3. Corrélation entre le poids de sang ingéré et le nombre d'oeufs pondus	31
3.1.4. Corrélation entre le nombre d'oeufs pondus et le poids de femelles nourries depuis 100 jours	35
3.1.5. Poids d'un oeuf	35
3.1.6. Poids des ovaires secs	38
3.2. <u>Action de la copulation sur la vitellogénèse et la ponte : facteur chimique du mâle</u>	40
3.2.1. Détermination du poids moléculaire de la "substance active" du mâle	40
3.2.2. Injections de broyats de testicules, glandes annexes et vésicules séminales	49

	Page
3.2.2.1. Glandes annexes et testicules	49
3.2.2.2. Vésicules séminales	49
3.2.3. Femelles nourries une deuxième fois après stimulation chimique de la vitellogénèse et de la ponte	53
3.2.4. Digestion de la substance active par la trypsine	54
3.3. <u>Action de la copulation sur la vitellogénèse et la ponte : stimulation mécanique</u>	55
3.3.1. Stimulation mécanique par implantation de billes métalliques dans l'utérus	55
3.3.2. Synergie entre stimulation mécanique et chimique	57
3.3.3. Durée de la préoviposition	61
3.4. <u>Effets gonadotropes liés à l'implantation de "cerveaux"</u>	61
3.4.1. Broyats de "cerveaux"	61
3.4.2. Transplantations de "cerveaux"	61
3.4.2.1. Donneuses nourries depuis 2 jours et ayant copulé	62
3.4.2.2. Donneuses dans différents états physiologiques	63
3.4.2.3. Transplantation de "cerveaux" avec ou sans complexe endocrine rétro-cérébral	65
3.5. <u>Action des hormones juvéniles sur la vitellogénèse et la ponte</u>	67
3.5.1. Injection et application externe: comparaison des méthodes	67
3.5.2. Détermination de la dose optimale effective en injection	70
3.5.3. Distinction entre stimulus de JH-I et stimulus de JH-III	71
3.5.4. Injection d'isomères naturels de JH-I, JH-II et JH-III	78

	Page
3.6. <u>Action des "Precocene" sur la vitellogénèse et la ponte</u>	80
3.7. <u>Vitellogénines et vitellines: purifications partielles et comparaisons</u>	83
3.7.1. Disc-électrophorèse sur polyacrylamide	83
3.7.2. Purification des protéines majeures de l'oeuf	87
3.7.3. Etude de quelques caractères physico-chimiques de la fraction protéique OP ₂	91
3.7.3.1. Détermination du poids moléculaire	91
3.7.3.2. Electrophorèse de OP ₂ lyophilisé	91
3.7.3.3. Comparaison des électrophorégrammes de OP ₂ lyophilisé, d'hémolymphe de femelles et de broyats d'oeufs	92
3.7.3.4. Détermination du pH isoélectrique de OP ₂	93
3.7.3.5. Spectre d'absorption de OP ₂	93
3.7.4. Etude des fractions protéiques de l'hémolymphe	93
3.7.4.1. Purification de HL ₃ et HL ₄	93
3.7.4.2. Spectre d'absorption de HL ₃ et HL ₄ purifiées	97
3.7.5. Tests immunologiques	97
3.7.5.1. Tests d'Ouchterlony	97
3.7.5.2. Immunoélectrophorèses	99
3.7.6. Disc-électrophorèse en SDS de différentes protéines purifiées	101
4. <u>DISCUSSION</u>	106
4.1. <u>Paramètres de l'élevage</u>	106
4.2. <u>Stimulation de la vitellogénèse au moyen d'un facteur chimique produit par le mâle</u>	107
4.3. <u>Stimulation de la vitellogénèse par l'action mécanique de la copulation</u>	111

	Page
4.4. <u>Stimulation de la vitellogénèse par l'implantation de "cerveaux"</u>	112
4.5. <u>Stimulation de la vitellogénèse par un apport exogène d'hormones juvéniles. Etude des effets inhibiteurs des "Precocene 1 et 2"</u>	114
4.6. <u>Vitellogénines et vitellines</u>	117
5. <u>RESUME DES RESULTATS OBTENUS ET HYPOTHESES</u>	123
<u>REMERCIEMENTS</u>	126
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	128

Les tiques (Chelicerata, Acari) forment une super-famille, les Ixodoidea. Leur adaptation à un strict régime hématophage est remarquable (rostre conformé en une sorte de stylet pour percer les téguments, présence de diverticules intestinaux permettant l'ingestion d'une grande quantité de sang, systèmes d'osmorégulation originaux, etc...).

Leur cycle biologique les oblige à des contacts réguliers avec des hôtes vertébrés (HOOGSTRAAL & AESCHLIMANN, 1982). En effet, chaque rencontre permet la prise d'un repas sanguin, nécessaire à deux processus vitaux pour l'ectoparasite : la mue et la ponte.

Les tiques sont d'importants vecteurs d'agents pathogènes. Le lecteur trouvera les renseignements les plus complets à ce sujet dans les ouvrages généraux de ARTHUR (1962), BALASHOV (1972) et HOOGSTRAAL (1978). Rappelons que la transmission se fait par divers mécanismes : via les glandes salivaires pour la majorité des microorganismes, par l'organe coxal chez les Argasides, par transmission stercorale pour certaines rickettsies, par effraction à la hauteur des pièces buccales pour les microfilaraires et peut-être par régurgitation pour certains spirochètes (AESCHLIMANN, 1976; BURGDORFER & al, 1983).

Une autre particularité repose sur le fait que plusieurs agents pathogènes sont transmis via les oeufs à la génération suivante, rendant les descendants d'emblée infectieux. Par conséquent, l'étude de l'ovogénèse chez les tiques prend une importance d'autant plus grande qu'elle implique une incidence épidémiologique.

Pour des raisons traditionnelles de continuité dans l'étude d'un même modèle et pour des facilités techniques, nous avons choisi Ornithodoros moubata comme matériel de recherches.

Le domaine dans lequel nous avons travaillé est encore relativement peu étudié chez les tiques. Il nous a donc paru nécessaire d'énumérer tout d'abord quelques généralités concernant les

insectes, chez qui les phénomènes liés à la reproduction sont beaucoup mieux connus.

Chez les insectes, la copulation permet ou stimule souvent divers processus tels que fécondation, intensité de la vitellogénèse, ovulation et ponte (revue de ENGELMANN, 1970).

La nature du stimulus primaire du mâle, relativement bien comprise chez quelques espèces, peut être mécanique, chimique ou les deux à la fois (ENGELMANN, 1959, 1960; ROTH & STAY, 1961; DAVEY, 1965; BOULETREAU-MERLE, 1975). La composition des substances actives produites par le mâle n'est élucidée que chez peu d'espèces, pour l'instant. Ces substances, de nature protidique, sont transmises à la femelle par le liquide paragonial. Il s'agit soit de peptides, chez Drosophila melanogaster (BURCKHARDT, 1975), soit de dérivés d'acides aminés, chez Drosophila funebris (BAUMANN, 1974), soit encore de protéines, chez Aedes aegypti (FUCHS & HISS, 1970).

Le cerveau de la femelle joue souvent le rôle de relais et active la vitellogénèse et la ponte par des neurosécrétions (revues de ENGELMANN, 1970; DOANE, 1973; HIGHNAM & HILL, 1977).

Les corpora allata, activés dans certains cas par des neurosécrétions, forment un deuxième organe-relais en produisant des hormones juvéniles qui peuvent stimuler la synthèse de protéines particulières (vitellogénines) par le corps gras ou préparer l'ovaire à incorporer ces protéines dans les ovocytes en ménageant des espaces entre les cellules folliculaires (revue de HIGHNAM & HILL, 1977). On connaît actuellement quatre hormones juvéniles naturelles chez les insectes : JH-0, JH-I, JH-II et JH-III, avec respectivement 19, 18, 17 et 16 atomes de carbone incorporés dans la molécule (ROELLER & al, 1967; BERGOT & al, 1980). Des substances analogues peuvent mimer les effets de ces hormones chez les insectes (revue de SLAMA & al, 1974).

En 1976, BOWERS & al ont extrait d'une plante composée deux produits inhibant la biosynthèse d'hormone juvénile au niveau des corpora allata. Ces deux substances, nommées "Precocene 1" et "Precocene 2", se sont révélées actives chez plusieurs

espèces d'insectes (PRATT & BOWERS, 1977; FENER & al, 1978; BROOKS & al, 1979; PRATT & al, 1980; LANDERS & HAPP, 1980).

Les protéines constituant le vitellus de l'oeuf chez les insectes sont nommées vitellines. Elles dérivent de précurseurs (vitellogénines) synthétisés principalement par le corps gras (revue de HAGEDORN & KUNKEL, 1979). Ces substances sont essentiellement des glycolipoprotéines de haut poids moléculaire.

Chez les tiques, il faut considérer séparément la famille des Ixodides et celle des Argasides, car leurs représentants ont une biologie relativement différente, notamment en ce qui concerne la reproduction (revues d'AESCHLIMANN & GRANDJEAN, 1973 a; OLIVER, 1974). Toutefois, en règle générale, la femelle a besoin et d'un repas sanguin et d'une copulation pour être en mesure de pondre ses oeufs et d'assurer ainsi sa descendance.

Chez les Ixodides, genre Ixodes excepté, la copulation a lieu sur l'hôte pendant le repas sanguin. Elle permet à la femelle de se gorger complètement et d'accomplir sa vitellogénèse. Les femelles d'Ixodides ne pondent qu'une seule fois un grand nombre d'oeufs (jusqu'à 20'000) et meurent ensuite (ARTHUR, 1962). Si la femelle reste vierge, elle continue pendant un certain temps à prélever de faibles quantités de sang sur son hôte, puis se détache et meurt sans avoir pondu (PAPPAS & OLIVER, 1971, 1972; BALASHOV, 1972; GRAF, 1978).

Contrairement à la plupart des Ixodides, les femelles d'Argasides n'ont pas besoin de copuler pour se nourrir. La copulation n'a donc aucun rôle sur la prise du repas de sang, mais influence la digestion, la vitellogénèse et la ponte. Chez Ornithodoros moubata, les femelles vierges, lorsqu'elles ont été nourries sur cobaye, commencent une vitellogénèse ralentie par rapport aux femelles témoins ayant copulé. Après 20 à 30 jours, les ovocytes se mettent à résorber leur vitellus qui aura complètement disparu trois à quatre semaines plus tard. Après une longue période de préoviposition, moins de 15 % des femelles pondent; les oeufs, en faibles quantités, sont généralement non viables (AESCHLIMANN, 1968; GERMOND & AESCHLIMANN, 1977).

Par ce processus, la plupart des femelles vierges conservent la majeure partie de leur repas sanguin non digéré, stocké dans l'intestin. Après plusieurs mois, la copulation leur permet de reprendre la digestion du gâteau sanguin et de recommencer un nouveau cycle de vitellogénèse. Celui-ci conduit à la ponte après une période normale de préoviposition de 10 à 15 jours (AESCHLIMANN, 1968).

Les femelles des tiques ont donc développé un mécanisme complexe permettant l'utilisation du repas sanguin dans le seul cas où celle-ci conduit à une ponte viable. Chez les Ixodides, la copulation règle directement la prise du repas sanguin, alors que chez les Argasides, elle permet la digestion complète de ce repas.

De nombreux travaux tant sur les Ixodides que les Argasides ont été effectués pour tenter de comprendre les mécanismes physiologiques par lesquels la copulation agit sur la femelle. Le rôle de la stimulation mécanique de l'appareil génital chez la femelle lors de la copulation a été étudié en introduisant des matériaux étrangers (et inertes) dans le vagin de sujets vierges.

Dans le cas des Ixodides, la seule stimulation mécanique ne semble pas capable d'induire la phase rapide de gorgement, chez Amblyomma americanum. Par conséquent, la vitellogénèse et la ponte n'ont pas lieu (OLIVER & al, 1975).

En ce qui concerne les Argasides, la distension du vagin ou de l'utérus n'a aucun effet gonadotrope chez les femelles d'Ornithodoros tholozani ou d'Argas arboreus (GALUN & WARBURG, 1967; KHALIL & SHANBAKY, 1975), alors qu'une faible stimulation de la vitellogénèse est observée chez A. persicus (LEAHY & GALUN, 1972).

L'utilisation de mâles stériles ou de mâles d'une autre espèce a permis aux auteurs de connaître l'aspect non fécondant de la copulation. Les spermatophores ou les spermiphores non fécondants sont en effet capables d'induire la vitellogénèse et la ponte chez les Ixodides étudiés : Dermacentor variabilis (PAPPAS & OLIVER, 1972), A. hebraeum (SPICKETT, 1978). Chez les Argasides,

les effets rencontrés sont très variés selon les espèces. En ce qui concerne A. persicus et O. tholozani, ce stimulus conduit à une vitellogénèse normale (GALUN & WARBURG, 1967; LEAHY & GALUN, 1972). A l'opposé, aucun effet gonadotrope n'est observé chez A. arboreus (KHALIL & SHANBAKY, 1975).

Bien que l'intensité de la stimulation gonadotrope provoquée par l'introduction d'un spermatophore dans le vagin de femelles soit variable, il semble que ce stimulus puisse jouer un rôle dans le contrôle de la reproduction des tiques. L'analyse de ce phénomène a été menée plus finement en injectant, dans le vagin et l'utérus de femelles, des homogénats de diverses glandes du mâle participant à la formation du spermatophore ou encore de certaines substances trouvées dans celui-ci. Chez l'Ixodide A. americanum, l'injection d'homogénats de glandes accessoires ne présente aucun effet (OLIVER & al, 1975), alors que chez les Argasides, la vitellogénèse peut être fortement stimulée, voire même la ponte obtenue. L'injection d'extraits de testicules ou de surnageants de spermiphores ont le même effet (GALUN & WARBURG, 1967; AESCHLIMANN, 1968; KHALIL & SHANBAKY, 1975; GERMOND & AESCHLIMANN, 1977).

Ces travaux montrent donc l'importance des différentes sécrétions contenues dans les spermiphores pour le bon déroulement de la vitellogénèse.

La copulation, par l'ensemble des stimuli mécaniques et humoraux qu'elle comporte, constitue donc un élément nécessaire à l'induction de la vitellogénèse et de la ponte chez les tiques. La manière dont la femelle perçoit ces stimuli représente un des problèmes essentiels de la physiologie de la reproduction.

Certains travaux laissent penser que le "cerveau" pourrait être un organe-cible pour ces stimulations. Des cellules neurosécrétrices ont été décrites dans le "cerveau", tant chez les Ixodides que chez les Argasides (revue de BINNINGTON & OBEN-CHAIN, 1980) et il a été possible, dans quelques cas, de mettre en relation leur activité de synthèse avec des événements physiologiques : prise du repas sanguin, vitellogénèse, ponte

(Hyalomma dromedarii : DHANDA, 1967; O. moubata : EICHENBERGER, 1970, A. persicus : Eisen & al, 1973; O. tholozani : GABBAY & WARBURG, 1976). D'autres structures neurosécrétrices ont été décrites; l'organe rétro-cérébral situé à la jonction oesophage-intestin (ROSHDY & al, 1973; OBENCHAIN & OLIVER, 1975) et les organes latéraux, situés de part et d'autre du "cerveau" (BINNINGTON, 1981), ont une structure très analogue à celle du complexe corpora cardiaca-corpora allata des insectes.

L'injection de broyats de "cerveaux" est capable de provoquer la ponte chez des femelles vierges (AESCHLIMANN, 1968; SHANBAKY & KHALIL, 1975) mais on ne connaît pas, actuellement, la nature du principe actif de ces broyats.

De nombreux travaux, utilisant les hormones juvéniles ou les analogues d'hormones juvéniles, ont montré une action de ces substances sur la vitellogénèse (voir revues de DIEHL & al, 1982; SOLOMON & al, 1982); ces résultats ont amené certains auteurs à utiliser des substances ayant des effets anti-allatotropes chez les insectes : les "Precocene". Pour la plupart des espèces, des résultats assez peu nets et parfois contradictoires ont été obtenus. Un effet clair d'inhibition complète de la vitellogénèse ainsi que la possibilité de sa restauration par injection de JH-III, n'a été montré que chez O. parkeri (POUND & OLIVER, 1979).

Le contrôle endocrine de la vitellogénèse et de la ponte des tiques est donc très mal connu. Les hormones mises en jeu ne sont pas encore isolées et identifiées comme elles le sont chez les insectes. A la lumière de toutes les connaissances acquises dans notre laboratoire sur la vitellogénèse et la ponte d'O. moubata, nous avons tenté, dans ce travail, de mieux cerner les mécanismes physiologiques présidant au bon déroulement de ces processus dans notre modèle.

Le rôle de la copulation en tant que stimulation mécanique et chimique a été étudié, ainsi que le rôle possible du synganglion ("cerveau") en tant qu'organe neurosécréteur. Les hormones juvéniles et les "Precocene" ont également été utilisés afin de

savoir s'il existe une analogie dans le contrôle de la vitellogénèse chez les tiques et chez les insectes.

Une dernière partie de ce travail a consisté à étudier les protéines vitellines, sur lesquelles les connaissances sont encore fragmentaires. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux changements des caractères physico-chimiques de ces protéines avant et après leur incorporation dans les ovocytes.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. MATERIEL D'ETUDE, ELEVAGE

Ornithodoros moubata (MURRAY, 1877; sensu WALTON, 1962), de la famille des Argasidae, vit à l'état sauvage dans certaines régions d'Afrique équatoriale. Cette tique est le vecteur d'un spirochète, Borrelia duttoni, responsable de fièvres récurrentes de l'homme (BURGDORFER, 1951; GEIGY & MOOSER, 1955; AESCHLIMANN, 1958).

La larve ne se nourrit pas. On compte de 5 à 8 stades nymphaux; chaque nymphe prend un repas sanguin, puis mue. La femelle peut pondre plusieurs fois, mais doit toujours se nourrir pour effectuer un nouveau cycle gonadotrophique. La copulation a lieu pendant ou après le repas et n'influence pas la quantité de sang prélevé; elle est par contre absolument nécessaire pour permettre une vitellogénèse et une ponte normale (AESCHLIMANN, 1968; AESCHLIMANN & GRANDJEAN, 1973; GERMOND & AESCHLIMANN, 1977). O. moubata vit en relations étroites avec l'homme. On la trouve dans les maisons, se nourrissant aux dépens des humains, des porcs, des poules, etc...

La souche utilisée ici provient de Tanzanie. Les tiques sont élevées suivant la méthode de GEIGY & HERBIG (1955), modifiée par AESCHLIMANN (1958), dans une enceinte thermostatée à 27°C où l'humidité relative est de 50 - 60 %. Ce faible taux d'humidité a l'avantage de diminuer fortement la présence de moisissures dans les élevages. La nutrition se fait sur cochons d'Inde. A partir du 4e stade nymphal, chaque tique est isolée et nourrie séparément. Les femelles obtenues, le plus souvent après la 6e mue, n'ont donc ainsi jamais été en présence de mâles. Ces femelles vierges sont utilisées pour nos différentes expériences.

2.1.1. Obtention de femelles nourries et ayant copulé

Les femelles vierges sont nourries et mises en présence de mâles (3 mâles pour 1 femelle) pendant 1 à 2 jours dans une boîte de Petri. Après 10 à 12 heures, presque toutes les femelles ont copulé une ou plusieurs fois. Des dissections d'individus prélevés dans les différents lots le montrent clairement (présence de spermatophores dans l'utérus).

2.1.2. Obtention de femelles vierges nourries

Après le repas sanguin, les femelles sont isolées pendant 100 jours environ. Ce laps de temps permet au vitellus accumulé dans les ovocytes de se résorber (GERMOND & AESCHLIMANN, 1977).

2.1.3. Obtention de femelles ayant copulé tardivement

Des femelles vierges nourries depuis 100 jours environ sont mises en présence de mâles (3 mâles pour 1 femelle).

Nous avons alors un phénomène de "copulation retardée", qui permet de distinguer expérimentalement les stimuli provenant de la copulation seule, de ceux inhérents à la nutrition (AESCHLIMANN, 1968).

2.1.4. Obtention de femelles ayant copulé à jeun

Mises en présence de mâles, les femelles à jeun copulent dans de faibles pourcentages, même après plusieurs jours de cohabitation. Pour pallier cette difficulté, les femelles sont collées sur le dos au fond d'une boîte de Petri. Vingt-quatre heures après l'introduction des mâles, elles sont presque toutes fécondées.

2.2. STIMULATION CHIMIQUE DE LA PONTE

2.2.1. Injections

Les solutions aqueuses contenant la substance activant vitellogénèse et ponte sont injectées dans l'hémocoèle des femelles, à raison de 5 μ l par tique, selon GERMOND & AESCHLIMANN (1977). Les femelles témoins reçoivent de l'"Arachnid Ringer" (ROTHSCHILD, 1961).

2.2.2. Préparation de la substance active contenue dans le spermiophore des mâles

Quelques femelles sont placées durant 2 ou 3 jours en présence d'un fort excédent de mâles (env. 20 mâles pour 1 femelle). Elles sont ensuite disséquées dans une enceinte stérile et les spermiophores sont prélevés après ouverture des capsules spermatophoriques. Les spermiophores sont suspendus dans de l'"Arachnid Ringer" (ROTHSCHILD, 1961). Ils sont ensuite centrifugés à basse vitesse (500 g, 5 min) et resuspendus dans l'"Arachnid Ringer". L'opération est répétée 3 fois, afin d'éliminer au maximum les sécrétions des glandes accessoires mâles. La suspension finale (représentant le contenu d'environ 100 capsules dans 1 ml de solution) est mise à incuber pendant 24 h. à une température de 26 à 28° C. Les deux dernières étapes sont faites en asepsie complète.

2.2.3. Détermination du poids moléculaire par filtration sur gel

Après incubation, la suspension de spermiophores est centrifugée (SORVALL RC-5, 12'000 g, 10 min., 4° C).

Le surnageant (env. 0,8 ml) est récolté et une fraction de celui-ci est appliqué sur une colonne de Sephadex G-200, ou de Bio-Gel A-5 M.

L'élution est faite à 4° C dans du NaCl 2% ¹⁾, avec un débit d'une goutte par minute (env. 60 μ l/min.). La pression hydrostatique est maintenue par une colonne d'eau de 40 cm. (vase de Mariotte).

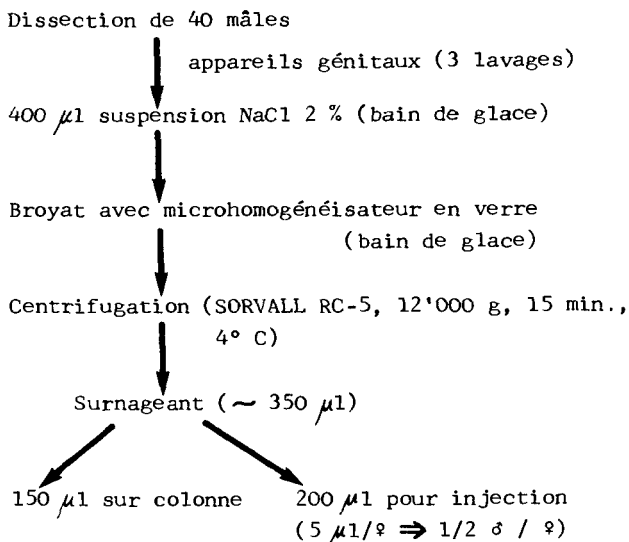
Avant emploi, les colonnes sont stérilisées chimiquement à l'aide d'une solution d'azide de sodium (0,2 %) et l'éluant est autoclavé. Pour calibrer les colonnes, nous avons utilisé du Blue-Dextran 2000 (non retenu: volume d'exclusion du gel), du DNP-Alanine et des protéines standard (Serva, collection MS-II). L'étalonnage est fait avant et après élution du sur-nageant de spermiphores.

Des fractions de 10 (600 μ l) ou 20 (1200 μ l) gouttes sont récoltées par un collecteur LKB. La détection UV est effectuée à 280 nm par un appareil UVICORD, LKB.

2.2.4. Préparation des broyats de testicules, glandes annexes et vésicules séminales

40 mâles vierges et non-nourris (ayant mué depuis 1 à 2 mois) sont disséqués dans NaCl 2 %. Leurs appareils génitaux sont prélevés, lavés plusieurs fois et mis en suspension dans NaCl 2 % suivant le schéma ci-après :

¹⁾ Des essais préliminaires à l'aide de différents tampons phosphates comme éluants ont entraîné des taux de mortalité assez élevés chez les femelles. C'est la raison pour laquelle nous avons utilisé une solution saline simple. La concentration de 2 %, hypertonique par rapport à l'hémolymphe, permet de limiter au maximum l'adsorption de molécules sur le Sephadex ou le Bio-Gel et est néanmoins très bien tolérée par les femelles lors de l'injection.



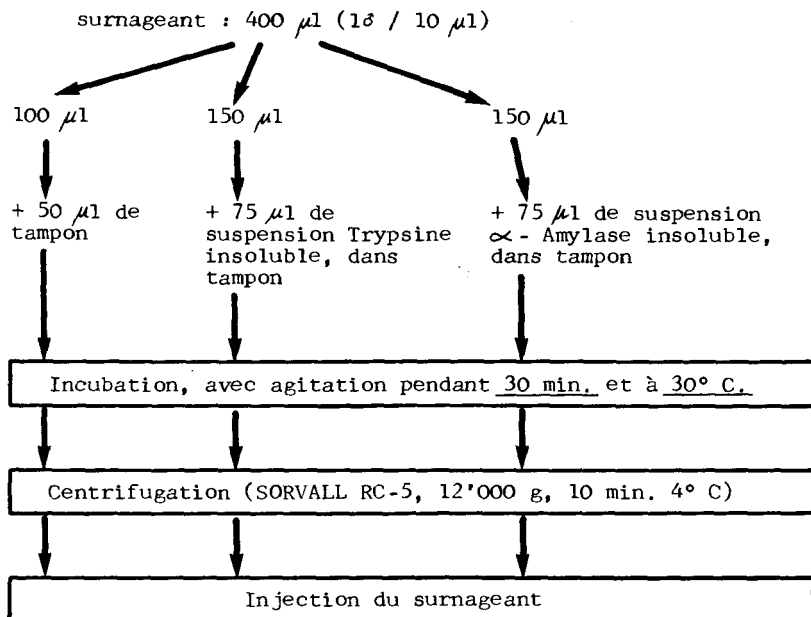
2.2.5. Digestion enzymatique

Les expériences de digestion enzymatique ont été faites au moyen de trypsine et d' α -amylase ¹⁾ insolubles (Sigma Chem. Comp.). La matrice de ces enzymes est constituée de polyacrylamide. On utilise, pour la digestion, du tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 133 mM, pH 8,0.

Mode opératoire :

- préparation de broyats de vésicules séminales de mâles :
comme sous 2.2.4.

1) L' α -amylase est utilisée comme témoin.



D'autre part, l'activité de la Trypsine insoluble a été contrôlée par la méthode donnée dans "Methods of Enzymatic Analysis, vol-2, pp. 1018 - 1021", avec la caséine comme substrat.

Ce dosage nous a indiqué une activité de 16,4 unités caséine¹⁾ par gramme d'enzyme insoluble. La comparaison n'est pas possible avec les données du fabricant, celui-ci ayant utilisé un autre substrat, le BAEE (Benzoyl-L-Arginine ethylester).

1) Une unité caséine correspond à la quantité de trypsine qui, dans des conditions définies (20 min. d'incubation à 35°C, volume du milieu réactionnel: 2ml, volume final après addition de TCA: 5 ml) libère suffisamment de produits d'hydrolyse solubles dans le TCA, de telle sorte que l'extinction à 280 nm augmente de 1,00 par minute.

2.3. STIMULATION MECANIQUE DE LA PONTE

2.3.1. Stimulation par introduction de billes d'acier dans le vagin

Nous avons utilisé des billes en acier inoxydable (\emptyset : 0,5 mm) prévues pour des roulements à billes miniatures (maison RMB, Bienne, Suisse).

Les femelles utilisées sont vierges et nourries depuis 100 jours environ. Chacune reçoit 10 billes qui sont insérées une à une par l'orifice génital.

Quelques dissections immédiates ont permis de voir que 5 à 6 billes gagnent l'utérus et 4 à 5 restent localisées au niveau du vagin. Une certaine distension de l'utérus est donc assurée.

2.3.2. Contrôle des résultats

Une semaine après injection ou introduction des billes, 5 à 10 femelles par lot sont disséquées afin de prélever les ovaires. Ceux-ci sont séchés dans une étuve (2 h. / 95° C), puis pesés. Les femelles restantes sont contrôlées tous les deux jours, afin de suivre le rythme de ponte. A la fin de l'expérience, tous les oeufs sont comptés.

2.4. BROYATS ET TRANSPLANTATIONS DE "CERVEAUX"¹⁾

2.4.1. Injection des broyats de "cerveau"

Les tiques donneuses sont disséquées dans du NaCl 0,95 %. Les "cerveaux" sont prélevés et rincés plusieurs fois dans la solution physiologique. Puis ils sont suspendus dans le même milieu à raison d'un "cerveau" pour 5 μ l de solution. La suspension est alors homogénéisée dans un bain de glace à l'aide d'un microhomogénéisateur en verre. Le broyat est centrifugé (SORVALL RC-5, 12'000 g., 15 min., 4° C) et le surna-

1) Par extension, nous avons utilisé le terme de "cerveau" pour désigner le ganglion, partie du système nerveux central concentré en un organe compact chez les tiques.

geant est injecté aux femelles réceptrices, brut ou dilué dans du NaCl 0,95 %, à raison de 5 μ l par femelle. Dans quelques cas, le broyat n'a pas été centrifugé et a été directement injecté après l'homogénéisation. Pour éviter de trop fortes dégradations enzymatiques, le temps séparant la dissection de l'injection est réduit au minimum (1 - 2 heures).

2.4.2. Transplantations de "cerveaux"

Les tiques donneuses proviennent toutes, pour une expérience donnée, du même lot. Immédiatement après son prélèvement, chaque "cerveau" est transplanté dans l'hémocoèle de la femelle réceptrice au moyen d'un tube capillaire étiré muni d'un piston. Ce dernier est constitué d'une aiguille entomologique dont l'extrémité a été tronquée. L'introduction se fait en sectionnant une des pattes de la quatrième paire au niveau de la coxa et en glissant par cette ouverture le tube capillaire dans la cavité générale (fig. 1). Durant tout son transfert, le "cerveau" baigne dans du liquide physiologique. Lorsque l'opération est faite avec soin, dans une enceinte stérile, 80 à 90 % des femelles survivent. Des témoins subissent la même opération (ablation d'une patte, introduction du tube capillaire et du piston), mais sans introduction du "cerveau".

Les "cerveaux" accompagnés de leur complexe rétro-cérébral sont obtenus en sectionnant l'oesophage un peu au-dessous du "cerveau" d'une part et à sa jonction avec l'intestin d'autre part. L'ensemble non dissocié ("cerveau + fragment d'oesophage") est transféré sur la tique réceptrice par la technique décrite au paragraphe précédent. L'opération a été menée avec beaucoup de soin, de façon à éviter dans la mesure du possible des lésions importantes aux organes transplantés.

2.4.3. Contrôle des résultats

Les femelles réceptrices sont, dans tous les cas, vierges et nourries depuis 100 jours environ.

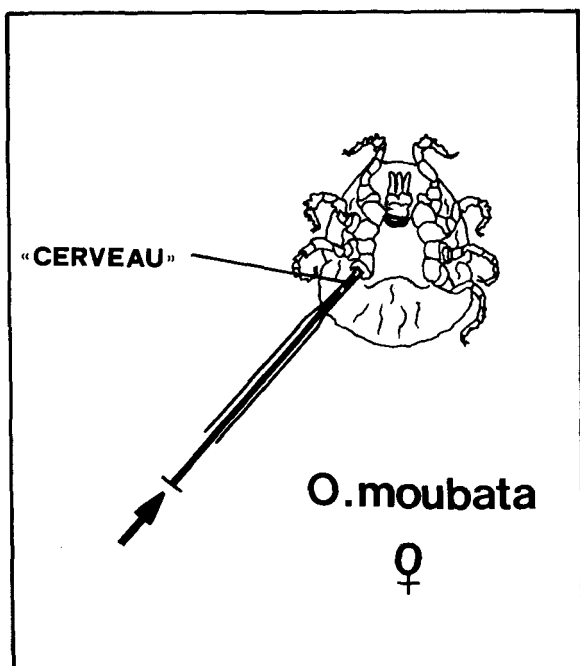


FIGURE 1

Technique de transplantation de "cerveaux".

La femelle réceptrice est amputée au niveau de la coxa de la 4^e paire de pattes. La "seringue" est constituée d'un tube capillaire étiré, muni d'un piston.

Le "cerveau", baignant dans une solution physiologique, est transféré dans l'hémocoèle de l'animal.

Deux semaines après l'opération, elles sont disséquées et l'état de l'ovaire examiné. C'est la couleur et la taille des ovocytes qui permet de juger de leur vitellogénèse. Afin de disposer de critères objectifs, nous avons considéré comme positives les femelles avec ovaire contenant des ovocytes de diamètre supérieur à 200μ . Cet état correspond au début du stade III de BALASHOV (1972, pp. 319, 320), c'est-à-dire au commencement de la vitellogénèse proprement dite. Ce phénomène se traduit par une coloration brune de l'ovocyte, bien visible à la loupe binoculaire.

2.5. TRAITEMENTS AUX HORMONES JUVENILES

L'hormone juvénile est administrée de deux manières différentes :

- 1°) par une application externe de $1 \mu\text{l}$ d'une solution acétonique d'hormone sur la face ventrale
- 2°) par injection dans l'hémocoèle de $2,5 \mu\text{l}$ d'une solution d'hormone dans de l'huile d'olive.
L'injection est faite selon GERMOND & AESCHLIMANN (1977).

Les quantités d'hormones varient entre 0,1 et $500 \mu\text{g}$ par tique.

Les hormones juvéniles proviennent de deux sources différentes:

- Pour les trois premières expériences, nous avons utilisé JH-I et JH-III en provenance de la maison Fluka AG (Buchs : Suisse). Les hormones sont de type "purum" et contiennent un mélange d'isomères avec des proportions non précisées.

- Pour la dernière expérience, nous avons utilisé JH-I, JH-II et JH-III de "ECO, Chemical Intermediates". Ces composés ne comprennent, pour chacun d'eux, que l'isomère naturel trouvé chez les insectes.

Environ 25 jours après le traitement, les tiques sont disséquées et l'état de l'ovaire examiné (mêmes critères que sous 2.4.3.). En outre, tout le système génital est observé au microscope à contraste de phase, afin de vérifier l'état de virginité des tiques.

2.6. TRAITEMENTS AUX "PRECOCENE"

Des femelles vierges à jeun sont utilisées. Les traitements sont faits en laissant séjourner les tiques dans une boîte de Petri tapissée d'un papier buvard (Whatman No 1) imprégné de "Precocene". Les doses sont donc données en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (variant entre 0,1 et 100). Les "Precocene 1 et 2" proviennent de la maison "Aldrich Chem. Comp." USA. Certaines femelles sont mises au contact des "Precocene" pendant les trois jours précédant la nutrition et la copulation, puis pendant les onze jours qui suivent, alors que d'autres ne sont soumises au produit que durant les onze jours qui font suite au repas de sang et à la copulation. A la fin de cette période, chaque femelle est mise séparément dans un tube de verre bouché par un tampon de coton. Le rythme de ponte est observé tous les deux jours et les oeufs comptés en fin d'expérience.

2.7. VITELLOGENINES ET VITELLINES

2.7.1. Extraction et purification partielle des protéines solubles de l'oeuf

2.7.1.1. Extraction

Les oeufs sont récoltés juste après la ponte (récolte journalière) ou prélevés directement dans l'utérus de femelles prêtes pour l'oviposition.

L'homogénéisation est faite dans un microhomogénéisateur en verre, à basse température (bain de glace) et dans une des trois solutions salines tamponnées, mentionnées ci-dessous :

- Phosphate pH 7,0 :

- NaH_2PO_4 1/15 M, NaCl 0,5 M	413 ml
- Na_2HPO_4 1/15 M, NaCl 0,5 M	<u>587 ml</u>
	1000 ml

- Tris - HCl pH 8,2 :

- Tris	: 1,82 g	} 3 l H_2O dist.
- HCl 1N	: 6,87 ml	

- Tris - HCl + NaCl pH 8,2 :

Idem ci-dessus + 1 M NaCl

L'homogénat est ensuite centrifugé (27.000 g., 20', 4° C) et le surnageant prélevé après élimination de la couche superficielle de lipides.

2.7.1.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

On ajoute du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solide au surnageant (tampon Tris-HCl, pH 8,2) jusqu'à 55 % de la valeur de saturation. On obtient un précipité blanchâtre éliminé par centrifugation (48.000 g., 20', 4° C). Le surnageant reçoit alors $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solide jusqu'à 70% sat. Il apparaît un précipité brun. Après une nouvelle centrifugation, ce dernier est prélevé et redissout dans Tris-HCl. Le surnageant, incolore, est jeté. Etant intéressés

par les protéines "colorées" du vitellus uniquement, nous n'avons pas dosé celles constituant le dernier surnageant, l'absorption spectrophotométrique de celui-ci étant pratiquement nulle à 398 nm.

2.7.1.3. Filtration sur gel

Après avoir été additionné de saccharose (conc. finale : 5 %), l'échantillon (150 μ l pour un travail analytique, 400-500 μ l pour une opération préparative) est appliqué sur une colonne contenant du Bio-Gel A5M. Les caractéristiques de la colonne sont indiquées à la figure 16 , l'éluant étant l'un des trois tampons décrits ci-dessus (2.7.1.1.).

2.7.1.4. Colonne échangeuse d'ions

Nous avons utilisé une colonne de diamètre 9 mm et de longueur 30 cm et, comme support, le DEAE Sephadex A-25 (échangeur d'anions). Le tampon est Tris-HCl pH 8,2 et l'éluion suit un gradient linéaire de NaCl (0-200 mM), obtenu suivant figure 2.

2.7.1.5. Récolte de l'hémolymphe

Une patte de l'animal (4e paire) est sectionnée au niveau de la coxa à l'aide d'un microscalpel. L'hémolymphe est récoltée dans un tube capillaire et centrifugée (10' : hématocrite) afin d'éliminer les hémocytes. Lors de ruptures accidentelles de l'intestin, les tubes contenant de l'hémolymphe contaminée par du sang sont rejetés.

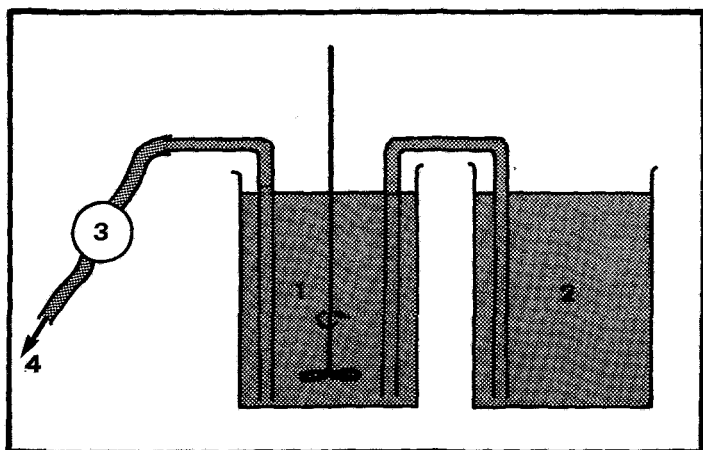


FIGURE 2 Technique utilisée pour la formation d'un gradient linéaire de NaCl (0-200 mM) en vue d'une chromatographie par échange d'ions.

- 1) Tampon Tris-HCl pH 8,2
- 2) Tampon Tris-HCl pH 8,2 + NaCl 200 mM
- 3) Pompe péristaltique
- 4) Vers la colonne échangeuse d'ions

2.7.2. Electrophorèse sur polyacrylamide

Le système utilisé est celui de HUNTER et FREYVOGEL ¹⁾ :

- lower-gel : 4,5 %, pH 8,7
- spacer-gel : 2,5 %, pH 6,7

L'appareil est un "Slab Gel" Desaga. La tension aux bornes du générateur vaut 330 V, avec un courant de 10 à 20 mA. Le refroidissement du gel est assuré par l'eau courante. La séparation est achevée en 50' environ, l'indication étant donnée par le front de migration (bleu de bromophénol). Le tampon d'électrode a un pH de 8,4 (Tris-Glycine).

Après l'électrophorèse, le gel est fixé (TCA 12,5 % : 30') et coloré par les méthodes suivantes :

- Protéines totales : Bleu de Coomassie R 250 selon MAURER (1971)
- Glycoprotéines : PAS selon CLARKE (1964)
- Lipoprotéines : Noir Soudan B selon MAURER (1971)
- Hémoprotéines : Benzidine - H₂O₂ selon CLARKE (1964)

2.7.3. Electrophorèse SDS sur polyacrylamide

Le système LAEMMLI (1970) s'est révélé le plus propice à nos analyses, avec un gel de 7,5 %. Les protéines standards proviennent de Bio-Rad (HMW standards). Les gels sont colorés avec le Bleu de Coomassie R-250 selon MAURER (1971).

Echantillons : les quantités appliquées dans chaque fente du gel varient selon les cas, entre 10 μ g et 100 μ g.

1) Technique communiquée par l'Institut Tropical Suisse, Bâle

2.7.4. Electrofocalisation

Nous avons employé l'appareil "Multiphor" LKB ainsi que les plaques de polyacrylamide : "Ampholine PAG plate" de LKB également. La plage de pH s'étend de 3,5 à 9,5. Le colorant est toujours le Bleu de Coomassie R 250.

2.7.5. Techniques immunologiques

2.7.5.1. Obtention d'anticorps

Deux milligrammes de protéine purifiée (fraction OP₂ selon 3.7.2) sont dissous dans 1 ml de tampon phosphate pH 7,0. On ajoute à cette solution 1 ml de "Freund's Incomplete Adjuvant". Après émulsion, une injection intracutanée sur la face externe de la cuisse d'un lapin est réalisée avec 150 µl de la solution. Deux rappels sont administrés à 15 jours d'intervalle chacun. Une semaine après le 2e rappel, du sérum est récolté, lyophilisé et conservé dans des ampoules scellées.

Une injection de rappel est toujours faite 7 jours avant une nouvelle récolte de sérum.

2.7.5.2. Microimmunodiffusions

Les microimmunodiffusions sont faites d'après OUCHTERLONY (1949) :

- agar 1,5 %
- tampon KH₂PO₄ / K₂HPO₄ 0,3 M / pH 8,0.

2.7.5.3. Immunoélectrophorèses

Elles sont faites à l'aide d'un appareil Multiphor (LKB). La concentration de l'agarose est 1,5 % avec un tampon barbital pH 8,6 (0,02M).

Les antigènes sont d'abord séparés électrophorétiquement, puis le sérum ajouté. La réaction se passe en chambre humide, à température ambiante et pendant 24 heures. Les plaques sont ensuite lavées, colorées au Bleu de Coomassie R-250 et finalement séchées.

2.8. TESTS STATISTIQUES

5 tests différents sont utilisés au cours de ce travail :

1°) Le test de probabilité exacte de FISHER (alternative simple) (SIEGEL S., 1956)

2°) Le test de la médiane (SIEGEL S., 1956)

3°) Le test du χ^2 (SPIEGEL M.R., 1972)

4°) Le test t de STUDENT (LAMOTTE M., 1971)

5°) Le test de corrélation (LAMOTTE M., 1971).

3. RESULTATS

3.1. COPULATION, VITELLOGENESE ET PONTE : MESURE DE QUELQUES PARAMETRES DE NOTRE ELEVAGE

3.1.1. Variation du poids des femelles de notre élevage

Dans le but d'avoir une idée précise de l'homogénéité du matériel disponible, nous avons tout d'abord suivi l'évolution au cours du temps du poids des femelles de notre élevage. Trois lots de femelles vierges à jeun (1, 2 et 3) ont été pesés, le premier en août 1977, le second en septembre 1978 et le troisième en décembre 1978 (fig. 3). La répartition des individus en classes de poids de 5 mg nous permet de constater une asymétrie assez prononcée par rapport au mode. Le tableau 1 nous indique une distribution non-normale des lots 1 et 3, pour un seuil de 5 %.

lot no	♀♀ pesées en	n	χ^2	v	$\chi^2_{0,995}$	$\chi^2_{0,95}$
1	août 1977	113	15,91	8	22,0	15,5
2	septembre 78	40	2,9	2	10,6	5,99
3	décembre 78	96	27,5	7	20,3	14,1

Tableau 1 : Examen de la distribution des poids de 3 lots de femelles vierges et à jeun.

Comparaison avec une distribution normale par un test du χ^2 (voir fig. 3).

Le test t de STUDENT n'étant donc dans ce cas pas utilisable, les moyennes ont été comparées par le test de la médiane. Ce dernier nous montre une différence hautement significative entre les lots 1 et 2 et également entre les lots 1 et 3 ($P < 0,01$). Par contre, 2 et 3 ne se distinguent pas l'un de l'autre statistiquement ($P > 0,1$). La moyenne des poids a donc diminué de 1977 à 1978 mais est restée stationnaire durant la fin de l'année 1978.

Deux groupes de femelles vierges nourries depuis un jour ont été pesés, le premier en novembre 1977 (29 femelles) et le second en décembre 1978 (96 femelles). La répartition (fig. 4) paraît asymétrique mais on ne peut exclure une distribution normale pour le lot "décembre 1978" ($\chi^2_{0,95} = 15,5$ pour $\nu = 8$, alors que notre χ^2 vaut 11,7). En comparant les deux lots par un test de la médiane, on s'aperçoit que le poids moyen des femelles fraîchement nourries est plus élevé en automne 1978 qu'un an auparavant (différence significative à $P < 5\%$). Signalons que les pesées de décembre 1978 (femelles à jeun : fig. 3 C et femelles nourries : fig. 4 B) concernent les mêmes individus. On peut constater d'ailleurs certaines similitudes dans la distribution des poids.

Huit groupes de femelles vierges nourries depuis 100 jours ont été pesés entre août 1975 et avril 1979 (fig. 5). On remarque une augmentation graduelle de la moyenne des poids au cours du temps (fig. 6). Quoique cette augmentation semble se stabiliser depuis 1977, nous obtenons une bonne corrélation entre le temps et le poids (r significatif à 0,02).

Sur la figure 5, les différents échantillons ne semblent pas montrer une distribution normale. En opérant un test de χ^2 , il apparaît que, pour un seuil égal à 0,95, les lots : janvier 76, juin 76 et avril 79 ne peuvent être assimilés à une distribution normale. Pour les autres échantillons, le χ^2 est juste inférieur au χ^2 limite des tables. Certains de ces lots paraissent présenter un caractère bi- ou plurimodal dans leur distribution.

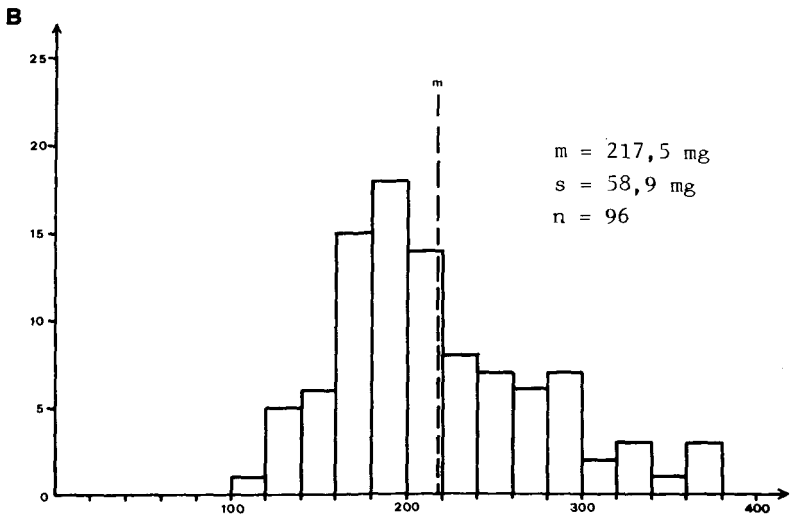
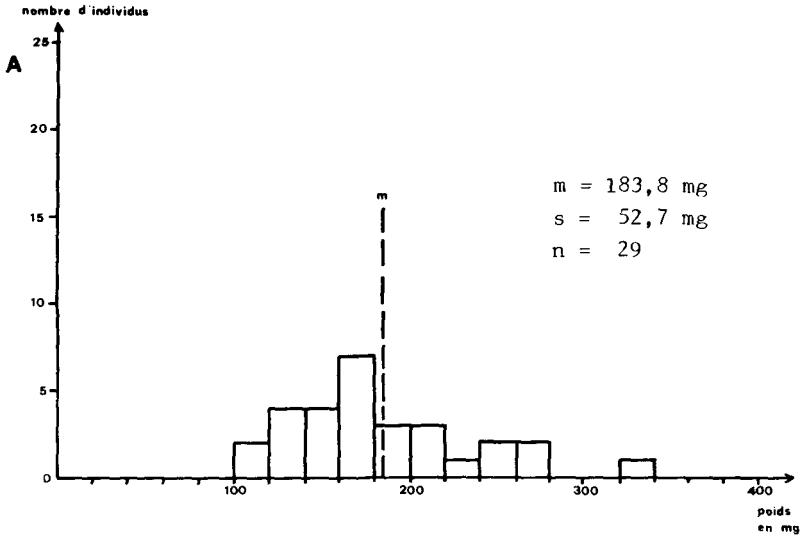


FIGURE 4 Examen de la distribution des poids de femelles vierges
nourries depuis 1 jour, à diverses périodes :

A : novembre 1977
B : décembre 1978

m : poids moyen de l'échantillon
 s : écart-type
 n : nombre total d'individus

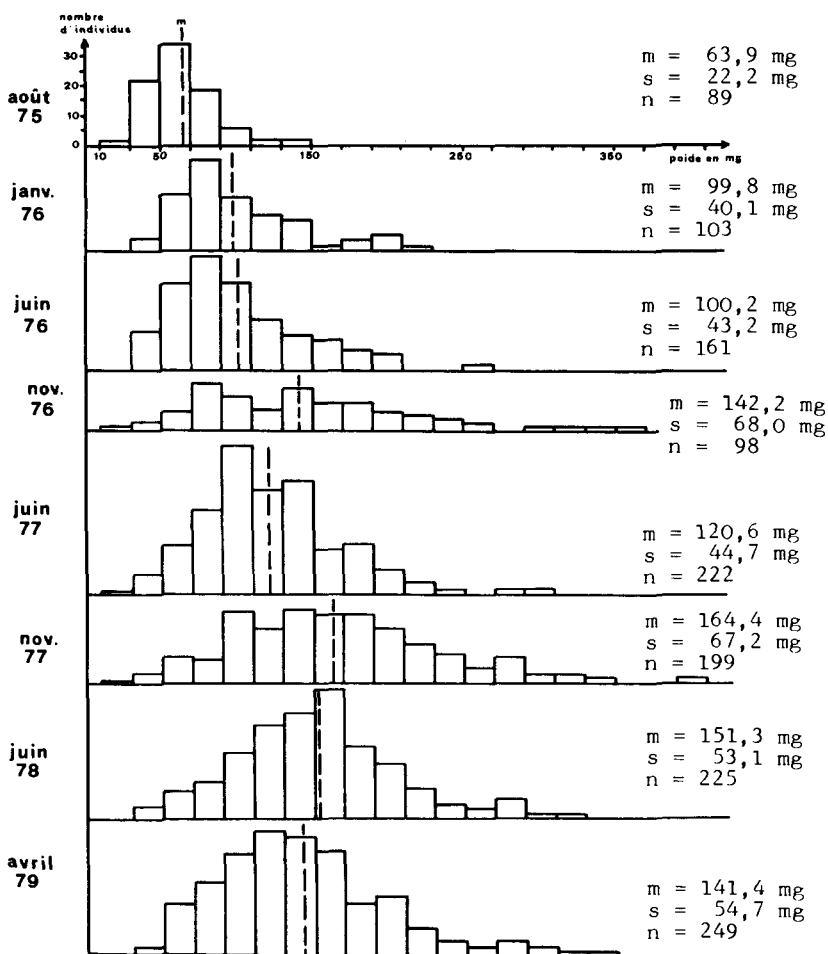


FIGURE 5 Examen de la distribution des poids de femelles vierges nourries depuis 100 jours, à diverses périodes.

m : poids moyen de l'échantillon

s : écart-type

n : nombre total d'individus

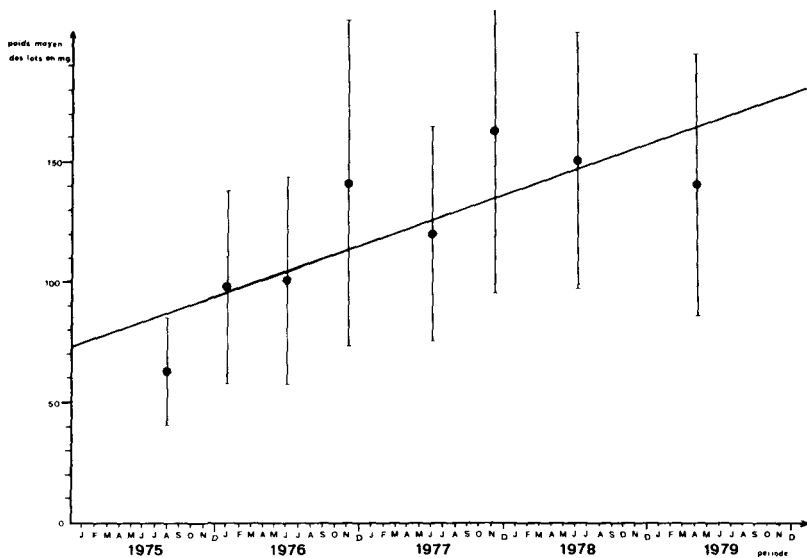


Figure 6 Evolution au cours du temps du poids moyen de femelles vierges nourries depuis 100 jours (les données sont reprises de la figure 5).

La droite figurée représente la droite de régression ($y = 1,769 x + 74,10$).

Les segments verticaux correspondent aux écarts-types.

3.1.2. Corrélation entre le poids à jeun et le poids gorgé des femelles

Dans l'éventail des paramètres étudiés sur notre élevage, il était intéressant également de savoir s'il existait une relation entre le poids d'une femelle avant et après son repas de sang.

Nonante-six femelles ont été pesées avant la prise de sang ainsi que le lendemain du repas, après expulsion du liquide coxal. Il existe une très bonne corrélation ($\alpha < 0,01$) entre les deux poids obtenus (fig. 7). Ainsi, une grosse femelle prend beaucoup plus de sang qu'une petite. De plus, afin de disposer d'un paramètre stable pour la suite de notre travail, nous avons calculé le rapport entre poids gorgé et poids à jeun d'une même femelle (R_1) et en avons établi la distribution (fig. 8). R_1 semble distribué normalement, la valeur du χ^2 (2,19) étant située au-dessous de χ^2 limite (7,81).

La moyenne (4,97) indique qu'une femelle quintuple à peu près son poids lors du repas.

3.1.3. Corrélation entre le poids de sang ingéré et le nombre d'œufs pondus

La quantité de sang ingéré par 20 femelles a été estimée en pesant les individus avant leur repas sanguin et le jour suivant celui-ci, après expulsion du liquide coxal. Il existe une très bonne corrélation ($\alpha < 0,01$) entre la quantité de sang ingéré et le nombre d'œufs pondus par les femelles (fig. 9). D'autre part, le rendement de ponte ($R_2 = \text{nombre d'œufs} / \text{poids de sang ingéré}$) a été calculé pour chaque individu. La valeur moyenne obtenue est $0,72 \text{ mg}^{-1}$. Cela signifie que, pour chaque milligramme de sang concentré de cobaye, une femelle pondra 0,72 œufs.

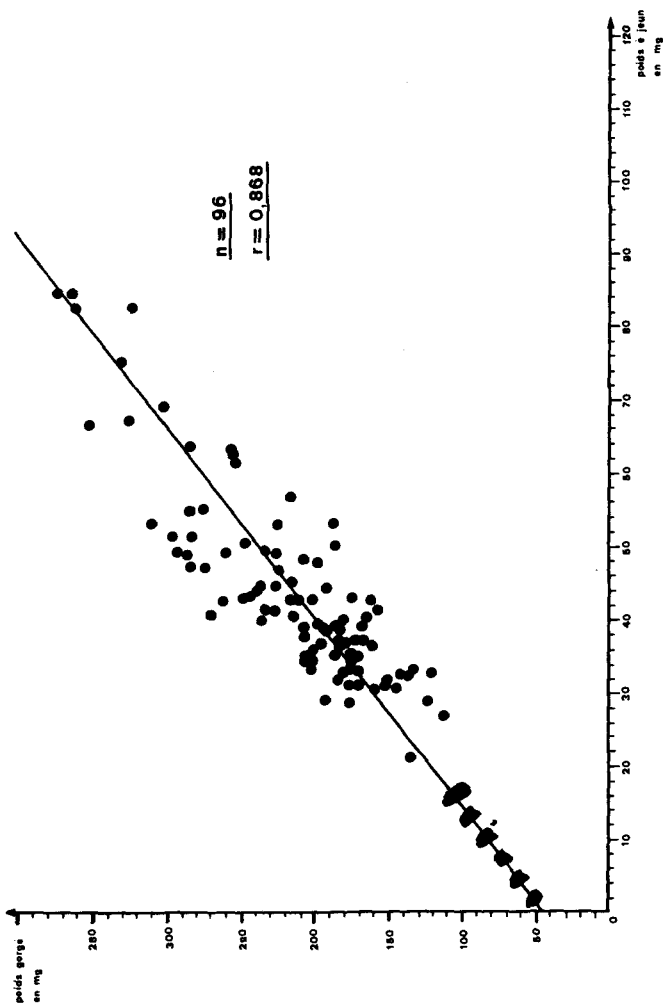


FIGURE 7 Droite de régression exprimant une corrélation entre le poids à jeun et le poids gorgé de femelles (coefficient de corrélation : $r = 0,868$).
Les femelles gorgées sont pesées le lendemain du repas sanguin, après expulsion du liquide coxal.

Equation de la droite de régression : $y = 3,87 x + 45,6$.

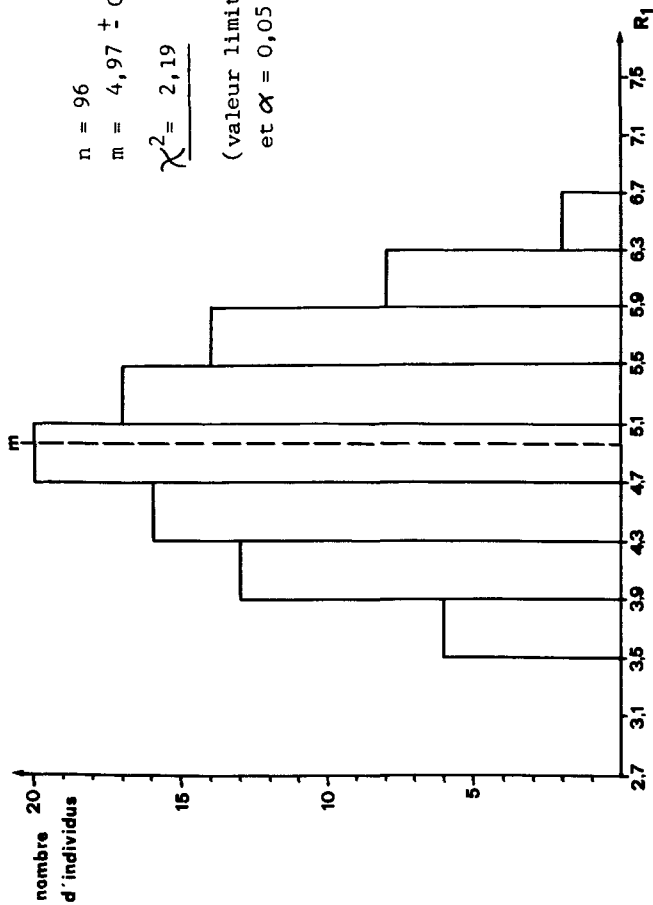


FIGURE 8 Examen de la distribution du rapport $R_1 = \frac{\text{poids de la femelle gorgée}}{\text{poids de la femelle à jeun}}$,
 d'après les données de la figure 7.

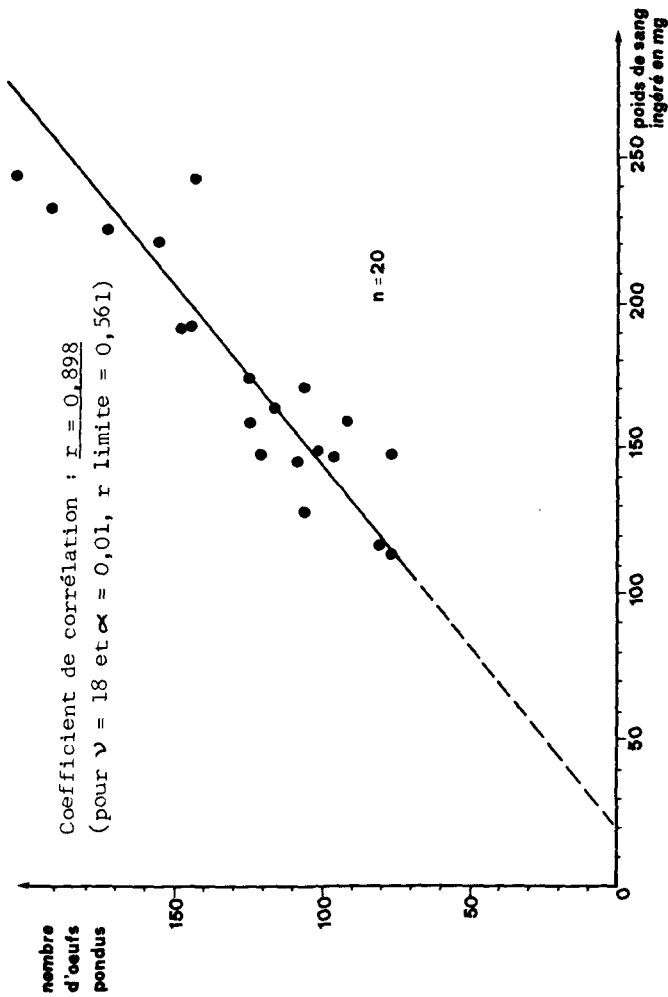


FIGURE 9 Influence du poids de sang ingéré et concentré sur le nombre d'œufs pondus par des femelles. La droite figurée représente la droite de régression ($y = 0,810 x - 15,5$).

3.1.4. Corrélation entre le nombre d'œufs pondus et le poids de femelles nourries depuis 100 jours

Dans la plupart de nos expériences, nous avons utilisé des femelles nourries depuis 3 à 4 mois, sans connaître leur poids à jeun.

Cent-vingt-quatre de ces femelles ont donc été pesées et leur poids a été mis en relation avec le nombre d'œufs qu'elles ont pondu après copulation retardée (fig. 10). Il existe une très bonne corrélation ($\alpha < 0,01$) montrant que la quantité d'œufs pondus augmente avec le poids des femelles. En conséquence, nous pouvons utiliser comme critère de productivité le rapport

$$R_3 \left(= \frac{\text{nombre d'œufs pondus}}{\text{poids de la femelle}} \right)$$

plutôt que de considérer uniquement le nombre d'œufs pondus, ce paramètre étant beaucoup trop variable d'une tique à l'autre.

En reprenant les 124 femelles ci-dessus, nous pouvons étudier la distribution du rapport R_3 (fig. 11). Celle-ci semble normale au vu du test de χ^2 . La moyenne ($0,50 \text{ mg}^{-1}$) signifie qu'une femelle nourrie depuis 100 jours va pondre 1 œuf pour 2 mg de son poids.

3.1.5. Poids d'un œuf

L'œuf d'Ornithodoros moubata a une taille relativement grande par rapport à celle de certaines autres espèces de tiques, les Ixodides en particulier. Son diamètre est voisin de 1 mm (AESCHLIMANN, 1958). Nous avons prélevé, au hasard et à des dates différentes, 4 lots d'œufs fraîchement pondus, provenant chacun d'une autre femelle. Les pesées ont montré une très faible variabilité du poids moyen d'un œuf, d'un lot à un autre (Tableau 2).

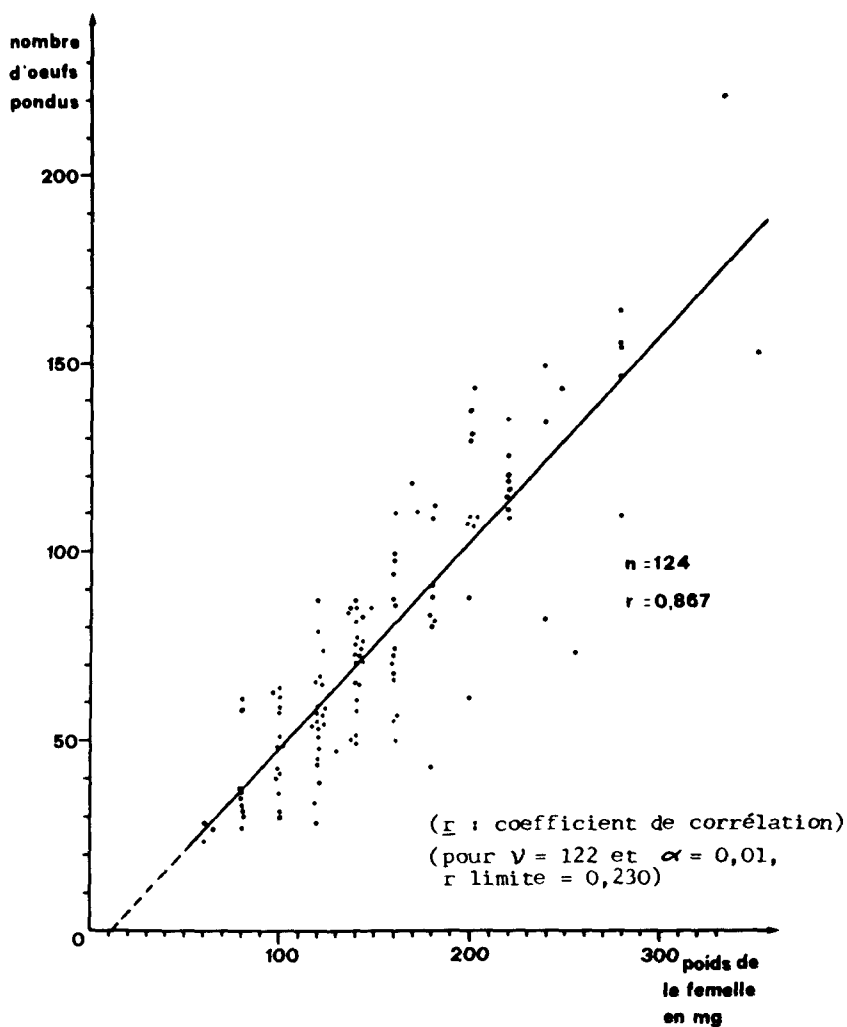


FIGURE 10

Influence du poids de femelles nourries depuis 100 jours et ayant subi une copulation retardée, sur le nombre d'œufs pondus. La droite figurée représente la droite de régression ($y = 0,541 x - 5,73$).

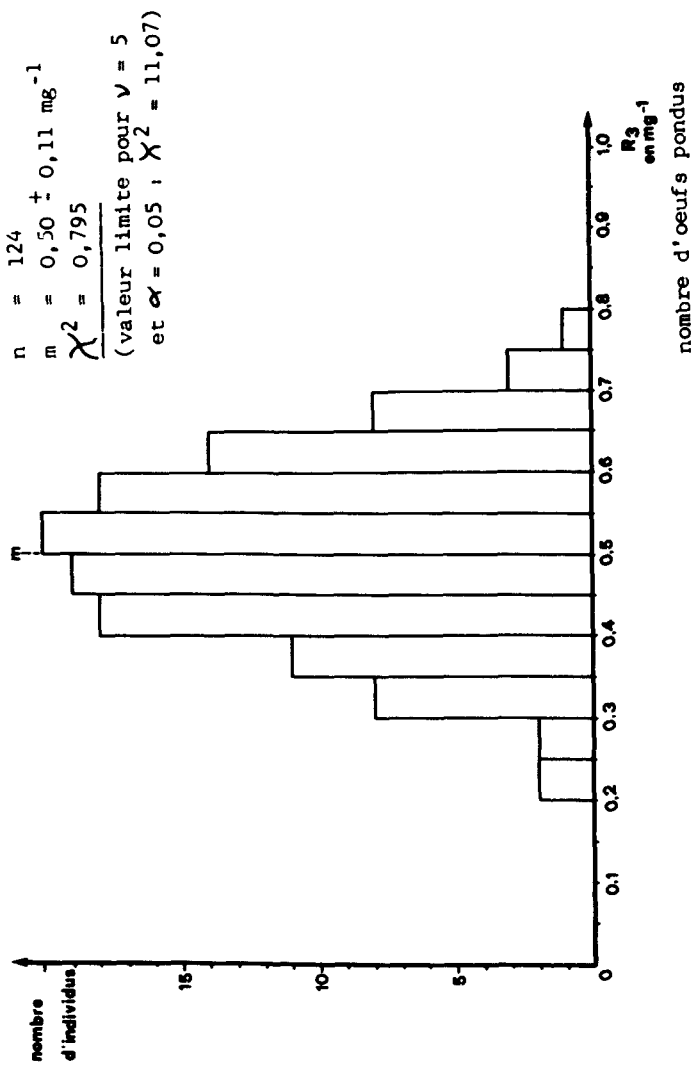


FIGURE 11 Examen de la distribution du rapport $R_3 = \frac{\text{nombre d'oeufs pondus}}{\text{poids de la } \varnothing \text{ nourrie depuis 100 jours}}$ d'après les données de la figure 10.

ponte no	nombre d'oeufs	poids (mg) de la ponte	poids moyen d'un oeuf (mg)
1	27	14,50	0,537
2	53	29,10	0,549
3	29	15,84	0,546
4	24	12,77	0,532

Tableau 2 : Poids moyen d'un oeuf fraîchement pondu estimé sur 4 pontes différentes.

L'oeuf d'O. moubata pèse donc environ 0,54 mg. En reprenant le rapport R_2 , on peut estimer qu'une femelle pondra 0,39 mg d'oeufs pour chaque mg. de sang concentré de cobaye. D'autre part, on peut également calculer le rendement de la ponte d'un individu nourri depuis 100 jours. La valeur moyenne correspond à 0,27 mg d'oeufs produits pour 1 mg de poids total de l'animal (calculé d'après le rapport R_3).

3.1.6. Poids des ovaires secs

Lors de la vitellogénèse, le poids de l'ovaire augmente considérablement à mesure que les ovocytes s'emplissent de vitellus. Selon GERMOND & AESCHLIMANN (1977), le vitellus des ovocytes de femelles vierges (qui ne pondent donc pas) est résorbé 100 jours après la nutrition.

Les ovaires de femelles appartenant à trois lots différents ont été pesés : tout d'abord, ceux de femelles vierges à jeun (diamètre des ovocytes env. 100μ), ensuite ceux de femelles vierges et nourries depuis 100 jours (diamètre des ovocytes

env. $150\mu^1$) et finalement ceux de femelles nourries en tant que vierges, ayant copulé après 100 jours (copulation retardée : AESCHLIMANN, 1968) et dont l'ovaire a été prélevé 8 jours après la copulation ²⁾. Le tableau 3 montre clairement de fortes différences de poids entre les ovaires des 3 catégories.

état physiologique des femelles	nombre de femelles	poids moyen d'un ovaire sec (μg) *
♀♀ vierges à jeun	37	80 \pm 30
♀♀ vierges nourries depuis 100 jours	59	220 \pm 80
♀♀ 8 jours après la copulation (copulation retardée: 100 jours après le repas sanguin)	7	2'390 \pm 920

Tableau 3 : Estimation du poids moyen d'un ovaire sec chez des femelles dans différents états physiologiques.

* m \pm s

m : moyenne

s : écart-type

- 1) Le vitellus est résorbé, mais les ovocytes ne reviennent pas vraiment à leur taille primitive. Leur diamètre correspond à peu près à celui des ovocytes en fin de période de prévitellogénèse (DIEHL, 1970).
- 2) A ce stade, les ovocytes sont lourdement chargés de vitellus (diamètre entre 500 et 800μ) et l'ovulation n'a pas encore commencé. Certains individus montraient néanmoins une vitellogénèse beaucoup moins avancée. Cela explique l'écart-type très élevé du tableau 3 (lot 3).

Cent jours après le repas, les ovaires secs sont encore trois fois plus lourds que chez l'individu à jeun. L'ovaire d'une femelle vierge ayant résorbé son vitellus n'est donc pas directement comparable à celui d'une femelle à jeun. Il contient une quantité plus élevée de matière. Le troisième lot indique, malgré une forte variabilité individuelle, un décuplement du poids sec dans les 8 jours suivant la copulation chez les femelles vierges nourries depuis 100 jours.

3.2. ACTION DE LA COPULATION SUR LA VITELLOGENESE ET LA PONTE : FACTEUR CHIMIQUE DU MÂLE

3.2.1. Détermination du poids moléculaire de la "substance active" du mâle

La "substance active" mise en évidence par GERMOND & AESCHLIMANN (1977) est récoltée à partir des spermiphores du mâle. L'injection de cette substance¹⁾ à 19 femelles vierges et nourries depuis 100 jours induit la ponte dans tous les cas (fig. 12). Des témoins constitués par des femelles ayant copulé et reçu une solution de NaCl 2% pondent également, dans 94 % des cas. Ceci ne correspond pas à une différence significative avec le lot précédent.

Une chromatographie d'exclusion de gel à l'aide d'une colonne de faible diamètre et d'un échantillon de volume relativement important (fig. 12) nous a donné une approximation du poids moléculaire de la "substance active". Un biotest a permis de tester chacune des fractions éluées sur la colonne.

La "substance active" a un volume d'élué correspondant à celui du Blue-Dextran, qui est l'indicateur du "volume vide" de la colonne. Cette substance, totalement exclue du gel, a donc un poids moléculaire supérieur à 800'000.

Le passage du Blue-Dextran et de la DNP-Alanine n'étant pas opéré simultanément avec le mélange actif sur la colonne, l'éventualité d'une liaison Blue-Dextran - Substance active est

1) Equivalent de 0,5 capsules spermatophoriques par femelle.

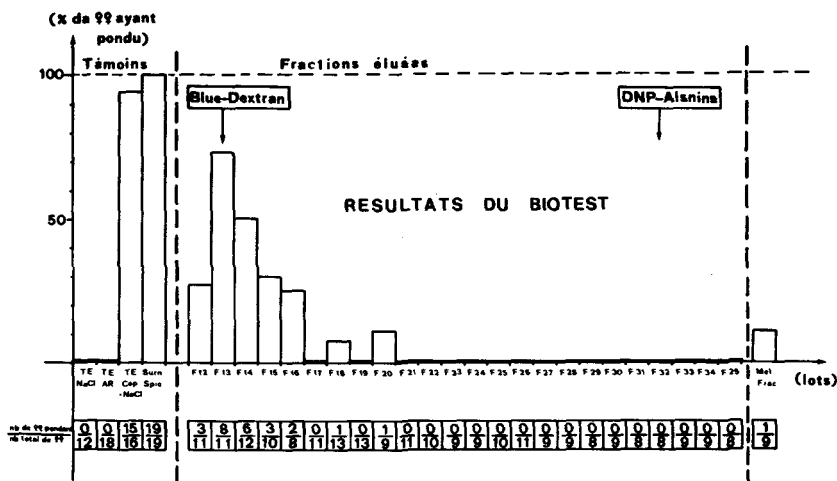


FIGURE 12 Détermination du poids moléculaire (le étape) de la substance active du surnageant de spermiphores, par biotest des fractions obtenues après chromatographie d'exclusion de gel.

La colonne est longue de 60 cm et son diamètre mesure 9 mm. Le gel (Sephadex G-200) permet la séparation des protéines de poids moléculaires compris entre 5'000 et 800'000.

Un volume de 700 μ l est appliqué sur la colonne, et des fractions de 1,2 ml (20 gouttes) sont récoltées.

Le biotest est effectué sur des femelles vierges et nourries depuis 100 jours, pour chacune des fractions :

- TE NaCl : témoins recevant NaCl 2 %
- TE AR : témoins recevant du Ringer pour Arachnides
- TE Cop + NaCl : témoins ayant copulé recevant NaCl 2 %
- Surm. Splo. : lot recevant l'échantillon brut (avant passage sur la colonne).
- Mél. Frac. : lot recevant un mélange à parts égales des fractions F 12 à F 35.
- F 12 : lot recevant la fraction No 12.
- :
- :
- :
- F 35 : lot recevant la fraction No 35

impossible. Le test de probabilité exacte de FISHER nous montre que, lors du biotest, les réponses obtenues avec les fractions F 13 et F 14 diffèrent de celle résultant d'une injection de NaCl à 2 % (différence hautement significative : $P < 1\%$) (Tableau 4). D'autre part, la fraction F 13 donne une meilleure stimulation de la ponte que la fraction F 12 ($P < 5\%$).

Lots comparés	Différence significative à $P \leq 5\%$
TE Cop + NaCl - Surn.Spio	non (P = 65 %)
TE NaCl - F ₁₂	non (P = 9,3 %)
TE NaCl - F ₁₃	oui (P = <u>0,03</u> %)
TE NaCl - F ₁₄	oui (P = <u>0,69</u> %)
TE NaCl - F ₁₅	non (P = 7,8 %)
TE NaCl - F ₁₆	non (P = 14,7 %)
TE NaCl - F ₁₈	non (P = 52 %)
TE NaCl - F ₂₀	non (P = 43 %)
TE NaCl - Mel Frac.	non (P = 43 %)
F ₁₂ - F ₁₃	oui (P = <u>4,3</u> %)
F ₁₄ - F ₁₃	non (P = 25 %)
F ₁₅ - F ₁₃	non (P = 6,3 %)

Tableau 4 : Substance active du mâle : comparaisons statistiques par le test de probabilité exacte de FISHER (alternative simple) des différentes réponses enregistrées lors du biotest effectué avec les fractions obtenues après la première étape de la détermination du poids moléculaire.

La signification des abréviations est donnée dans la légende de la fig. 12.

Les probabilités inférieures à 5 % (soulignées) correspondent à une différence significative des deux lots comparés.

Le mélange des différentes fractions (F 12 à F 35) a également été soumis au biotest. Une seule femelle parmi 9 a pondu. Il n'a donc pas été possible de montrer une activité nette de ce mélange. Ceci peut être dû à une dilution excessive ¹⁾ de notre échantillon. La substance active recherchée se comporte comme étant de très haut poids moléculaire.

Ceci nous a conduit à utiliser le Bio-Gel A-5 M, permettant une plage de séparation plus étendue. Nous basant sur les résultats de la première étape, le biotest n'a été effectué que sur les fractions de haut poids moléculaire. Les résultats sont consignés sur la figure 13. La "substance active" apparaît avec un maximum d'intensité à la fraction F 17. Les fractions F 16, F 17 et F 18 donnent des réponses significativement différentes de celles des témoins ($P < 5\%$) (Tableau 5). On peut donc placer le pic d'activité de la substance dans la zone d'éluion comprise entre 315 et 345 gouttes. Après étalonnage de la colonne et suivant la droite obtenue, ces valeurs correspondent à un poids moléculaire situé entre 1'500'000 et 4'100'000. Comme précédemment, la "substance active" brute a été injectée à 19 femelles et a provoqué un fort pourcentage de pontes. Toutefois, ce pourcentage était légèrement inférieur à celui obtenu chez les femelles témoins ayant copulé et reçu une injection de NaCl, sans qu'une différence significative soit décelable. Le mélange des fractions (lot Mel. Frac., dilution de facteur 25 par rapport à Surn. Spio) ne montre aucune réponse. La dilution paraît trop importante pour conserver des propriétés gonadotropes à la solution.

1) Un calcul simple nous indique une dilution d'environ 40 fois entre Surn. Spio et Mel. Frac.

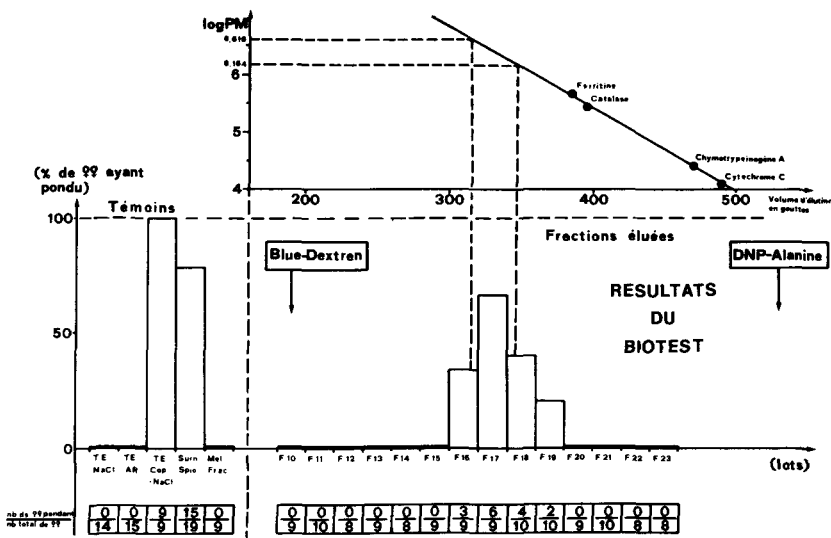


FIGURE 13 Détermination du poids moléculaire (2e étape) de la substance active du surnageant de spermiphores, par biotest des fractions obtenues après chromatographie d'exclusion de gel.

Le résultat du test est comparé à une droite étalon établie par élution de protéines standards.

La colonne est longue de 60 cm et son diamètre mesure 9 mm. Le gel (Bio-Gel A-5M) permet la séparation des protéines de poids moléculaires compris entre 10'000 et 5'000'000.

Un volume de 700 μ l est appliqué sur la colonne et des fractions de 1,2 ml (20 gouttes) sont récoltées.

Le biotest est effectué sur des femelles vierges et nourries depuis 100 jours, pour chacune des fractions :

- TE NaCl : témoins recevant NaCl 2 %
- TE AR : témoins recevant du Ringer pour Arachnides
- TE Cop + NaCl : témoins ayant copulé recevant NaCl 2 %
- Surv. Spio. : lot recevant l'échantillon brut (avant passage sur la colonne)
- Mel. Frac. : lot recevant un mélange à parts égales des fractions F 10 à F 23.
- F 10 : lot recevant la fraction No 10
- ⋮
- F 23 : lot recevant la fraction No 23

Equation de la droite de régression : $y = - 0,0144 x + 11,152$

Lots comparés	Différence significative à $P \leq 5\%$
Surn. Spio. - TE Cop+NaCl	non ($P = 25,2\%$)
TEAR - Surn.Sprio	oui ($P < \underline{0,01}\%$)
TE NaCl - F ₁₆	oui ($P = \underline{4,7}\%$)
TE NaCl - F ₁₇	oui ($P = \underline{0,08}\%$)
TE NaCl - F ₁₈	oui ($P = \underline{2,0}\%$)
TE NaCl - F ₁₉	non ($P = 16,3\%$)
F ₁₆ - F ₁₇	non ($P = 17,3\%$)
F ₁₈ - F ₁₇	non ($P = 24,2\%$)
F ₁₉ - F ₁₇	non ($P = 5,5\%$)

Tableau 5 : Substance active du mâle ; comparaisons statistiques par le test de probabilité exacte de FISHER (alternative simple) des différentes réponses enregistrées lors du biotest effectué avec les fractions obtenues après la deuxième étape de la détermination du poids moléculaire.

La signification des abréviations est donnée dans la légende de la fig. 13.

Les probabilités inférieures à 5 % (soulignées) correspondent à une différence significative des deux lots comparés.

Cette dernière expérience nous permet donc de situer le poids moléculaire apparent de la "substance active" entre $1,5 \cdot 10^6$ et $4,1 \cdot 10^6$.

Pour affiner les résultats, nous avons donc pris une colonne de plus fort diamètre et réduit le volume de l'échantillon et des fractions. Le calibrage de la colonne a été amélioré par augmentation du nombre de protéines étalons (fig. 14). Le biotest a été effectué sur 11 fractions seulement, au vu des résultats précédents. Nous trouvons une activité dans toutes les fractions situées entre F 81 et F 85, le maximum étant localisé au niveau de F 83. Ce dernier échantillon est d'ailleurs le seul à donner une réponse différant significativement de celle de TE NaCl (Tableau 6). De façon logique, nous pouvons localiser le pic d'activité entre 815 et 830 gouttes, ce qui correspond à un poids moléculaire compris entre 1'600'000 et 1'900'000. Pour cette troisième expérience, il est frappant de constater, dans l'ensemble, des réponses relativement faibles, comparées à celles des deux premières expériences. En effet, même pour la fraction F 83, moins du 40 % des femelles pondent. Ce phénomène pourrait être expliqué par le faible volume de l'échantillon appliqué et la capacité relativement grande de la colonne; ces deux facteurs entraînent une plus forte dilution de la substance dans les fractions. Nous verrons plus loin (Tableau 7) l'influence de diverses dilutions sur la réponse des femelles.

Ici également, les différences ne sont pas significatives entre les deux lots de témoins ayant copulé. Les injections d'échantillon brut semblent stimuler la vitellogénèse et la ponte de façon comparable à la copulation (différence non-significative entre les lots concernés) (Tableau 6).

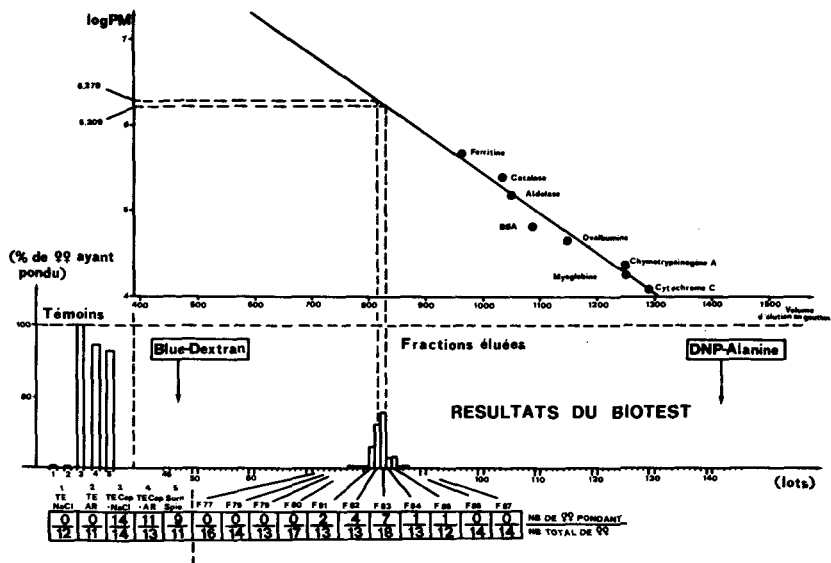


FIGURE 14 Détermination du poids moléculaire (3e étape) de la substance active du surnageant de spermophores, par biotest des fractions obtenues après chromatographie d'exclusion de gel.

Le résultat du test est comparé à une droite étalon établie par élution de protéines standards.

La colonne est longue de 60 cm et son diamètre mesure 15 mm. Le gel (Bio-Gel A-5M) permet la séparation des protéines de poids moléculaires compris entre 10'000 et 5'000'000.

Un volume de 150 μ l est appliqué sur la colonne et des fractions de 0,6 ml (10 gouttes) sont récoltées.

Le biotest est effectué sur des femelles vierges et nourries depuis 100 jours, pour chacune des fractions :

- TE NaCl : témoins recevant NaCl 2 %
- TE AR : témoins recevant du Ringer pour Arachnides
- TE Cop + NaCl : témoins ayant copulé recevant NaCl 2 %
- TE Cop + AR : témoins ayant copulé recevant du Ringer pour Arachnides
- Surn. Splo. : lot recevant l'échantillon brut (avant passage sur la colonne)
- F 77 : lot recevant la fraction No 77
- ...
- F 87 : lot recevant la fraction No 87

Equation de la droite de régression : $y = - 0,0046 x + 10,027$

Lots comparés	Différence significative à $P \leq 5\%$
TE AR - Surn. Spio.	oui ($P = \underline{0,01}\%$)
TE Cop + AR - TE Cop + NaCl	non ($P = 28,1\%$)
Surn. Spio - TE Cop + AR	non ($P = 64\%$)
Surn. Spio. - TE Cop + NaCl	non ($P = 22,2\%$)
TE NaCl - F ₈₁	non ($P = 26\%$)
TE NaCl - F ₈₂	non ($P = 5,6\%$)
TE NaCl - F ₈₃	oui ($P = \underline{1,6}\%$)
TE NaCl - F ₈₄	non ($P = 52\%$)
TE NaCl - F ₈₅	non ($P = 50\%$)
F ₈₁ - F ₈₃	non ($P = 15\%$)
F ₈₂ - F ₈₃	non ($P = 47\%$)
F ₈₄ - F ₈₃	non ($P = 5,8\%$)
F ₈₅ - F ₈₃	non ($P = 7,3\%$)

Tableau 6 : Substance active du mâle : comparaisons statistiques par le test de probabilité exacte de FISHER (alternative simple) des différentes réponses enregistrées lors du biotest effectué avec les fractions obtenues après la troisième étape de la détermination du poids moléculaire.

La signification des abréviations est donnée dans la légende de la fig. 14.

Les probabilités inférieures à 5% (soulignées) correspondent à une différence significative des deux lots comparés.

3.2.2. Injections de broyats de testicules, glandes annexes et vésicules séminales

Afin de préciser les résultats de GERMOND & AESCHLIMANN (1977), des testicules, glandes annexes et vésicules séminales ont été broyés et centrifugés. Le surnageant obtenu, ainsi que les différentes fractions obtenues après son passage sur une colonne de Bio Gel A-5 M, ont été injectés à des femelles.

3.2.2.1. Glandes annexes et testicules

Les surnageants obtenus par broyat de glandes annexes ou de testicules ainsi que les différentes fractions d'éluion de ces surnageants n'ont pas provoqué de ponte chez les femelles vierges nourries depuis 100 jours. Leur dissection, 25 jours après l'injection, a montré que les ovaires ne présentaient aucun signe de vitellogénèse.

Bien qu'une action protéolytique due à des enzymes intrinsèques ne soit pas totalement à exclure, il semble que la substance recherchée ne soit pas présente dans les testicules ou les glandes annexes du mâle.

3.2.2.2. Vésicules séminales

Des surnageants de broyats de vésicules séminales (équival. 1/2 ♂ par ♀) ainsi que différentes dilutions de ces surnageants ont été injectés à des femelles vierges, nourries depuis 100 jours (Tableau 7). Les témoins ayant copulé et reçu NaCl 2 % pondent dans 93 % des cas, les femelles ayant été injectées avec le broyat brut dans 71 % des cas. L'activité de la substance décroît ensuite avec sa dilution progressive. Tous les individus qui n'ont pas pondu ont été disséqués. Nous n'avons observé aucun ovaire en vitellogénèse. Des broyats de vésicules séminales sont donc capables de provoquer la ponte lorsqu'ils sont injectés à des femelles vierges nourries depuis 100 jours.

En revanche, les fractions récoltées à la sortie d'une colonne ne montrent aucune activité, du moins pour la zone de poids moléculaire testée, laquelle est située entre $1,1 \cdot 10^6$ et $2,8 \cdot 10^6$.

lot	$\frac{\text{nombre de } \text{♀♀} \text{ pondant}}{\text{nombre total de } \text{♀♀}}$	% de ♀♀ pondant
TE NaCl	0/18	0
TE Cop + NaCl	14/15	93
VS brut	10/14	71
VS brut D5	8/16	50
VS brut D25	1/17	6

Tableau 7 : Injection de broyats de vésicules séminales à des femelles vierges et nourries depuis 100 jours : pourcentage de femelles ayant pondu après 25 jours.

- TE NaCl : femelles témoins ayant reçu NaCl 2 %.
- TE Cop + NaCl : femelles témoins ayant copulé et recevant NaCl 2 %.
- VS brut : femelles ayant reçu le surnageant d'un broyat de vésicules séminales avant passage sur la colonne (équival. 1/2 ♂ par ♀).
- VS brut D5 : idem VS brut, mais dilué 5 fois avec NaCl 2 % (équival. 1/10 ♂ par ♀).
- VS brut D25 : idem VS brut, mais dilué 25 fois avec NaCl 2 % (équival. 1/50 ♂ par ♀).

L'analyse statistique confirme une très bonne activité du broyat jusqu'à la dilution 5 (équival. 1/10 ♂ par ♀), ce qui permet d'exclure la possibilité d'une trop faible concentration dans l'éluat (Tableau 8). Pour la dilution 25, la solution devient pratiquement inactive, le test statistique utilisé ne montrant pas de différence significative avec les témoins.

Lots comparés	Différence significative à $P < 5\%$
TE NaCl - VS brut	oui ($P < \underline{0,01}\%$)
TE NaCl - VS brut D5	oui ($P = \underline{0,07}\%$)
TE NaCl - VS brut D25	non ($P = 49\%$)
VS brut - TE Cop + NaCl	non ($P = 14\%$)
VS brut D5 - VS brut	non ($P = 21\%$)
VS brut D25 - VS brut	oui ($P = \underline{0,02}\%$)
VS brut D25 - VS brut D5	oui ($P = \underline{0,60}\%$)

Tableau 8 : Comparaisons statistiques par le test de probabilité exacte de FISHER (alternative simple) des différentes réponses enregistrées après injection de broyats de vésicules séminales.

La signification des abréviations est donnée dans la légende du tableau 7.

Les probabilités inférieures à 5 % (soulignées) correspondent à une différence significative des deux lots comparés.

Nous avons montré qu'il existait une bonne corrélation entre le poids d'une femelle vierge nourrie depuis 100 jours et le nombre d'oeufs qu'elle pondra après une copulation retardée. Le rapport R_3 ¹⁾ est distribué normalement, ce qui permet la comparaison d'échantillons par un test t de STUDENT. Nous avons comparé ainsi 3 lots entre eux (Tableaux 9 et 10). Les rendements moyens sont très voisins les uns des autres ($0,43 \leq \overline{R_3} \leq 0,52$). Le test t de STUDENT ne permet pas de conclure à une différence significative au seuil de 5 %. Ceci laisse supposer que l'action de la substance stimulant la vitellogénèse et la ponte est plutôt du type "tout ou rien".

1) défini sous 3.1.4. : $R_3 = \frac{\text{nb. d'oeufs pondus}}{\text{poids de la femelle}}$

Lot	nombre de ♀♀ ayant pondu	\bar{R}_3 *
TE Cop + NaCl	14	0,44 \pm 0,07
VS brut	10	0,52 \pm 0,14
VS brut D5	8	0,43 \pm 0,07

Tableau 9 : Injection de broyats de vésicules séminales :
calcul du "rendement" moyen des pontes de
3 lots.

$$* R_3 = \frac{\text{nombre d'oeufs pondus}}{\text{poids de la femelle en mg}}$$

La signification des abréviations est donnée dans
la légende du tableau 7.

Lots comparés	t
TE Cop + NaCl - VS brut	1,85
TE Cop + NaCl - VS brut D5	0,32
VS brut - VS brut D5	1,65

Tableau 10 : Injection de broyats de vésicules séminales :
comparaisons statistiques des "rendements"
moyens \bar{R}_3 par le test t de STUDENT.

Aucune différence n'est détectée entre les
lots comparés à un seuil de 5 %.

La signification des abréviations est donnée
dans la légende du tableau 7.

3.2.3. Femelles nourries une deuxième fois après stimulation chimique de la vitellogénèse et de la ponte

Toutes les tiques ayant pondu après injection d'homogénat de vésicules séminales ont été nourries une nouvelle fois 78 jours après l'injection.

Nous avons également donné un deuxième repas de sang aux femelles témoins de la même expérience (vierges¹⁾ ou non). Après 25 jours, des pontes ont été enregistrées dans tous les lots, sauf chez les témoins vierges (Tableau 11).

La totalité des femelles ont pondu, sauf une exception pour la dilution 5.

L'injection d'homogénats de vésicules séminales provoque donc un stimulus qui persiste très longtemps.

Lot	<u>nombre de ♀♀ pondant</u> nombre total de ♀♀	% de ♀♀ pondant
TE Cop + NaCl	7/7	100
TE NaCl	0/15	0
VS brut	9/9	100
VS brut D5	6/7	86

TABLEAU 11 : Etude de la persistance de l'effet gonadotrope d'un broyat de vésicules séminales :
Pourcentages de ponte, obtenus après seconde nutrition de femelles ayant déjà pondu une fois. Cent jours après le premier repas sanguin, les femelles ont reçu une injection d'un broyat de vésicules séminales, ce qui a provoqué la première ponte. Le deuxième repas sanguin s'est déroulé 78 jours après cette injection. Pour les abréviations utilisées, voir Tableau 7.

1) Ces femelles, n'ayant pas pondu lors de la première expérience, se sont tout de même nourries sans problèmes 78 jours après l'injection de la solution saline.

3.2.4. Digestion de la substance active par la trypsine

Il ressort des expériences susmentionnées ainsi que des travaux de GERMOND & AESCHLIMANN (1977) que la substance active pourrait être une protéine (thermolabilité, haut poids moléculaire). Pour essayer de vérifier cette hypothèse, nous avons tenté une digestion enzymatique à l'aide de trypsine insoluble et en utilisant comme témoin un échantillon subissant une digestion dans l' α -amylase, insoluble également. Comme source de substance active, nous avons pris un surnageant de broyats de vésicules séminales¹⁾. Les injections ont été faites sur 4 lots (Tableau 12) et les pontes contrôlées après 25 jours.

Lot	<u>nombre de ♀♀ pondant</u> nombre total de ♀♀	% de ♀♀ pondant
♀♀ ayant copulé: injection de tampon phosphate	12/20	60
♀♀ vierges : injection de surnageant non traité	11/21	52
♀♀ vierges : injection de surnageant traité par la trypsine (30' à 30°C)	8/14	57
♀♀ vierges : injection de surnageant traité par l'amylase (30' à 30°C)	9/17	53

TABLEAU 12 : Effet d'une digestion enzymatique de la substance produite par le mâle sur son pouvoir d'induction de la vitellogénèse et de la ponte chez la femelle vierge. Les surnageants des broyats de vésicules séminales sont soit injectés directement, soit traités par la trypsine ou l'amylase.

1) Préparation selon matériel et méthodes : NaCl 2 % est remplacé par un tampon phosphate pH 8,0; 133 mM.

Relevons tout d'abord que les témoins ayant copulé n'ont pondu que dans le 60 % des cas. Cette situation est peut-être due au tampon phosphate qui peut présenter certains effets toxiques à l'injection. Néanmoins, on observe que les variations entre les réponses de chaque lot ne sont pas significativement différentes (test de probabilité exacte de FISHER). Par conséquent, l'activité ne semble pas avoir diminué sous l'effet de la trypsine. A titre de comparaison, nous avons effectué une digestion témoin dans les mêmes conditions expérimentales, mais en prenant la caséine comme substrat (concentration initiale : 6 mg/ml). Après 30 minutes, l'enzyme avait digéré plus des 95 % de la substance.

3.3. ACTION DE LA COPULATION SUR LA VITELLOGENESE ET LA PONTE : STIMULATION MECANIQUE

3.3.1. Stimulation mécanique par implantation de billes métalliques dans le vagin et l'utérus

Afin de déterminer le rôle de la stimulation mécanique opéré par la copulation, nous avons mimé celle-ci en introduisant des billes métalliques dans le vagin et l'utérus de femelles vierges, nourries depuis 100 jours.

Une semaine plus tard, une partie des femelles ont été disséquées et leur ovaire pesé après dessiccation. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 13. Le poids moyen des ovaires des femelles stimulées par les billes d'acier est très nettement supérieur à celui des témoins non traités et ne diffère pas statistiquement de celui des femelles ayant copulé (Tableau 14). Ceci confirme l'observation des ovocytes lors de la dissection. Ceux-ci étaient pour la plupart déjà fortement chargés de vitellus.

lot	nombre d'individus	poids moyen d'un ovaire sec (μg)
TE Cop	5	1500 \pm 1360
TE	10	270 \pm 170
B	10	1060 \pm 680

Tableau 13 : Mesure du poids sec d'ovaires de femelles vierges traitées à l'aide de billes d'acier dans l'utérus. Les organes sont prélevés et pesés 7 jours après le traitement.

TE : femelles témoins n'ayant subi aucune manipulation
 B : femelles traitées avec des billes d'acier
 TE Cop : femelles témoins ayant copulé

lots comparés	différence significative à $P \leq 5\%$
TE - B	oui ($P = \underline{0,1\%}$)
TE - TE Cop	oui ($P = \underline{0,7\%}$)
B - TE Cop	non ($P = 43\%$)

Tableau 14 : Stimulation mécanique de la vitellogénèse; comparaisons statistiques par le test de la médiane des données du tableau 13.

La signification des abréviations est donnée dans la légende du tableau 13.

Les probabilités inférieures à 5% (soulignées) correspondent à une différence significative des deux lots comparés.

La plupart des femelles pondent dans les 25 jours suivant le traitement. Le pourcentage de pontes est un peu plus élevé chez les témoins ayant copulé que chez les individus stimulés mécaniquement (Tableau 15). La différence n'est cependant pas significative (test de probabilité exacte de FISHER : $P = 43\%$). Par contre, le rendement est supérieur chez les témoins ayant copulé. Le test t de STUDENT le confirme ($P < 5\%$). Nous n'avons pas nourri à nouveau les femelles stimulées mécaniquement. Nous ne savons donc pas si ce mode d'action est "mémorisé", comme c'est le cas après injection de la substance active (voir 3.2.3.).

3.3.2. Synergie entre stimulation mécanique et chimique

Ayant établi qu'une stimulation mécanique pouvait provoquer la ponte chez des femelles vierges, il devenait intéressant de voir s'il existait une synergie entre ce genre d'action et un stimulus

lot	$\frac{\text{nombre de } \text{♀♀} \text{ pondant}}{\text{nombre total de } \text{♀♀}}$	% de ♀♀ pondant	$\bar{R}_3 \text{ (mg}^{-1}\text{)}$
TE Cop	$\frac{7}{8}$	88	$0,59 \pm 0,10$
TE	$\frac{0}{15}$	0	---
B	$\frac{11}{15}$	73	$0,42 \pm 0,19$

Tableau 15 : Effet de la stimulation mécanique de l'utérus par des billes d'acier sur la ponte.

$$\bar{R}_3 = \text{rendement moyen } \left(\frac{\text{nombre d'oeufs pondus}}{\text{poids de la femelle en mg}} \right)$$

La signification des abréviations est donnée dans la légende du tableau 13.

chimique (voir 3.2.).

Plusieurs combinaisons de ces deux traitements ont été utilisées afin de tester leurs effets sur le pourcentage de femelles pondant, le rendement moyen de ponte et le poids moyen des ovaires secs des femelles. Les résultats sont consignés au tableau 16.

Le poids sec des ovaires, prélevés après une semaine, est très variable. Néanmoins, nous observons dans l'ensemble un net accroissement du poids sec de l'ovaire chez les femelles traitées (ou ayant copulé ¹⁾) par rapport aux témoins vierges. Vingt-cinq jours après le traitement, les pontes des individus restant ont été répertoriées. Selon les lots, 40 à 100 % des femelles traitées ont pondu. Seuls les témoins vierges n'ont pas réagi. Les pourcentages de ponte obtenus avec le traitement par les billes d'acier sont toutefois toujours inférieurs à ceux résultant d'une stimulation chimique ou d'une combinaison entre les stimulations mécaniques et chimiques. Il est à noter qu'aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre ces deux derniers lots (Tableau 17). Il semble donc que l'injection de substance active ait une action gonadotrope plus puissante que la distension du vagin et de l'utérus provoquée par les billes. D'autre part, le rendement de ponte \overline{R}_3 a été estimé et ne semble pas varier considérablement selon les lots. Les valeurs de t (Tableau 17), bien inférieures aux limites des tables, montrent que ces rendements ne sont pas statistiquement différents entre eux. Il ressort donc que les deux types de stimuli font pondre les femelles. L'action mécanique seule semble cependant plus faible que la copulation naturelle. Le double stimulus ne donne pas une meilleure réponse que le traitement chimique seul. Les rendements \overline{R}_3 , quoique faibles dans l'ensemble, sont tous comparables entre eux.

1) Les 5 femelles, disséquées après 10 jours et provenant du lot de témoins ayant copulé, ont montré des ovaires sans signes visibles de vitellogénèse. Nous n'avons pu expliquer ce résultat négatif, d'autant plus que les autres tiques de ce lot ont pondu dans 90 % des cas avant 25 jours.

lot	nombre de % pondant nombre total de %	% de % pondant	\bar{R}_3	rendement moyen de ponte, (mg^{-1})	poils moyen d'un ovaire sec (μg) (calculé sur 5 individus)
TE Cop	9/10	90		0,43 \pm 0,17	270 \pm 70 ¹⁾
TE Cop AR	11/13	85		0,49 \pm 0,09	750 \pm 850
TE	0/12	0		---	240 \pm 50
TE AR	0/11	0		---	210 \pm 40
B	5/9	56		0,40 \pm 0,18	460 \pm 510
Surn.Sp10	9/11	82		0,46 \pm 0,15	670 \pm 210
BAR	4/10	40		0,44 \pm 0,16	690 \pm 540
B.Surn.Sp10	8/8	100		0,51 \pm 0,15	310 \pm 160

TABLEAU 16 : Traitement de femelles vierges par diverses combinaisons obtenues à partir de 2 types de stimulation (mécanique et chimique) ; effet sur la ponte et le rendement moyen \bar{R}_3 .
Le poids sec des ovaires est estimé sur 5 autres femelles disséquées 10 jours après le traitement.

- TE : femelles témoins n'ayant subi aucune manipulation
 TE AR : femelles témoins ayant reçu une solution de Ringer pour Arachnides
 B : femelles traitées avec des billes d'acier dans l'utérus
 Surn.Sp10 : femelles traitées par injection de surnageant de spermiphores
 BAR : femelles traitées avec des billes d'acier dans l'utérus et une injection de Ringer pour Arachnides
 B.Surn.Sp10 : femelles traitées à l'aide du double stimulus (billes d'acier dans l'utérus et injection de surnageant de spermiphores)
 TE Cop : femelles témoins ayant copulé
 TE Cop AR : femelles témoins ayant copulé, avec une injection de Ringer pour Arachnides

1) Voir note p. 58.

Lots comparés	Comparaison des pourcentages de ponte: différence significative à $P \leq 5\%$	Comparaison des rendements $\bar{R}_3 : t$
TE - B	oui (P = <u>0,6</u> %)	---
TEAR - Surn,Spio	oui (P < <u>0,1</u> %)	---
TEAR - BAR	oui (P = <u>3,5</u> %)	---
BAR - B.Surn.Sprio	oui (P = <u>1,2</u> %)	0,75
BAR - Surn.Sprio	non (P = 6,3 %)	0,22
B - Surn.Sprio	non (P = 22 %)	0,67
B - B Surn.Sprio	non (P = 5,9 %)	1,19
Surn.Sprio-B.Surn.Sprio	non (P = 44 %)	0,69
B - TE Cop	non (P = 12 %)	0,31
BAR - TE Cop AR	oui (P = <u>3,7</u> %)	0,78

Tableau 17 : Traitement de femelles vierges par diverses combinaisons obtenues à partir de 2 types de stimulation (mécanique et chimique) : comparaison par le test de probabilité exacte de FISHER (alternative simple) des pourcentages de femelles pondant et des rendements par le test t de STUDENT.

Pour le test de FISHER, les probabilités inférieures à 5 % (soulignées) correspondent à une différence significative des deux lots comparés.

Les rendements moyens (\bar{R}_3) ne diffèrent pas significativement les uns des autres.

La signification des abréviations est donnée dans la légende du tableau 16.

3.3.3. Durée de la préoviposition

Pour les deux expériences ci-dessus, la durée de la préoviposition est pratiquement identique dans les différents lots, que l'on considère les témoins ayant copulé, les femelles stimulées soit mécaniquement soit chimiquement, ou les deux à la fois. Cette durée est de 9 à 22 jours.

Signalons encore que les billes d'acier sont expulsées par les femelles dans les jours qui précèdent la ponte ou à son début.

3.4. EFFETS GONADOTROPES LIES A L'IMPLANTATION DE "CERVEAUX"

3.4.1. Broyats de "cerveaux"

L'injection de broyats de "cerveaux" non centrifugés ¹⁾ a provoqué la mort, après 4 à 5 jours, de la majorité des femelles traitées. Les quelques survivantes n'ont montré aucune vitellogénèse lors de la dissection.

L'expérience a été répétée en centrifugeant l'homogénat et en injectant le surnageant à différentes dilutions (1/1; 1/5; 1/10; 1/50). Les tiques donneuses s'étaient gorgées une semaine auparavant. Elles étaient soit vierges, soit elles avaient copulé. Dans cette expérience, la survie des femelles a été totale, mais la dissection n'a montré pratiquement aucune vitellogénèse. L'homogénéisation des "cerveaux" a été alors abandonnée au profit d'expériences de transplantation.

3.4.2. Transplantations de "cerveaux"

Pour savoir si l'implantation de "cerveaux" pouvait stimuler la vitellogénèse et la ponte, nous avons fait une série d'expériences avec des tiques donneuses d'état physiologique différent.

- 1) Equivalent de 1 "cerveau" par femelle.
Provenance : - femelles vierges à jeun
- femelles vierges et nourries depuis 7 jours
- femelles ayant copulé et nourries depuis 7 jours.

3.4.2.1. Donneuses nourries depuis 2 jours et ayant copulé

Les "cerveaux" prélevés ont été implantés sur des femelles vierges nourries depuis 100 jours. Lors d'une expérience préliminaire, aucune femelle n'avait pondu dans un délai de un mois suivant l'opération. Cependant, à la dissection, beaucoup d'individus présentaient des traces très nettes de vitellus en voie de résorption. De ce fait, les dissections lors des expériences suivantes ont été réalisées 14 jours après l'opération. Nous avons déterminé le pourcentage de femelles "positives" par l'examen des ovaires (critères selon 2.4.3).

Les résultats sont consignés au tableau 18. On constate tout d'abord que le traumatisme opératoire ne semble pas avoir eu d'influence sur la vitellogénèse. Par contre, les femelles ayant subi la transplantation ont réagi au stimulus : 56 % d'entre elles ont présenté des ovocytes bruns à la dissection. Le test de FISHER nous indique une différence hautement significative entre les témoins opérés et les femelles ayant reçu un "cerveau" ($P = 0,2 \%$). Dans ce cas, la transplantation a donc eu une action stimulante sur la vitellogénèse. Cependant, la majorité des ovaires ont présenté une vitellogénèse de type

Traitement subi	Nombre de ♀♀ traitées	Nombre de ♀♀ positives (selon 2.4.3)	% de ♀♀ positives
Aucune opération	18	2	11
Opération "blanche"	18	2	11
Transplantation de "cerveaux"	32	18	56

Tableau 18 : Effet de la transplantation de "cerveaux" de femelles nourries depuis 2 jours et ayant copulé, à des femelles vierges nourries depuis 100 jours.

abortif, c'est-à-dire semblable à celle observée chez des femelles vierges et nourries, par AESCHLIMANN (1968) et GERMOND & AESCHLIMANN (1977)¹⁾. Dans notre expérience, nous avons remarqué l'amorce de la résorption du vitellus car la dissection a été faite relativement tôt²⁾. En outre, aucune tique traitée n'a pondu dans le délai de 14 jours séparant l'opération de la dissection. On peut donc conclure que des "cerveaux" de femelles ayant copulé et nourries depuis 2 jours peuvent avoir une faible action gonadotrope s'ils sont transplantés à des individus vierges et nourris depuis 100 jours.

3.4.2.2. Donneuses dans différents états physiologiques

D'autres expériences de transplantation ont été réalisées avec des "cerveaux" provenant de femelles vierges, de femelles ayant copulé ou de mâles à différents stades physiologiques. Les femelles receveuses (vierges et gorgées depuis 100 jours) ont été disséquées 14 jours après l'opération et l'ovaire examiné. Les résultats sont consignés dans le tableau 19. A la dissection, tous les lots présentaient un taux élevé de femelles en vitellogénèse (38 à 52 %), excepté les deux lots témoins (10 et 11 %). L'état physiologique du donneur (nombre de jours après le repas sanguin, sexe, virginité) ne semble pas influencer significativement la réponse observée (test de FISHER, $P > 5\%$). De plus, le test de FISHER montre que la réponse de chacun des lots diffère de façon significative ($P \leq 5\%$) par rapport à celle des témoins. Il indique également que le traumatisme opératoire n'a pas d'influence sur la vitellogénèse. Dans cette expérience, toutes les vitellogénèses observées étaient de type abortif. Le diamètre des plus grands ovocytes ne dépassait pas 600 μm et aucune ovulation n'a été observée.

- 1) Cet état est caractérisé par des ovocytes de formes irrégulières, au vitellus "liquéfié" (Planche I, fig. 3; AESCHLIMANN, 1968).
- 2) La désagrégation des granules vitellins commence à la périphérie de l'ovocyte.

Traitement subi	Etat physiologique des donneurs	Nombre de ♀♀ traitées	Nombre de ♀♀ positives (selon 2.4.3)	% de ♀♀ positives
Aucune opération	---	20	2	10
Opération "blanche"	---	19	2	11
Transplantation	à jeun	26	13	50
- " -	nourries depuis 0* jours	24	10	42
- " -	nourries depuis 4 jours	24	10	42
- " -	nourries depuis 12 jours	24	9	38
- " -	nourries depuis 25 jours	22	10	45
Transplantation	à jeun	24	11	46
- " -	nourries depuis 0* jours	29	14	48
- " -	nourries depuis 4 jours	28	12	43
- " -	nourries depuis 12 jours	28	14	50
- " -	nourries depuis 25 jours	21	11	52
Transplantation	à jeun	20	8	40
- " -	nourris depuis 10 jours	19	8	42

Tableau 19 : Effet de la transplantation de "cerveaux" de donneurs dans différents états physiologiques à des femelles vierges nourries depuis 100 jours.

*La transplantation a lieu dans les deux heures suivant le repas sanguin.

En résumé, l'implantation d'un "cerveau" induit une vitellogénèse, laquelle est abortive, quels que soient le sexe et l'état physiologique de la tique donneuse.

3.4.2.3. Transplantation de "cerveaux" avec ou sans complexe endocrine rétro-cérébral

Un complexe endocrine rétro-cérébral a été décrit chez les Argasides (GABE, 1955 ; ROSHDY & al, 1973). Sa présence a été confirmée chez O. moubata (EICHENBERGER, 1970). Cet organe est situé près de l'oesophage, dorsalement par rapport au "cerveau". Il possède une structure voisine de celle des corpora cardiaca chez les insectes et des organes de SCHNEIDER chez les araignées.

Dans les expériences précédentes, nous avons transplanté chaque "cerveau" en prenant bien soin d'éliminer, au préalable, le fragment d'oesophage qui le traverse. Les expériences suivantes ont eu pour but de tester une éventuelle différence d'activité entre "cerveaux" accompagnés ou privés de leur complexe endocrine.

Pour chaque stade nutritionnel (femelles à jeun, gorgées depuis 0, 3 ou 7 jours), des femelles vierges ou des femelles ayant copulé ont été utilisées comme donneuses de "cerveaux", avec ou sans leur complexe rétro-cérébral. Des mâles (à jeun ou gorgés depuis 5 jours) ont également servi de donneurs de "cerveaux" avec ou sans leur complexe rétro-cérébral. Les résultats sont donnés dans le tableau 20. Après 14 jours, la dissection des femelles traitées a montré un taux élevé de vitellogénèses (44 à 82 % des ovaires) par rapport au lot témoin où les femelles avaient subi l'opération sans recevoir de "cerveau" (8 % d'ovaires en vitellogénèse). L'analyse statistique par le test de FISHER confirme que ces différences sont significatives à $P \leq 5\%$. Pour le lot où nous avons transplanté des "cerveaux" de femelles à jeun ayant copulé, munis de leur complexe rétro-cérébral, la différence est significative à $P \leq 8,1\%$.

Traitement subi	Etat physiologique des donneurs		Nombre de ?? traitées	Nombre de ?? positives (selon 2.4.3)	% de ?? positives	
Opération "blanche"	-	---	---	12	1	8
Opération "blanche" suivie de copulation	-	---	---	7	6	86
Tranplantation	"cerveaux" transplantés sans le complexe rétro-cérébral	?? vierges	à jeun	10	7	70
- " -			nourries depuis 0 ^h jours	10	5	50
- " -			nourries depuis 3 jours	11	7	64
- " -			nourries depuis 7 jours	9	7	78
Tranplantation	"cerveaux" transplantés sans le complexe rétro-cérébral	?? ayant copulé	à jeun	10	7	70
- " -			nourries depuis 0 ^h jours	10	5	50
- " -			nourries depuis 3 jours	11	9	82
- " -			nourries depuis 7 jours	10	5	50
Tranplantation	"cerveaux" transplantés sans le complexe rétro-cérébral	??	à jeun	10	5	50
- " -			nourris depuis 5 jours	10	6	60
Tranplantation	"cerveaux" transplantés avec le complexe rétro-cérébral	?? vierges	à jeun	9	6	67
- " -			nourries depuis 0 ^h jours	10	5	50
- " -			nourries depuis 3 jours	9	5	56
- " -			nourries depuis 7 jours	10	5	50
Tranplantation	"cerveaux" transplantés avec le complexe rétro-cérébral	?? ayant copulé	à jeun	9	4	44
- " -			nourries depuis 0 ^h jours	9	6	67
- " -			nourries depuis 3 jours	11	7	64
- " -			nourries depuis 7 jours	9	5	56
Tranplantation	"cerveaux" transplantés avec le complexe rétro-cérébral	??	à jeun	10	5	50
- " -			nourris depuis 5 jours	9	5	56

Tableau 20 : Effets comparés de la transplantation de "cerveaux" avec ou sans complexe rétro-cérébral, de donneurs dans différents états physiologiques à des femelles vierges nourries depuis 100 jours.

* La transplantation a lieu dans les deux heures suivant le repas sanguin.

Les femelles ayant subi une opération "blanche" et ayant ensuite copulé montraient des ovocytes lourdement chargés de vitellus dans 86 % des cas (6 sur 7 femelles). Beaucoup d'oeufs étaient visibles dans la lumière de l'ovaire, des oviductes et de l'utérus. La majorité des femelles avait d'ailleurs déjà commencé à pondre le jour de la dissection (14e jour). En revanche, les vitellogénèses des animaux traités étaient toutes de type abortif et aucune ponte n'a été observée. Les résultats de l'expérience montrent de grandes fluctuations entre les réponses de chaque lot. Nous ne pouvons donc mettre en évidence un effet quelconque sur la vitellogénèse, dû à la présence du complexe rétro-cérébral. Les différences observées entre deux lots correspondants (avec ou sans complexe endocrine) ne sont jamais statistiquement significatives (test de FISHER, $P > 5\%$). Selon toute vraisemblance, elles proviennent d'un phénomène purement aléatoire.

En conclusion, un seul fait demeure certain : les "cerveaux" transplantés induisent la vitellogénèse abortive, quel que soit leur stade physiologique.

Signalons encore que lors de la dissection, deux semaines après la transplantation, les "cerveaux" ont été retrouvés apparemment intacts dans l'hémocoèle des femelles réceptrices. N'ayant pas fait l'histologie de ces organes, nous ne savons toutefois pas si des modifications structurales se sont produites durant ces 15 jours.

3.5. ACTION DES HORMONES JUVENILES SUR LA VITELLOGENESE ET LA PONTE

3.5.1. Injection et application externe : comparaison des méthodes

Le mode d'application de l'hormone pouvant jouer un rôle très important dans la réponse attendue, nous avons tout d'abord testé deux méthodes : l'injection dans l'hémocoèle d'une solution huileuse et l'application externe sur la face ventrale d'une solution acétonique (voir 2.5.). Nous avons constitué

neuf lots de femelles vierges et nourries depuis 100 jours. Les témoins ont reçu le solvant pur par injection (INJ TE) ou par application externe (TOP TE). Les autres lots ont été traités par un mélange à parts égales de JH-I et JH-III de concentration croissante, soit par injection, soit par application externe.

Lors de la dissection (25 jours après le traitement), une partie des femelles avait pondu. Quelques autres montraient une vitellogénèse avancée, avec des oeufs dans la lumière de l'ovaire, de l'oviducte et de l'utérus ¹⁾(Tableau 21). Globalement, il apparaît que l'injection a donné de meilleurs résultats que l'application externe. Statistiquement (Tableau 22), seule la dose de 50 µg injectée a fourni une stimulation significativement différente de celle des témoins correspondants. L'intensité de cette stimulation n'est pas statistiquement différente de celle provoquée par la copulation. Nous avons observé 58 % de réponses positives chez les tiques ayant reçu 500 µg d'hormone en application externe. Toutefois, en raison du faible nombre de femelles utilisées dans cette expérience et dans les lots témoins, aucune différence significative n'a pu être décelée entre ce résultat et les pourcentages observés chez les témoins ayant copulé ou non (Tableau 22). Un pourcentage identique (58 %) de femelles positives a été obtenu après injection de 50 µg de mélange JH-I - JH-III. L'injection de 500 µg d'hormone par femelle a provoqué la mort dans les 3 à 5 jours; cette dose est donc létale.

L'application externe ou l'injection d'hormones juvéniles (JH-I et JH-III) peut donc induire la vitellogénèse et la ponte chez les femelles vierges et nourries depuis 3 mois.

1) Des expériences préliminaires avaient montré que l'hormone juvénile induisait des pontes plus tardives que la copulation; ainsi, après 25 jours, quelques femelles encore étaient positives (vitellogénèse selon 2.4.3) sans avoir pondu. Leur vitellus ne montrant pas de signes de résorption, nous avons pensé que la ponte aurait pu avoir lieu. Dans nos tableaux, nous avons donc choisi de décrire le pourcentage d'ovaires présentant une vitellogénèse, et non le pourcentage des pontes.

Lot	<u>nombre de ♀♀ positives</u> nombre total de ♀♀	% de ♀♀ positives
TE Cop	9/11	82
TOP TE	2/10	20
TOP 1	5/15	33
TOP 50	4/15	27
TOP 500	7/12	58
INJ TE	2/12	17
INJ 1	3/11	27
INJ 50	7/12	58
INJ 500	Toutes les ♀♀ sont mortes (14/14)	

Tableau 21 : Traitement de femelles vierges et nourries depuis 100 jours par un mélange à parts égales de JH-I et JH-III (stéréoisomères Fluka). Les hormones sont soit déposées sur le corps de l'animal, soit injectées.

La dissection, 25 jours après le traitement, permet de comptabiliser les femelles positives (signes nets de vitellogénèse dans l'ovaire, selon 2.4.3).

- TOP TE : femelles témoins ayant reçu une application externe d'acétone pure
- TOP 1 : femelles ayant reçu une application externe de 1 µg de mélange d'hormones en solution acétonique
- TOP 50 : idem TOP 1, avec 50 µg de mélange
- TOP 500 : idem TOP 1, avec 500 µg de mélange
- INJ TE : femelles témoins ayant reçu une injection d'huile d'olive pure
- INJ 1 : femelles ayant reçu une injection de 1 µg de mélange d'hormones en solution dans l'huile d'olive
- INJ 50 : idem INJ 1, avec 50 µg de mélange
- INJ 500 : idem INJ 1, avec 500 µg de mélange
- TE Cop : femelles témoins ayant copulé

Lots comparés	Différence significative à P ≤ 5 %
TOP TE - TOP 1	non (P = 39,9 %)
TOP TE - TOP 50	non (P = 54,5 %)
TOP TE - TOP 500	non (P = 8,2 %)
INJ TE - INJ 1	non (P = 45,5 %)
INJ TE - INJ 50	oui (P = <u>4,5</u> %)
TOP TE - TE Cop	oui (P = <u>0,7</u> %)
TOP 1 - TE Cop	oui (P = <u>1,9</u> %)
TOP 50 - TE Cop	oui (P = <u>0,8</u> %)
TOP 500 - TE Cop	non (P = 22,2 %)
INJ TE - TE Cop	oui (P = <u>0,3</u> %)
INJ 1 - TE Cop	oui (P = <u>1,5</u> %)
INJ 50 - TE Cop	non (P = 22,2 %)

Tableau 22 : Comparaisons statistiques par le test de probabilité exacte de FISHER (alternative simple) des réponses enregistrées après traitement aux hormones juvéniles de femelles vierges et nourries depuis 100 jours (données du tableau 21).

Les probabilités inférieures à 5 % (soulignées) correspondent à une différence significative des deux lots comparés.

Toutefois, seul l'effet de l'injection du mélange a été statistiquement démontré. Aussi, par la suite, seules les injections d'hormones juvéniles ont été utilisées.

3.5.2. Détermination de la dose optimale effective en injection

Nous avons tenté d'estimer quelle était la dose optimale d'un mélange de différents stéréoisomères de JH-I et JH-III

(proportion 1:1) agissant sur la vitellogénèse et la ponte de O. moubata. Nous avons constitué 7 lots, dont 4 de témoins (vierges ou non, injectés avec de l'huile d'olive ou non). Les 3 lots restants ont reçu le mélange d'hormone à différentes concentrations (15, 20 et 150 μg par femelle). Le tableau 23 résume les résultats obtenus. A la dissection, 40 à 60 % des femelles traitées aux hormones juvéniles ont montré une vitellogénèse bien marquée (selon 2.4.3.). Seulement 7 à 13 % des témoins vierges ont présenté une réponse positive, alors que tous les témoins ayant copulé ont pondu. Statistiquement, les témoins vierges se distinguent de façon significative des lots traités avec 15 et 50 μg d'hormone (Tableau 24; P égal resp. à 0,9 et 0,6 %). Par contre, la dose de 150 μg est moins stimulante (différence non significative par rapport aux témoins vierges : P = 7,5 %). Le test de FISHER ne nous permet pas de savoir laquelle des trois doses utilisées est vraiment la plus efficace. Les variations (40 à 60 % de réponses positives) sont peut-être aléatoires. Toutefois, les plus forts pourcentages de réponses positives observés n'atteignent pas ceux obtenus après une copulation mais n'en sont pas statistiquement différents (Tableau 24).

Un test de la médiane nous indique que le nombre moyen d'oeufs pondus est comparable chez les femelles traitées aux hormones et chez les témoins ayant copulé (Tableau 25). D'autre part, les pontes ont été plus tardives chez les tiques traitées (17 à 23 jours) que chez les individus ayant copulé (8 à 17 jours). Le retard moyen est d'environ 8 jours.

3.5.3. Distinction entre stimulus de JH-I et stimulus de JH-III

Ayant établi qu'un mélange de stéréoisomères des deux hormones juvéniles (JH-I et JH-III; proportion 1:1) induisait la vitellogénèse et la ponte chez O. moubata, nous avons alors testé séparément JH-I et JH-III afin de voir si les tiques

Lot	nombre de ♀♀ positives	% de ♀♀ positives
	nombre total de ♀♀	
TE Cop + INJ	7/8	88
TE Cop	13/13	100
TE	2/15	13
INJ TE	1/14	7
INJ 15	6/10	60
INJ 50	9/16	56
INJ 150	4/10	40

Tableau 23 : Injection d'un mélange à parts égales de JH-I et JH-III (stéréoisomères Fluka) en solution dans l'huile d'olive à des femelles vierges et nourries depuis 100 jours.

La dissection, 25 jours après le traitement, permet de comptabiliser les femelles positives (signes nets de vitellogénèse dans l'ovaire, selon 2.4.3).

- TE : femelles témoins n'ayant subi aucun traitement
- INJ TE : femelles témoins ayant reçu une injection d'huile d'olive pure
- INJ 15 : femelles ayant reçu une injection de 15 μg de mélange d'hormones en solution dans l'huile d'olive
- INJ 50 : idem INJ 15, avec 50 μg de mélange
- INJ 150 : idem INJ 15, avec 150 μg de mélange
- TE Cop + INJ : femelles témoins ayant copulé et reçu une injection d'huile d'olive pure
- TE Cop : femelles témoins ayant copulé

Lots comparés	Différence significative à $P \leq 5\%$
INJ TE - INJ 15	oui (P = <u>0,9</u> %)
INJ TE - INJ 50	oui (P = <u>0,6</u> %)
INJ TE - INJ 150	non (P = 7,5 %)
INJ TE - TE Cop + INJ	oui (P = <u>0,04</u> %)
INJ 15 - TE Cop + INJ	non (P = 22,5 %)
INJ 50 - TE Cop + INJ	non (P = 14,2 %)
INJ 150 - TE Cop + INJ	non (P = 5,7 %)

Tableau 24 : Comparaisons statistiques par le test de probabilité exacte de FISHER (alternative simple) des réponses enregistrées après injection d'hormones juvéniles à des femelles vierges et nourries depuis 100 jours (données du tableau 23).

Les probabilités inférieures à 5 % (soulignées) correspondent à une différence significative des deux lots comparés.

Lots	Nombre de ♀♀ ayant pondu	Nombre moyen d'oeufs par ♀	Test de la médiane P %
TE Cop + INJ	7	68 ± 51	} 50
INJ 15 /	17	57 ± 29	
INJ 50 /			
INJ 150 }			

Tableau 25 : Comparaisons statistiques par le test de la médiane du nombre moyen d'oeufs pondus par des femelles vierges et nourries depuis 100 jours, après injection d'hormones juvéniles JH-I et JH-III. (Pour abréviations voir tableau 23).

La différence enregistrée n'est pas significative ($P > 5\%$).

réagissaient mieux à l'un des deux stimuli. Pour ce faire, nous avons utilisé 7 lots différents. Deux lots ont reçu JH-I (25 et 75 μg par femelle), deux autres JH-III (doses identiques); un groupe a été injecté avec un mélange à parts égales des deux hormones. Finalement, des témoins ayant copulé et d'autre pas, ont reçu de l'huile d'olive pure. Dix tiques par lot, prises au hasard, ont été disséquées 10 jours après le traitement. Mis à part les femelles témoins ayant copulé, la vitellogénèse, lorsqu'elle se présentait, se trouvait chez presque tous les individus à un stade très précoce (Tableau 26). Le test de FISHER montre une différence significative entre chacun des lots et les femelles témoins ayant copulé (P varie entre 0,1 et 2,9 %). Les hormones juvéniles (mélange de stéréoisomères) induisent donc la vitellogénèse à un rythme beaucoup plus lent que ne le fait la copulation.

Le reste des femelles a été disséqué au 25^e jour (Tableau 26). L'injection d'hormones a provoqué une vitellogénèse chez 18 à 50 % des individus, selon les lots. La réponse la plus forte a été obtenue avec 75 μg de JH-I. Ving-cinq μg de JH-I ou de JH-III semblent insuffisants pour obtenir une réaction statistiquement différente de celle des témoins vierges (Tableau 27). Par contre, les doses de 50 et 75 μg de JH-I ou JH-III induisent une réponse différant de manière significative de celle des témoins vierges. Dans cette expérience, 88 % des témoins ayant copulé ont montré une vitellogénèse. Ce pourcentage est nettement supérieur aux proportions enregistrées dans les autres lots (Tableau 26). La copulation est donc un stimulant plus efficace qu'un traitement aux hormones juvéniles, du moins avec les doses appliquées ici.

Nous n'avons pu mettre en évidence une différence nette d'activité entre JH-I et JH-III. Les deux hormones ont provoqué des vitellogénèses dans des proportions sensiblement identiques, à doses comparables.

Contrairement à l'expérience précédente, le nombre moyen d'œufs pondus par femelle est ici bien inférieur chez les tiques traitées aux hormones que chez les individus ayant copulé (Tableau 28).

Lot	Nombre total de ♀♀	Nombre de ♀♀ disséquées après 10 j.	Nombre de ♀♀ positives après 10 j. (selon 2.4.3.)	Nombre de ♀♀ ayant des oeufs dans les oviductes ou l'utérus après 10 j.	Nombre de ♀♀ disséquées après 25 jours	Nombre de ♀♀ positives après 25 j. (selon 2.4.3.)	% de ♀♀ positives après 25 jours
TE Cop + INJ	27	10	9	4	17	15	88
INJ TE	27	10	1	1	17	0	0
JH-I 25	27	10	1	1	17	3	18
JH-I 75	26	10	3	1	16	8	50
JH-III 25	25	10	3	0	15	3	20
JH-III 75	29	10	4	1	19	7	37
MEL 50	28	10	3	0	18	5	28

Tableau 26 : Effets de l'injection d'hormones juvéniles JH-I et JH-III (stéroïsomères Fluka) en solution dans l'huile d'olive à des femelles vierges et nourries depuis 100 jours.

Four chaque lot, 10 individus ont été disséqués 10 jours après le traitement et le solde 15 jours plus tard. Les femelles présentant un ovaire en vitellogénèse ont été comptabilisées.

TE Cop + INJ : femelles témoins ayant copulé et reçu une injection d'huile d'olive pure

INJ TE : femelles témoins ayant reçu une injection d'huile d'olive pure

JH-I 25 : femelles ayant reçu une injection de 25 µg de JH-I en solution dans l'huile d'olive

JH-I 75 : idem JH-I 25, avec 75 µg d'hormone

JH-III 25 : femelles ayant reçu une injection de 25 µg de JH-III en solution dans l'huile d'olive

JH-III 75 : idem JH-III 25, avec 75 µg d'hormone

Mel 50 : femelles ayant reçu une injection de 50 µg d'un mélange à parts égales de JH-I et JH-III en solution dans l'huile d'olive.

Lots comparés	Différence significative à P < 5 %
INJ TE - JH-I 25	non (P = 11,4 %)
INJ TE - JH-I 75	oui (P = <u>0,1</u> %)
INJ TE - JH-III 25	non (P = 9,2 %)
INJ TE - JH-III 75	oui (P = <u>0,6</u> %)
INJ TE - MEL 50	oui (P = <u>2,6</u> %)
INJ TE - TE Cop + INJ	oui (P = <u>0,0</u> %)
JH-I 25 - TE Cop + INJ	oui (P = <u>0,0</u> %)
JH-I 75 - TE Cop + INJ	oui (P = <u>2,1</u> %)
JH-III 25 - TE Cop + INJ	oui (P = <u>0,0</u> %)
JH-III 75 - TE Cop + INJ	oui (P = <u>0,2</u> %)
MEL 50 - TE Cop + INJ	oui (P = 0,0 %)

Tableau 27 : Comparaisons statistiques par le test de probabilité exacte de FISHER (alternative simple) des réponses enregistrées après injection d'hormones juvéniles à des femelles vierges et nourries depuis 100 jours. (Données du tableau 26).

Les probabilités inférieures à 5 % (soulignées) correspondent à une différence significative des deux lots comparés.

Lots	Nombre de ♀♀ ayant pondu	Nombre moyen d'œufs par ♀	Test de la médiane P %
TE Cop + INJ	15	78 ± 23	} 0,6
JH-I 25 / JH-I 75 / JH-III25/JH-III75 / MEL 50	24	51 ± 19	

Tableau 28 : Comparaisons statistiques par le test de la médiane du nombre moyen d'œufs pondus par des femelles vierges et nourries depuis 100 jours, après injection d'hormones juvéniles JH-I et JH-III. (Pour les abréviations, voir tableau 26).
La différence enregistrée est significative (P < 5 %).

La différence apparaît comme hautement significative. Cette expérience nous permet donc de supposer que la copulation est un stimulant plus puissant que l'injection d'hormones juvéniles (mélange de stéréoisomères), aussi bien dans le cas du pourcentage d'individus positifs que dans celui du nombre d'œufs pondus par animal. Ce résultat ne contredit pas les considérations énoncées sous 3.5.1. et 3.5.2. En effet, les faibles différences enregistrées alors ne permettraient pas d'exclure l'éventualité que les deux types de stimuli provoquent des réponses non identiques. Cette éventualité semble se confirmer ici.

Le retard du délai de ponte s'est manifesté également dans ce cas. Les femelles traitées aux hormones ont pondu entre le 17^e et le 24^e jour, alors que les témoins ayant copulé l'ont fait entre le 7^e et le 14^e jour. Le retard moyen est donc d'environ 10 jours.

3.5.4. Injection d'isomères naturels de JH-I, JH-II et JH-III

Les hormones correspondant aux stéréoisomères naturels des insectes ont également été utilisées. JH-I, JH-II et JH-III ont été injectées à 4 doses différentes (0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{g}/\text{♀}$) à des femelles vierges et nourries depuis 100 jours. Au cours des 25 jours suivant le traitement, toutes les femelles ayant copulé (témoins) ont pondu, plus précisément entre le 11e et le 20e jour. Durant ce même laps de temps, seuls 9 individus traités ont déposé des oeufs (entre le 16e et le 23e jour). Le plus fort pourcentage de pontes a été obtenu après injection de 100 μg par femelle de l'hormone JH-II (Tableau 29). Cette réponse est la seule à se distinguer statistiquement de celle des témoins vierges ($P = 1,7 \%$ pour le pourcentage de femelles en vitellogénèse et $P = 4,2 \%$ pour celui des tiques ayant pondu). Les quelques pontes enregistrées dans d'autres lots, notamment chez les femelles ayant reçu 100 μg de JH-III, ne permettent aucune conclusion, statistiquement parlant. D'autre part, sur 17 femelles positives recensées chez les tiques traitées, seules 9 ont pondu, soit à peine plus de la moitié.

Les hormones utilisées exercent donc souvent un stimulus incomplet : la vitellogénèse est abortive ou tellement ralentie que la ponte n'intervient que très tardivement. Signalons encore que tous les lots se distinguent statistiquement des témoins ayant copulé ($P \leq 5 \%$). L'injection d'hormones juvéniles isomériquement semblables à celles des insectes n'exerce pas ou peu d'action gonadotrope alors que le mélange de stéréoisomères donne des résultats nettement meilleurs.

Produit injecté	Doses en µg	Nombre de ♀♀ traitées	Nombre de ♀♀ positives selon 2.4.3.	Nombre de ♀♀ ayant pondu	% de ♀♀ positives selon 2.4.3.
Huile d'olive pure	- *	14	14	14	100
	- **	15	0	0	0
JH-I	0,1	14	2	1	14
	1	14	1	1	7
	10	14	1	0	7
	100	14	1	0	7
JH-II	0,1	14	1	0	7
	1	14	1	0	7
	10	13	1	1	8
	100	14	5	4	36
JH-III	0,1	12	0	0	0
	1	13	0	0	0
	10	14	1	0	7
	100	14	3	2	21

Tableau 29 : Effets de l'injection d'hormones juvéniles JH-I, JH-II et JH-III (isomères naturels des insectes : ECO Chem. Intern) en solution dans l'huile d'olive, à des femelles vierges et nourries depuis 100 jours.

Les tiques dont l'ovaire présentait des signes nets de vitellogénèse à la dissection (selon 2.4.3.), 25 jours après le traitement, sont considérées comme positives.

* Lot de femelles témoins ayant copulé

** Lot de femelles témoins vierges

3.6. ACTION DES "PRECOCENE" SUR LA VITELLOGENESE ET LA PONTE

Les "Precocene 1 et 2", substances anti-ovipositrices chez certains insectes, ont été appliquées à 4 doses différentes (0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) sur du papier filtre, au contact duquel nous avons placé des femelles. Ce traitement a été effectué avant et après, ou seulement après le repas sanguin. A part les témoins vierges, toutes les tiques ont copulé après s'être nourries. Chaque individu a été pesé le jour précédant et le jour suivant le repas¹⁾.

Les résultats, consignés au Tableau 30, montrent tout d'abord que les 3 doses les plus faibles (0,1; 1 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) n'ont eu d'influence ni sur la quantité de sang prélevé, ni sur le pourcentage de femelles ayant pondu, ni sur la durée moyenne de préoviposition, ni encore sur le rendement de la ponte (\bar{R}_2 ²⁾. Cette constatation est valable aussi bien pour le "Precocene 1" que pour le "Precocene 2".

Une dose de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de "Precocene 1", appliquée durant les 3 jours précédant le repas sanguin, a empêché les femelles de se nourrir (Tableau 30 A). Celles-ci ont même perdu du poids entre les deux pesées. Elles ont encore vécu 8 à 14 jours après la fin du traitement, mais en montrant des signes très nets d'intoxication : pattes recroquevillées, difficultés de déplacement, etc...

Le même traitement, effectué avec du "Precocene 2", n'a pas influencé de manière significative la quantité de sang ingéré par rapport aux femelles témoins (test t de STUDENT, seuil de 5 %). Par contre, ce traitement a diminué le pourcentage de

1) Un test de χ^2 , effectué sur 84 femelles non traitées, nourries depuis 1 jour et ayant copulé, montre que la distribution du poids n'est pas incompatible avec une distribution normale. Nous avons donc utilisé le test t de STUDENT (seuil de 5 %) pour comparer entre eux les poids moyens, un jour après le repas sanguin.

2) $R_2 = \frac{\text{nombre d'oeufs pondus}}{\text{poids de sang ingéré}} \quad (\text{défini sous 3.1.3.})$
(après concentration)

Donc mg ca	Poids moyen avant le re- pas sangui- (mg)	Poids moyen 1 jour après le AVANT 30 JOURS repas sangui- (mg)	Nombre de 99 ayant perdu le nombre total de 99	% de 99 ayant perdu 30 Jours	Durée moyenne de préoviposition (Jours)	Nombre moyen d'œufs pondus par ♀	\bar{R}_2 (mg ⁻¹)
0,1	42,8 ± 10,6	206,6 ± 82,4	9/10	90	17 ± 2	131 ± 34	0,73 ± 0,11
1	45,4 ± 15,6	190,8 ± 88,5	8/9	89	17 ± 3	124 ± 37	0,70 ± 0,10
10	46,5 ± 20,0	236,0 ± 96,2	10/10	100	18 ± 2	149 ± 52	0,80 ± 0,09
100	45,4 ± 15,6	36,5 ± 16,2	toutes les 99 sont mortes	---	---	---	---
0,1	45,0 ± 14,5	228,2 ± 72,1	9/9	100	18 ± 3	134 ± 41	0,73 ± 0,11
1	43,7 ± 11,7	207,8 ± 55,5	9/10	90	20 ± 4	125 ± 52	0,75 ± 0,11
10	46,4 ± 19,7	228,9 ± 111,1	10/10	100	19 ± 3	139 ± 55	0,78 ± 0,09
100	45,6 ± 15,8	202,8 ± 104,3	7/10	70	24 ± 4	133 ± 67	0,74 ± 0,13

0,1	43,4 ± 12,4	223,0 ± 65,6	10/10	100	19 ± 4	137 ± 46	0,75 ± 0,08
1	43,8 ± 12,4	204,4 ± 70,5	7/8	88	17 ± 6	134 ± 48	0,77 ± 0,11
10	43,9 ± 11,5	204,7 ± 51,3	10/10	100	18 ± 4	134 ± 23	0,85 ± 0,11
100	43,0 ± 10,1	211,6 ± 49,1	4/10	40	29 ± 6	132 ± 24	0,77 ± 0,06
0,1	42,8 ± 10,2	189,2 ± 29,7	10/10	100	19 ± 5	115 ± 18	0,80 ± 0,16
1	45,6 ± 15,9	234,7 ± 91,4	9/9	100	17 ± 4	172 ± 34	0,82 ± 0,08
10	45,7 ± 17,4	228,1 ± 66,8	10/10	100	16 ± 3	155 ± 63	0,83 ± 0,12
100	44,5 ± 13,7	211,8 ± 56,8	6/9	67	19 ± 5	133 ± 53	0,72 ± 0,18

99 témoins vierges	45,1 ± 15,0	215,8 ± 71,7	0/10	0	---	---	---
99 témoins ayant copulé	44,8 ± 15,0	216,1 ± 52,1	8/8	100	19 ± 4	125 ± 43	0,71 ± 0,10

Tableau 30 :

Effets sur la nutrition et la ponte, de différentes doses de "Precocene 1 et 2" administrées à des femelles nourries et ayant copulé (prise de sang suivie de copulation immédiate).
Le rapport \bar{R}_2 correspond au rendement de ponte (nombre d'œufs pondus/poids de sang ingéré et concentré).
A. Le traitement est effectué durant les 3 jours précédant le repas sanguin et les 11 jours suivant celui-ci.
B. Le traitement est effectué durant les 11 jours suivant le repas sanguin.
C. Femelles témoins, vierges ou ayant copulé, n'ayant subi aucun traitement.

femelles ayant pondu : 70 % contre 100 % chez les témoins ayant copulé (Tableau 30 A, C). Cet écart n'est cependant pas significatif (test de probabilité exacte de FISHER, $P > 5 \%$). La durée moyenne de préoviposition a été sensiblement plus élevée dans ce lot (24 ± 4 j.) que chez les témoins ayant copulé (19 ± 4 j.); cette différence est significative (test de la médiane : $P = 3,2 \%$). Le rendement \overline{R}_2 ($0,74 \pm 0,13$) a été comparable à celui des témoins ($0,71 \pm 0,10$). Le test de la médiane nous le confirme ($P > 5 \%$).

Une dose de $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de "Precocene 1", appliquée après le repas sanguin uniquement et durant 11 jours, a fortement réduit le pourcentage de femelles ayant pondu (40 % contre 100 % chez les témoins ayant copulé : Tableau 30 B,C). La différence est significative (test de probabilité exacte de FISHER, $P = 1,2 \%$). La durée moyenne de préoviposition a été augmentée de façon très marquée (29 ± 6 j.) dans ce lot par rapport aux témoins ayant copulé (19 ± 4 j.). Le test de la médiane montre que la différence est significative ($P = 3,2 \%$). Par contre, le rendement \overline{R}_2 ne s'est pas écarté de manière significative de celui des témoins ayant copulé.

Le même traitement, effectué au moyen de "Precocene 2", a également diminué le pourcentage de femelles ayant pondu (67 % contre 100 % chez les témoins ayant copulé). La différence n'est cependant pas significative. Par contre, les femelles de ce lot n'ont subi aucun retard dans leur rythme de ponte et le rendement \overline{R}_2 s'est montré comparable à celui des témoins ayant copulé.

Relevons encore que la durée moyenne de préoviposition des témoins ayant copulé a été très élevée (19 jours), alors qu'elle se situe habituellement entre 10 et 15 jours. Nous n'avons pu expliquer ce phénomène.

Notons également que les différents rendements de ponte \overline{R}_2 ont presque tous été supérieurs à la valeur observée chez les témoins ayant copulé. Nous ne pouvons cependant pas conclure à une amélioration du rendement de ponte par les "Precocene", toutes les différences étant non-significatives selon le test de la médiane.

En résumé, dans les conditions de traitement appliquées ici, nous voyons que les "Precocene" n'ont aucune action antigonadotrope détectable à des concentrations inférieures à $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. A cette dose-ci, l'effet varie selon le moment du traitement (après, avant et après le repas) et selon le produit utilisé ("Precocene 1" ou "Precocene 2"). A dose égale, le "Precocene 1" est plus actif que le "Precocene 2". Ce dernier provoque une ponte retardée, mais seulement lorsqu'il est appliqué avant et après le repas. Le faible pourcentage de pontes enregistré chez les tiques traitées après le repas au moyen de "Precocene 1" ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) est probablement lié à l'oviposition fortement retardée de ce lot. Le Tableau 31 illustre ces dernières remarques.

3.7. VITELLOGENINES ET VITELLINES : PURIFICATIONS PARTIELLES ET COMPARAISONS

Le dernier chapitre de notre travail a été consacré à l'étude des protéines synthétisées par la femelle lors de la vitellogénèse et incorporées dans les ovocytes. L'élaboration de ces substances dépend en effet des stimuli liés au repas sanguin et à la copulation. Notre étude s'inscrit donc dans une suite logique de processus métaboliques dépendant les uns des autres.

3.7.1. Disc-électrophorèse sur polyacrylamide

Des extraits bruts d'hémolymphe et d'oeufs, passés sur disc-électrophorèse de polyacrylamide, nous ont donné une série d'informations, par une coloration totale (fig. 15 A) et par trois colorations spécifiques permettant d'identifier les glycoprotéines (GP), les lipoprotéines (LP) et les hémoprotéines (HP) (fig. 15 B,C,D). Nous avons volontairement laissé de côté les plus fines bandes apparaissant sur le gel, car nous désirions avant tout étudier les protéines jouant un rôle quantitatif important lors de la vitellogénèse. Nous n'avons donc pas décrit dans le détail l'électrophorégramme de l'hémolymphe et des oeufs.

MOMENT DU TRAITEMENT	PRODUIT UTILISE		EFFETS OBSERVES			abaissement du rendement R ₂
	Precocone 1	Precocone 2	pas de nutrition, intoxication provoquant la mort	ponde retardée	pourcentage plus faible d'individus qui pondent	
<u>avant</u> et <u>après</u> le repas sanguin	X	X	X	X	X	
<u>après</u> le repas sanguin	X	X	X	X	X	

Tableau 31 : Tableau synthétique des effets dus aux "Precocone 1 et 2" sur des femelles nourries et ayant copulé, pour une dose de 100 µg de produit par cm².

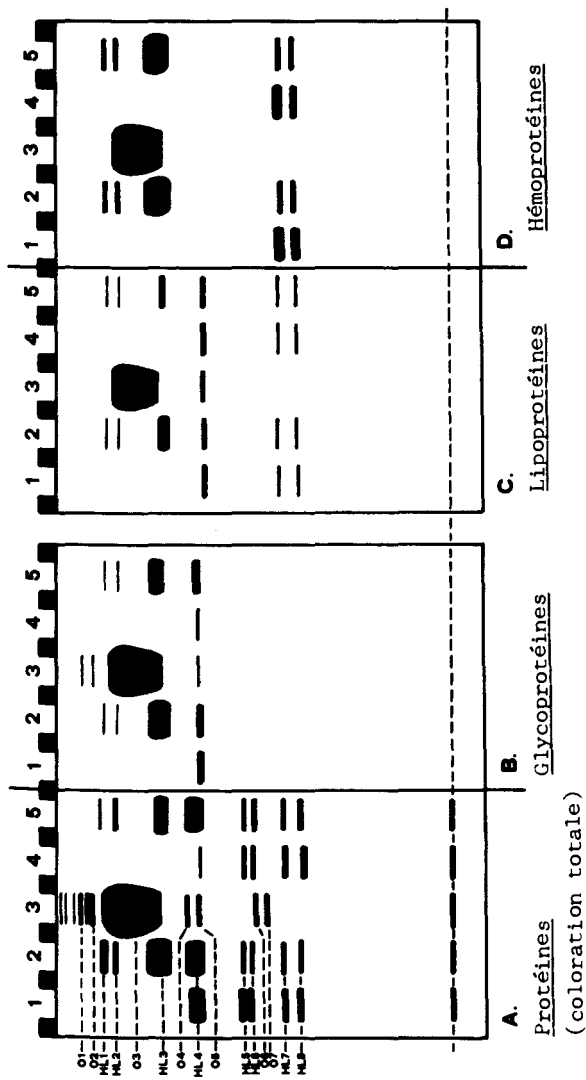


FIGURE 15 Electrophorèse d'hémolymphe et de broyats d'oeufs.
 (Hémolymphe : chaque fente reçoit 10 μ l d'hémolymphe, préalablement diluée 5 fois dans un tampon Tris-HCl, pH 8,2, additionné de saccharose à 5 %).
 (Broyats : chaque fente reçoit 10 μ l d'un extrait dans le tampon ci-dessus d'oeufs (équivalent de 3 oeufs)).
 Les techniques de coloration sont citées en 2.7.2.

1. Hémolymphe de mâles nourris depuis 8 jours.
2. Hémolymphe de femelles nourries depuis 8 jours
3. Hémolymphe de femelles nourries depuis 8 jours et ayant copulé.
4. Hémolymphe de femelles vierges et à jeun.
5. Hémolymphe de femelles vierges et nourries depuis 8 jours.

83. Extrait d'oeufs fraîchement pondus.

Dans l'hémolymphe tout d'abord (fig. 15 A), il apparaît trois bandes (HL₁, HL₂ et HL₃) susceptibles d'être des vitellogénines. Elles sont absentes chez les mâles et les femelles vierges à jeun. Toutes trois sont des hémoglycolipoprotéines (HGLP). Il existe également une glycolipoprotéine (GLP) non spécifique du sexe (HL₄), dont la concentration augmente dans l'hémolymphe des tiques nourries, quels que soient leur sexe et état (vierge ou copulé). Les protéines correspondant aux bandes HL₅ et HL₆ ne font partie d'aucune des trois catégories GP, LP ou HP, alors que HL₇ et HL₈ sont des hémolipoprotéines (HLP). Ces deux dernières bandes sont plus concentrées chez les mâles et les femelles vierges à jeun que chez les femelles nourries.

Dans l'oeuf, il apparaît trois fines bandes près de la zone de dépôt ¹⁾, puis une autre bande plus concentrée (O₁). Ensuite, on observe deux raies minuscules et une bande (O₂) qui est aussi marquée que O₁. La bande O₃ se présente sous forme d'une énorme tache et montre nettement les quatre réactions positives (protéines totales, GP, LP et HP). O₃ est donc une HGLP. En observant attentivement le gel par transparence, on peut apercevoir des traînées verticales entre trois zones plus sombres à l'intérieur de la tache. Cette observation suggère l'hypothèse d'une fragmentation de molécules durant l'électrophorèse. Les bandes suivantes O₄, O₆ et O₇ ne se colorent pas spécifiquement; par contre, O₅ montre les réactions d'une GLP. Par la suite, nous avons voulu purifier les protéines constituant les trois bandes les plus marquées, à savoir O₃ en ce qui concerne les oeufs, ainsi que HL₃ et HL₄ pour l'hémolymphe. Etant donné la quantité relativement limitée de matériel à disposition, il n'a malheureusement pas été possible de purifier les autres bandes.

1) Pour les raisons évoquées au début du paragraphe, nous n'avons pas numéroté ces trois bandes.

3.7.2. Purification des protéines majeures de l'oeuf

Cinq cents oeufs fraîchement pondus ont été homogénéisés dans 5 ml de tampon Tris-HCl pH 8,2. L'électrophorèse sur polyacrylamide d'une partie du surnageant après centrifugation, correspondant à l'équivalent de 1,25 ou 2,5 oeufs, a montré la présence de plusieurs bandes (O_1 à O_7) (fig. 18: 2 et 5), conformément à la figure 15 A. Le reste du surnageant a subi une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium. Le précipité a été redissout dans 0,5 ml de tampon Tris-HCl pH 8,2. Après cette étape, l'électrophorèse sur polyacrylamide d'un échantillon représentant l'équivalent de 2,5 oeufs a montré que la précipitation fractionnée n'apporte presque rien à la purification du broyat (fig. 18: 1), si ce n'est une certaine diminution de l'intensité des bandes O_4 , O_5 , O_7 et de la bande frontale. Le reste du précipité en solution a été appliqué sur une colonne de Bio-Gel A-5M (\varnothing : 15 mm, l: 600 mm), avec pour éluant le même tampon Tris-HCl. La figure 16 illustre le profil d'élution obtenu. Un très gros pic est apparu entre les volumes d'élution 600 et 1100 gouttes environ. Celui-ci a été suivi par deux petits pics dont les sommets étaient respectivement situés aux volumes d'élution 1200 et 1400 gouttes. Ces trois pics ont été appelés respectivement OP_1 ("oeuf purifié - 1ère étape"), O_{1200} et O_{1400} .

Un échantillon de la fraction OP_1 , équivalent à 2,5 oeufs, a été à nouveau soumis à une électrophorèse sur polyacrylamide (fig. 18:3). Seule la bande O_3 a subsisté, attestant une bonne purification après la colonne Bio-Gel.

Une purification plus poussée a été tentée par la technique de la chromatographie échangeuse d'ions. La fraction principale OP_1 a été récoltée, concentrée jusqu'à 1 ml (Minicon B-15) et passée sur colonne DEAE-Sephadex A-25 dans le tampon Tris-HCl pH 8,2, avec un gradient linéaire de NaCl (0-200 mM). Deux pics sont apparus (fig. 17); l'un nettement majoritaire a été élué entre 150 et 300 gouttes environ, suivi par un petit pic élué par le NaCl 15 mM entre 320 et 400 gouttes. Ces deux pics ont

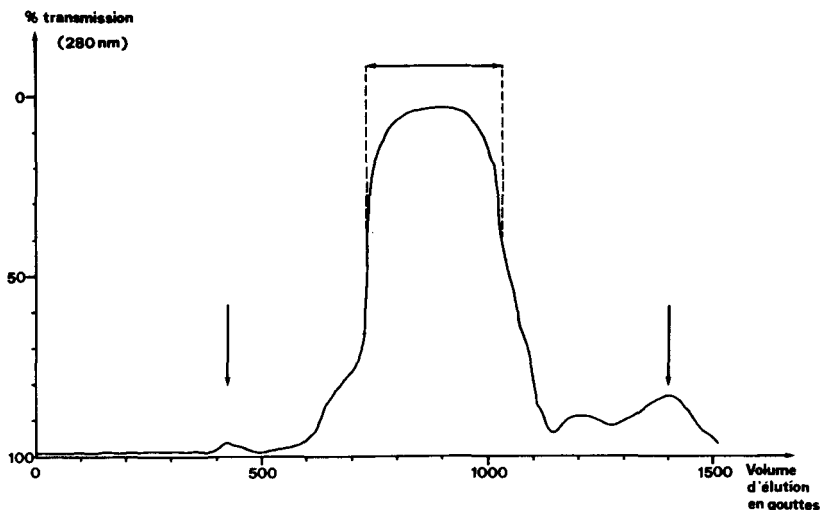


FIGURE 16 Profil d'éluion après filtration sur gel d'un broyat d'oeufs fraîchement pondus.

500 oeufs fraîchement pondus sont homogénéisés dans 5 ml de tampon Tris HCl pH 8,2. Après centrifugation, le surnageant subit une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium. Le précipité est redissout dans 0,5 ml de tampon et appliqué sur une colonne de Bio-Gel A5M (ϕ : 15 mm, l. : 600 mm), avec le même tampon pour éluant.

La fraction principale (730 à 1'030 gouttes) est récoltée en vue de purifications supplémentaires; les fractions correspondant au sommet des pics (1'200 et 1'400 gouttes) sont également récoltées, lyophilisées après dialyse et conservées en ampoules scellées.

été appelés respectivement OP₂ ("oeuf purifié - 2ème étape") et O₁₅.

Des échantillons du pic OP₂ équivalant à 0,5, 1,25 et 2,5 oeufs ont été déposés sur un gel pour effectuer l'électrophorèse sur polyacrylamide (fig. 18: 4, 6, 7). Seule la bande O₃ a subsisté avec une légère séparation en plusieurs bandes réunies par des traînées protéiques (fig. 18: 6,7). Les fractions correspondant au grand pic ont été récoltées et mises à dialyser pendant 24 heures. La fraction éluée avec environ 15 mM NaCl (O₁₅) a également été dialysée. Finalement, les deux échantillons ont été lyophilisés et conservés en ampoules scellées.

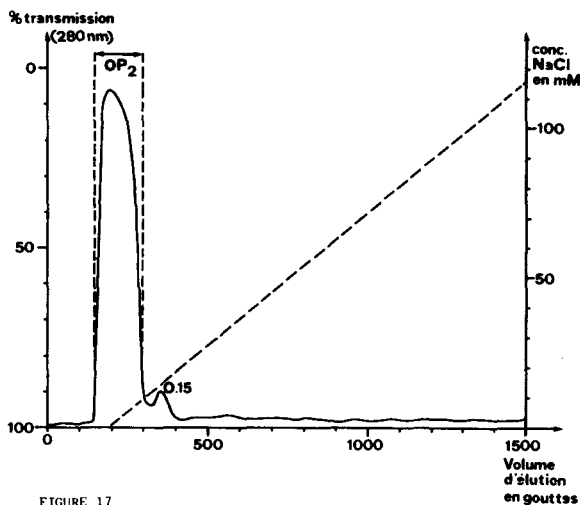


FIGURE 17

Profil d'élution de la fraction protéique majoritaire d'un broyat d'oeufs après passage sur colonne échangeuse d'ions.

La fraction majoritaire d'un broyat d'oeufs (Fig. 16) est récoltée, concentrée jusqu'à 1 ml (Minicon B-15) et passée sur colonne échangeuse d'ions (DEAE Sephadex A-25) dans un tampon Tris-HCl pH 8,2 avec un gradient linéaire de NaCl (0-200 mM) (traçillés sur le graphe). La partie correspondant au grand pic est récoltée, mise à dialyser durant 24 heures, lyophilisée et conservée sous le nom de OP₂ ("oeuf purifié-2e étape"). La fraction sortant avec environ 15 mM NaCl (O₁₅) subit le même traitement.

Les pics O₁₂₀₀ et O₁₄₀₀ obtenus après colonne Bio-Gel ont aussi été analysés par électrophorèse sur polyacrylamide. L'électrophorégramme obtenu est donné dans la figure 19. Contrairement à ce qui pouvait être attendu, les bandes observées après électrophorèse de nos échantillons n'ont pas migré dans la zone des faibles poids moléculaires, mais sont apparues de façon très marquées au même niveau que les bandes O₁, O₂ et O₃ des broyats bruts, notamment.

Le passage de l'échantillon lyophilisé O₁₂₀₀ sur une colonne Bio-Gel A-5M en vue de la détermination de son poids moléculaire a montré le même résultat surprenant. D'après son volume d'élution sur la colonne lors de la première purification, le poids moléculaire de O₁₂₀₀ devait se situer entre 20'000 et 40'000. Or, cette substance a présenté un volume d'élution

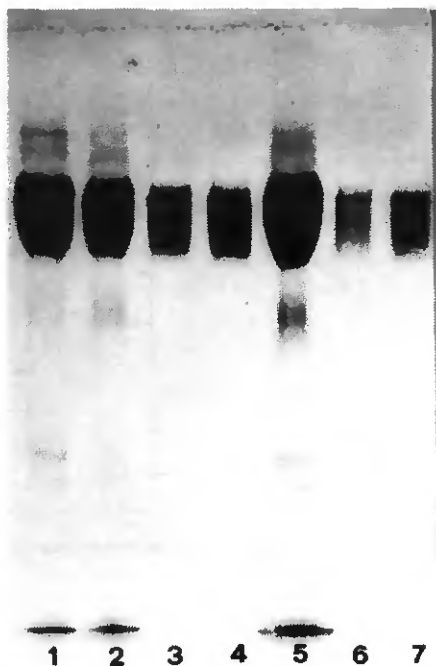


FIGURE 18

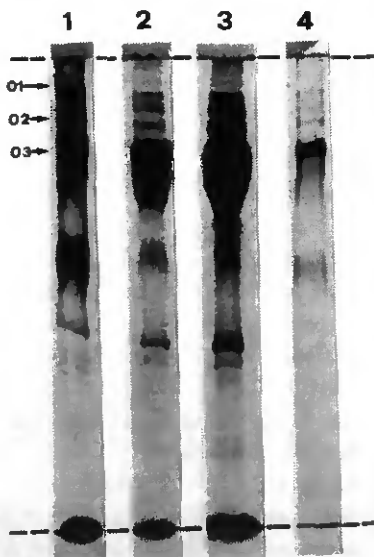
Disc-électrophorèse sur polyacrylamide des divers stades de purification de O_3 .

- 1) Après précipitation au $(NH_4)_2 SO_4$ (équiv. 2,5 oeufs)
- 2) Broyat brut d'oeufs (équiv. 1,25 oeuf)
- 3) Immédiatement après passage sur colonne de Bio-Gel (équiv. 2,5 oeufs) (OP_1)
- 4) Immédiatement après passage sur colonne de DEAE-Sephadex (OP_2) (équiv. 2,5 oeufs)
- 5) Broyat brut d'oeufs (équiv. 2,5 oeufs)
- 6) Idem 4) (OP_2) (équiv. 0,5 oeuf)
- 7) Idem 4) (OP_2) (équiv. 1,25 oeuf)

FIGURE 19

Disc-électrophorèse sur polyacrylamide de O_{1200} et O_{1400}

- 1) O_{1200} (50 μ l : équiv. 500 oeufs)
- 2) Broyat brut d'oeufs (équiv. 1,3 oeuf)
- 3) Broyat brut d'oeufs (équiv. 3,3 oeufs)
- 4) O_{1400} (50 μ l : équiv. 500 oeufs)



correspondant à un poids moléculaire de 2'000'000 lors du second passage sur la colonne.

Ces deux expériences tendraient à montrer que les fractions protéiques O_{1200} et O_{1400} correspondraient en fait à une ou plusieurs grande(s) protéine(s) fragmentée(s). Ces fragments pourraient être des sous-unités capables de réarrangements pour former à nouveau des protéines de fort poids moléculaire. La présence d'un artefact ne peut également être exclue. O_{1200} et O_{1400} seraient alors le résultat d'une adsorption partielle et momentanée de OP_2 sur le gel, due à une surcharge de l'échantillon.

Il apparaît donc que quatre fractions protéiques principales sont présentes dans les oeufs. La plus importante, OP_2 , correspond vraisemblablement à la bande O_3 obtenue par électrophorèse sur polyacrylamide du broyat brut. Trois fractions protéiques de moindre importance ont pu être isolées: O_{1200} , O_{1400} et O_{15} . Ces trois substances ont été récoltées en faibles quantités (quelques centaines de μg). Par contre, OP_2 a représenté 35 à 40 mg de produit sec pour 500 oeufs.

3.7.3. Etude de quelques caractères physico-chimiques de la fraction protéique OP_2

3.7.3.1. Détermination du poids moléculaire

Le passage de la fraction OP_2 non lyophilisée sur colonne Bio-Gel A-5M nous a indiqué que cette protéine possède un poids moléculaire apparent très élevé, voisin de $2,0 \cdot 10^6$ (fig. 20). En répétant l'opération avec un échantillon préalablement lyophilisé puis redissout dans le tampon, nous n'avons perçu aucune différence notable au niveau du volume d'éluion et de la forme du pic.

3.7.3.2. Electrophorèse de OP_2 lyophilisé

L'électrophorèse de OP_2 lyophilisé a conduit à une résolution en deux bandes principales et plusieurs plus petites (figure 21). Deux fines bandes ont présenté des R_f identiques à ceux de O_1 et O_2 , trouvés lors de l'électrophorèse des broyats bruts. Les deux zones fortement marquées correspondent à la plage couverte par O_3 . Cela confirme les soupçons relatifs à une fragmentation

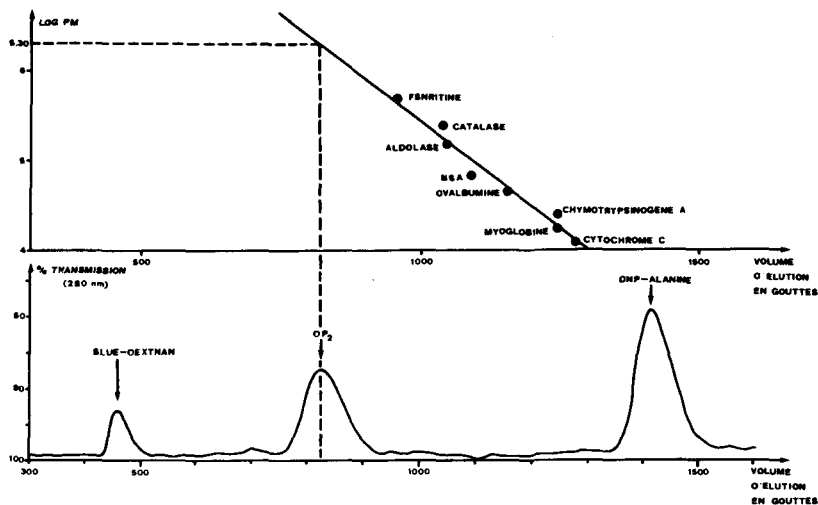


FIGURE 20 Détermination du poids moléculaire de OP_2 par filtration sur gel.

Un échantillon de $150 \mu\text{l}$ est appliqué sur une colonne de Bio-Gel A-5M de 600 mm de long et de 15 mm de diamètre. L'éluion est réalisée par du tampon phosphate pH 7,0 + 0,5 M NaCl. La calibration est effectuée grâce à des protéines de poids moléculaire connu.

Equation de la droite de régression : $y = -0,01318 x + 17,12$.

Chaque groupe de protéines standards est testé plusieurs fois, ainsi que la protéine native (OP_2)¹⁾. Les volumes d'éluion des différentes substances sont assez reproductibles, les petites variations d'un test à l'autre étant de l'ordre de quelques gouttes.

¹⁾ OP_2 est appliqué sur la colonne immédiatement après la purification sur échangeur d'ions, sans lyophilisation préalable.

partielle de O_3 au cours des manipulations. Peut-être O_1 et O_2 représentent-elles respectivement un tétramère et un dimère de notre substance. Leur position sur le gel n'exclut en tout cas pas cette possibilité.

3.7.3.3. Comparaison des électrophorégrammes de OP_2 lyophilisé, d'hémolymphe de femelles et de broyats d'oeufs

Trente μg de OP_2 , l'équivalent de $12 \mu\text{l}$ d'hémolymphe de femelles ayant copulé et nourries depuis 8 jours ainsi que de deux oeufs

ont été simultanément déposés sur un gel en vue d'une électrophorèse sur polyacrylamide (fig. 22). La bande la plus marquée de OP_2 correspond très exactement à HL_2 qui, rappelons-le, est une HGLP. La raie au-dessous migre à la même distance que HL_3 .

Dans le broyat d'oeufs, O_3 couvre la plage allant de HL_1 à HL_3 , bornes non comprises.

3.7.3.4. Détermination du pH isoélectrique de OP_2

Le pH isoélectrique de OP_2 a été déterminé par électrofocalisation. Il se situe entre 6,7 et 7,2. Le manque de précision du résultat est lié à des difficultés techniques rencontrées au cours des expériences. En effet, les échantillons de OP_2 utilisés, provenant d'un stock lyophilisé ou directement du dernier stade de la purification, ont migré sur le gel en laissant derrière eux des traînées de substance précipitée. A la fin de l'opération, nous avons obtenu une large tache composée de 5 à 6 bandes mal résolues, ne permettant pas de donner une valeur précise au pH isoélectrique.

3.7.3.5. Spectre d'absorption de OP_2

Ce spectre présente deux pics principaux, l'un à 278 nm et l'autre à 398 nm. Le rapport entre A_{398} et A_{278} s'élève jusqu'à 0,41 après purification. Plus loin, nous observons un plateau vers 500-510 nm, puis un autre aux alentours de 610 nm (fig. 23).

3.7.4. Etude des fractions protéiques de l'hémolymphe

3.7.4.1. Purification de HL_3 et HL_4

L'hémolymphe, récoltée à partir de femelles nourries et ayant copulé depuis 10 jours, a donné un profil d'élution sur

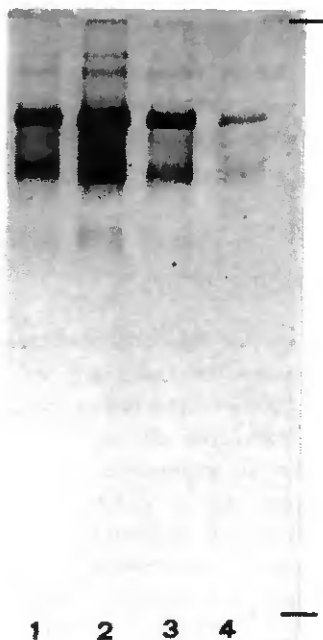


FIGURE 21

Disc-électrophorèse sur polyacrylamide de OP_2 après lyophilisation.

- 1) 20 μg
- 2) 50 μg
- 3) 20 μg
- 4) 5 μg

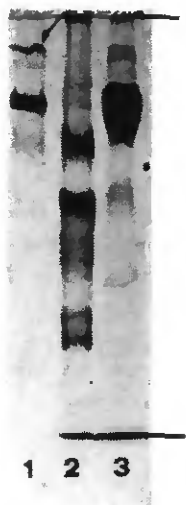


FIGURE 22

Disc-électrophorèse sur polyacrylamide des protéines de l'hémolymphe, de celles de broyats d'œufs, ainsi que de OP_2 .

- 1) OP_2 (30 μg)
- 2) Hémolymphe de femelles nourries depuis 8 jours et ayant copulé (12 μl)
- 3) Broyat d'œufs (équiv. 2 œufs)

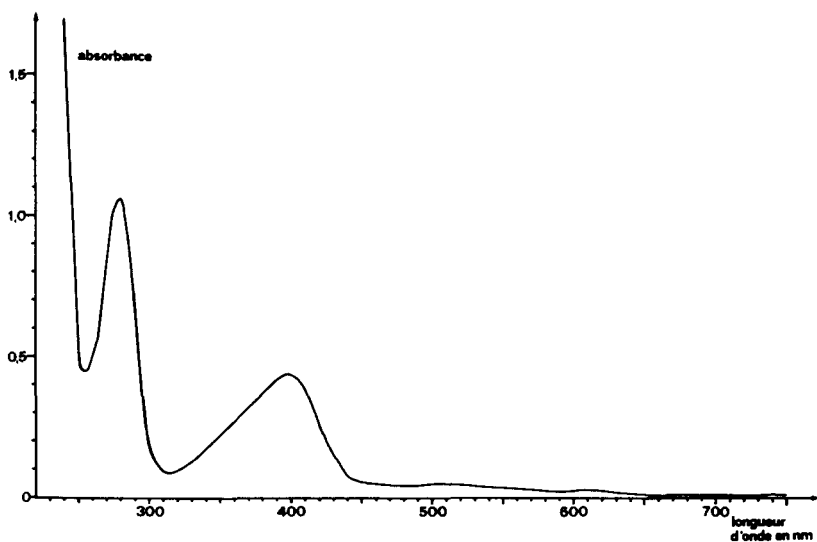


FIGURE 23 Spectre d'absorption de OP_2 .

La mesure est faite en solution aqueuse (tampon phosphate, pH 7,0).

Il est à noter que HL_3 présente un spectre identique.

colonne Bio-Gel A-5M comportant deux pics principaux (fig. 24). Ces pics correspondent à HL_3 et HL_4 , puisque seules ces deux bandes sont très fortement concentrées dans l'hémolymphe de femelles nourries depuis peu. Le premier pic (coloration brune) peut aisément être assimilé à HL_3 (HGLP), tandis que le second s'identifie à HL_4 (pas de coloration visible). A partir de l'étalonnage, on peut calculer les poids moléculaires des deux substances; celui de HL_3 vaut $2,7 \cdot 10^6$ et celui de HL_4 $0,7 \cdot 10^6$.

Ayant répété l'expérience un certain nombre de fois, nous avons pu constater que la hauteur relative des deux pics n'est pas constante. Dans certains cas, HL_3 est plus concentrée et dans d'autre, HL_4 est présente en quantités plus grandes. Bien que prélevée toujours sur des femelles nourries depuis 10 jours, l'hémolymphe d'un échantillon ne montre pas, quantitativement, une composition reproductible de ses constituants protéiques.

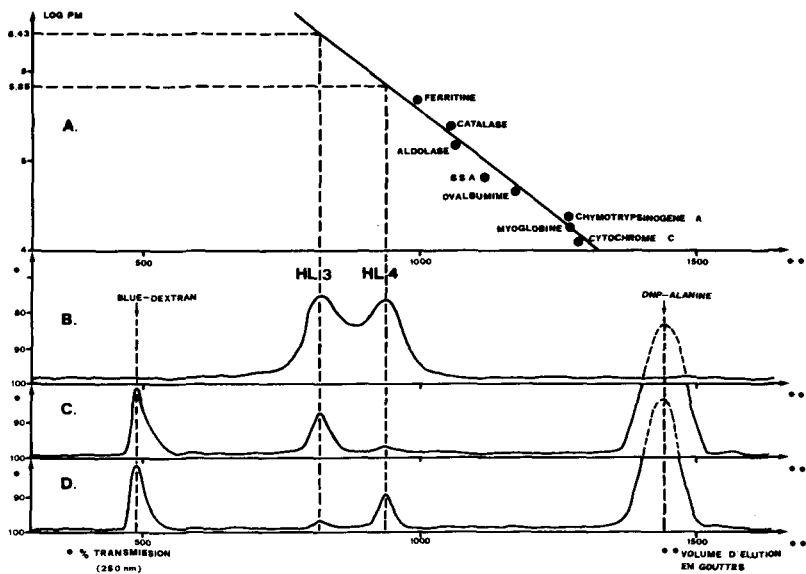


FIGURE 24 Purification et détermination du poids moléculaire des protéines de l'hémolymphe HL_3 et HL_4 sur colonne Bio-Gel A-5 M (ϕ : 15 mm, longueur : 600 mm). L'hémolymphe provient de femelles nourries depuis 10 jours et ayant copulé.

A. Etalonnage à l'aide de protéines standards.

Equation de la droite de régression : $y = -0,004874x + 10,42$

B. Elution d'un mélange de 300 μ l d'hémolymphe centrifugée et de 100 μ l d'un campon phosphate pH 7,0. HL_3 et HL_4 sont alors collectées séparément et les protéines précipitées par addition de $(NH_4)_2SO_4$ solide (80 % sat.). Après centrifugation, le culot est dissout dans 200 μ l de tampon phosphate pH 7,0 contenant du Blue-Dextran et de la DNP-Alanine.

C. Elution de la fraction HL_3 collectée précédemment (B).

D. Elution de la fraction HL_4 collectée précédemment (B).

Après les étapes C et D, HL_3 et HL_4 sont dialysées et lyophilisées. Nous avons récolté 2,7 mg de HL_3 et 2,5 mg de HL_4 .

Ce fait traduit les variations individuelles des 30 à 50 individus utilisés comme donneurs d'hémolymphe. En effet, la vitellogénèse est pratiquement terminée après 10 jours chez certaines femelles, alors qu'elle débute à peine chez d'autres. Nous n'avons pas analysé les variations relatives des concentrations de ces deux substances au cours du temps.

3.7.4.2. Spectre d'absorption de HL₃ et HL₄ purifiées

La fraction protéique HL₄ n'absorbe pas dans le visible; par contre, un pic d'absorption très net se situe à 278 nm. Nous n'avons pas représenté ce spectre ici. Le spectre de HL₃ est identique à celui de OP₂ (cf. fig. 23).

3.7.5. Tests immunologiques

Nous avons préparé du sérum contenant des anticorps anti-OP₂ suivant la technique décrite sous 2.7.5.1.

3.7.5.1. Tests d'Ouchterlony

Le sérum a été testé tout d'abord contre différentes quantités de OP₂ (fig. 25). Une dose de 3 µg a encore été nettement détectée.

Nous avons ensuite recherché les parentés immunologiques entre certaines substances, purifiées ou non (fig. 26). O₁₂₀₀, O₁₄₀₀ et O₁₅ présentent une parenté évidente avec OP₂, puisqu'un arc de précipitation apparaît, ce qui renforce l'hypothèse d'une fragmentation de molécule. L'hémolymphe de femelles nourries et ayant copulé est également antigénique, contrairement à celle des individus vierges et à jeun (fig. 26 A). L'arc correspondant à O₁₂₀₀ est plus éloigné du trou central que les autres. En admettant l'hypothèse d'une di- ou tétramérisation (voir 3.7.2.), nous pourrions expliquer le fait que la diffusion ait eu lieu à une vitesse plus faible. Cette supposition mérite d'être

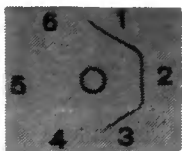


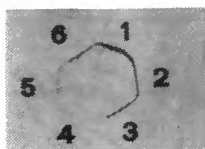
FIGURE 25

Détermination de la quantité minimale de protéine OP_2 nécessaire à la réalisation d'un test d'Ouchterlony.

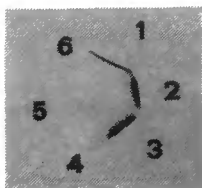
Un sérum anti- OP_2 , produit par sensibilisation d'un lapin, est utilisé à dilution 1 : 1.

Diverses quantités de protéine OP_2 sont testées :

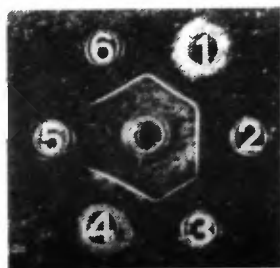
- | | |
|---------------------|-----------------------|
| 1) 15 μg | 4) 1,5 μg |
| 2) 6 μg | 5) 0,3 μg |
| 3) 3 μg | 6) 0,15 μg |



A



B



C

FIGURE 26

Recherche des parentés immunologiques de la protéine OP_2 avec différentes substances par le test d'Ouchterlony. Le sérum anti- OP_2 utilisé est à dilution 1 : 1.

- | | | |
|---|---|--|
| <p>A. 1) OP_2 15 μg
 2) O_{15} 3 μg
 3) O_{1400} 10 μg
 4) Hémolymphe de femelles vierges à jeun (2 μl)
 5) O_{1200} 10 μg
 6) Hémolymphe de femelles nourries depuis 10 jours et ayant copulé (2 μl)</p> | <p>B. 1) OP_2 15 μg
 2) Idem A 6)
 3) Broyat d'oeufs (équival. 1 oeuf)
 4) Hémolymphe de mâles nourris depuis 10 jours (2 μl)
 5) Hémolymphe de mâles à jeun (2 μl)
 6) Id. A 4)</p> | <p>C. 1) Id. A 6)
 2) Id. B 3)
 3) HL_3 purifiée 20 μg
 4) Id. A 6)
 5) HL_4 purifiée 20 μg
 6) OP_2 12 μg.</p> |
|---|---|--|

confirmée.

Dans le test suivant, nous avons expérimenté différents types d'hémolymphe (fig. 26 B). Celle des mâles nourris ou à jeun ne réagit pas avec les anticorps, de même que celle des femelles vierges à jeun. Par contre, l'hémolymphe de femelles ayant copulé et le broyat d'oeufs montrent une forte réaction antigénique. De plus, 2 arcs distincts parallèles sont visibles dans les deux cas. Il peut s'agir soit d'un artefact, ou bien d'une fragmentation de la molécule lors de la diffusion. Nous nous sommes demandé si les bandes HL₃ et HL₄ sont responsables de l'antigénicité de l'hémolymphe. Nous avons donc testé ces substances (fig. 26 C). Il apparaît clairement que tous les arcs sont reliés de façon continue, ce qui dénonce la présence d'une entité antigénique commune à ces divers produits. HL₃ a donc une étroite parenté antigénique avec OP₂ alors que HL₄ ne réagit absolument pas contre les anticorps. Signalons qu'en position 2, le fait que l'arc semble double n'est qu'un artefact et provient de la lumière rasante utilisée pour prendre la photographie.

3.7.5.2. Immunoélectrophorèses

Pour compléter les résultats précédents, nous avons procédé à une série d'immunoélectrophorèses sur gels d'agarose. La figure 27 (A, B) illustre les premiers résultats. Le broyat brut d'oeufs possède un arc très marqué se situant autour de la zone de dépôt, montrant que l'antigène a peu migré. OP₂, O₁₂₀₀, O₁₄₀₀ et O₁₅ se sont déplacés un peu plus loin. L'hémolymphe de femelles nourries et ayant copulé ne présente qu'un seul arc, comme les autres échantillons testés. Toutefois, celui-ci est très allongé, et on peut supposer qu'il est probablement dû à plusieurs protéines différentes possédant un antigène commun. HL₁ et HL₂, qui sont des HGLP, pourraient être ces protéines. Il est néanmoins très difficile, sur de telles plaques, de tirer des conclusions concernant de faibles différences de migration. En effet, dans les mêmes conditions d'expérience, le

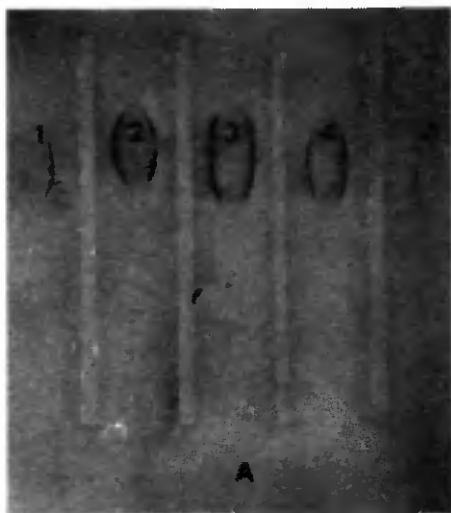


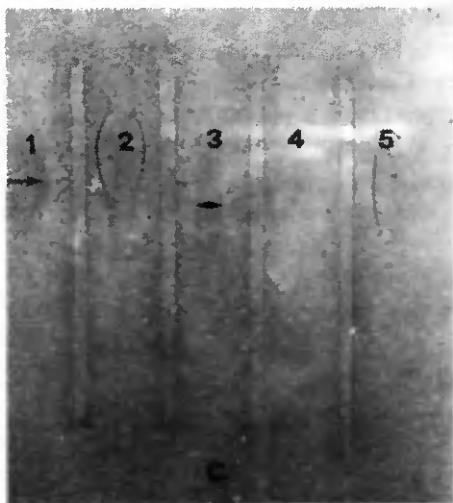
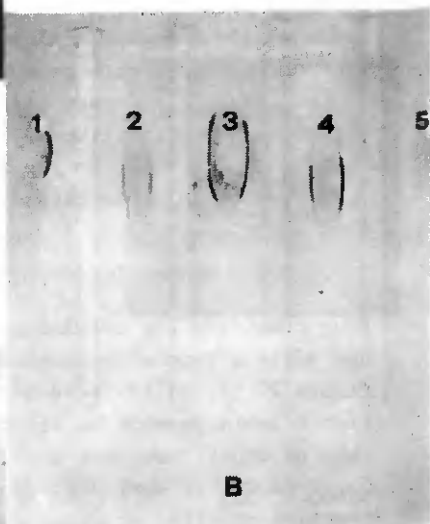
FIGURE 27

Recherche des parentés immunologiques de la protéine OP_2 avec différentes substances par immunoelectrophorèse.

Le sérum anti- OP_2 utilisé est à dilution 1 : 1²

- A. 1) OP_2 35 μ g
- 2) Broyat d'œufs (équiv. 1 œuf)
- 3) Hémolymphe de femelles nourries depuis 10 jours et ayant copulé (2 μ l)
- 4) OP_2 35 μ g
- 5) O_{1200} 10 μ g

- B. 1) Id. A 2)
- 2) O_{1400} 10 μ g
- 3) Id. A 3)
- 4) O_{15} 20 μ g
- 5) O_{1200} 10 μ g



- C. 1) OP_2 20 μ g
- 2) Id. A 2)
- 3) HL 3 purifiée 10 μ g
- 4) HL 4 purifiée 10 μ g
- 5) Id. A 3)

broyat d'oeufs s'est moins déplacé sur la première plaque (fig. 27 A) que sur la seconde (fig. 27 B). Par contre, le phénomène inverse s'est produit pour O_{1200} . Malgré une coloration générale de faible intensité, l'immuno-électrophorégramme de OP_2 , HL_3 et HL_4 purifiés a permis d'observer un arc de précipitation pour OP_2 ainsi que pour HL_3 (fig. 27 C). Cette dernière substance a migré relativement loin de la zone de dépôt et l'extrémité distale de son arc de précipitation correspond approximativement à celle de l'arc obtenu avec l'hémolymphe brute de femelles nourries depuis 10 jours et ayant copulé. HL_4 n'a montré aucun arc de précipitation, confirmant en cela les résultats des tests d'Ouchterlony.

3.7.6. Disc-électrophorèse en SDS de différentes protéines purifiées

Pour compléter nos résultats, nous avons procédé à des électrophorèses en SDS des trois protéines purifiées, HL_3 , HL_4 et OP_2 . Un premier essai nous a permis de répertorier les sous-unités composant ces protéines (fig. 28 A). On peut observer des bandes bien marquées à 7 niveaux différents (a, b, c, d, e, f, g).

HL_3 présente 4 sous-unités (niveau a, b, c, d) que nous avons appelées HL_{3a} , HL_{3b} , HL_{3c} et HL_{3d} . HL_{3b} semble en fait être composée de 2 bandes distinctes, alors que HL_4 ne montre que 2 sous-unités (HL_{4d} et HL_{4e}). La bande apparaissant au niveau a résulte probablement d'une contamination avec HL_3 , découlant d'une purification incomplète. OP_2 est composé de 6 sous-unités (OP_{2b} , OP_{2c} , OP_{2d} , OP_{2e} , OP_{2f} , OP_{2g}). Les deux dernières sont plus faiblement marquées et pourraient éventuellement provenir d'une contamination avec d'autres protéines de l'oeuf. OP_{2b} se présente comme une seule tache, contrairement à HL_{3b} .

Un deuxième test a confirmé les observations du premier (fig. 28 B). Ici néanmoins, HL_{3b} n'apparaît pas scindé en deux

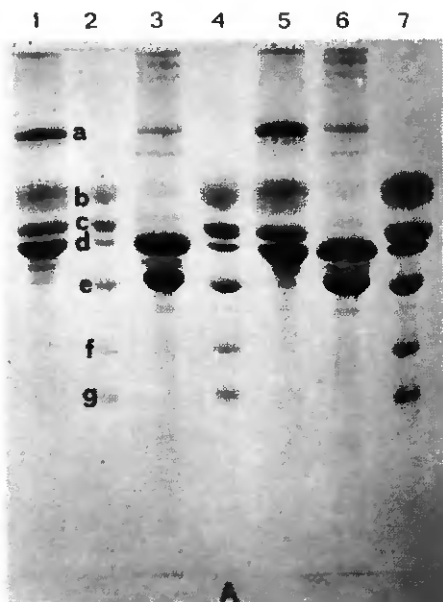
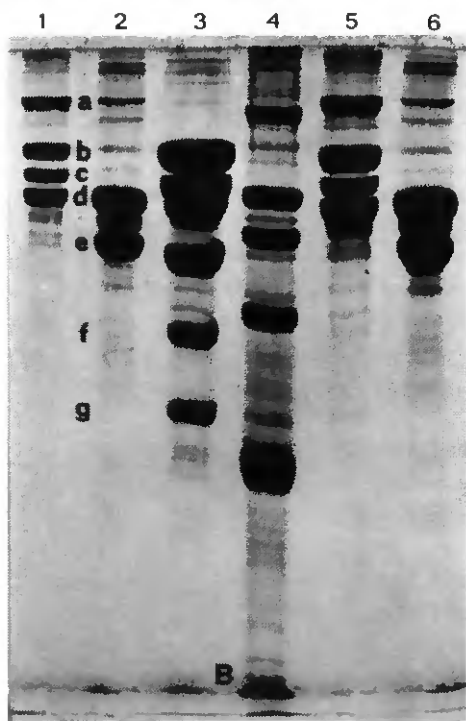


FIGURE 28

Electrophorèse en SDS des protéines
HL₃, OP₂ et HL₄.

- A. 1) HL₃
2) OP₂
3) HL₄
4) OP₂
5) HL₃
6) HL₄
7) OP₂



- B. 1) HL₃
2) HL₄
3) OP₂
4) Protéines standards
5) HL₃
6) HL₄

parties et OP_2d migre plus loin que HL_3d et HL_4d . Cela provient vraisemblablement de la trop grande quantité de substance placée dans la fente no 3.

Grâce à des protéines standards, nous avons pu estimer le poids moléculaire des différentes sous-unités (fig. 29). Nous ne savons évidemment pas si les bandes enregistrées à des niveaux semblables correspondent aux mêmes molécules. Néanmoins, nous voyons sur le tableau de la figure 29 que les poids moléculaires s'échelonnent entre 190.000 et 49.000, du niveau a au niveau g.

Dans cette analyse, nous n'avons tenu compte que des bandes majeures constituant les protéines étudiées. Nous avons par exemple négligé, chez HL_4 , une zone faiblement colorée, située entre HL_4d et HL_4e ¹⁾.

Pour résumer nos observations, relevons que OP_2 est constitué principalement de six sous-unités, HL_3 de quatre et HL_4 de deux (Tableau 32). Il semble en outre que des correspondances puissent exister entre certaines d'entre elles, appartenant à des protéines différentes.

1) Cette position correspond à un poids moléculaire de 110.000 environ.

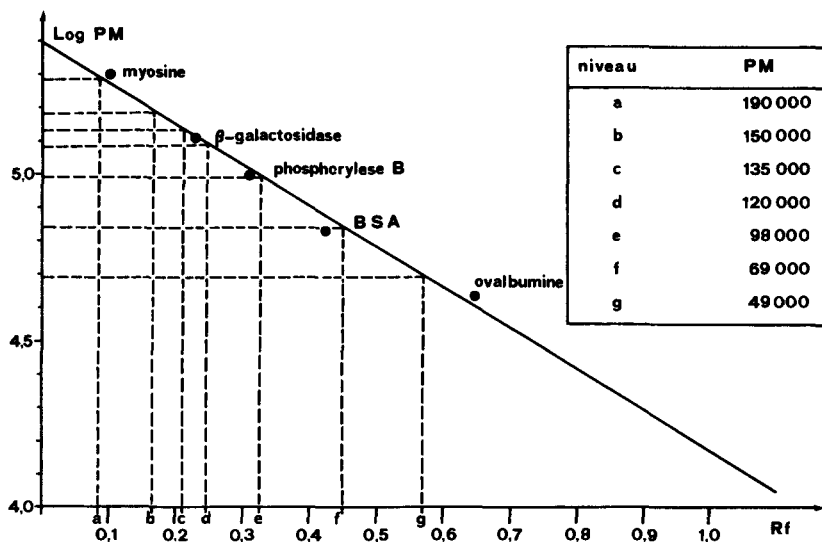


FIGURE 29 Détermination du poids moléculaire des sous-unités composant OP_2 , HL_3 et HL_4 sur un gel SDS de polyacrylamide à 10 %.



Le gel est étalonné grâce à des protéines standards de poids moléculaire connu (voir fig. 28 B). Les R_f obtenus pour a, b, c, d, e, f et g sont reportés sur la droite d'étalonnage afin d'estimer les poids moléculaires correspondants.

Equation de la droite de régression : $y = - 1,206 x + 5,38$

Le tableau figuré consigne les résultats obtenus.

Protéine Niveau	HL ₃	HL ₄	OP ₂
a	■	□	□
b	■	□	■
c	■	□	■
d	■	■	■
e	□	■	■
f	□	□	■
g	□	□	■

Tableau 32 : Protéines purifiées à partir de l'hémolymphe et des oeufs : synthèse des résultats obtenus en électrophorèse SDS.

Présence  ou absence  d'une sous-unité au niveau correspondant.

4.1. PARAMETRES DE L'ELEVAGE

Nos résultats concernant la mesure de différents paramètres de l'élevage démontrent tout d'abord la difficulté de travailler avec O. moubata, la souche utilisée se comportant de manière hétérogène. Ainsi, les poids moyens des tiques ne sont pas comparables entre eux au cours du temps, ceux-ci ayant eu tendance à augmenter entre 1975 et 1979. Les causes de ces variations nous sont partiellement inconnues. La souche, conservée depuis une vingtaine d'années dans notre laboratoire, a été périodiquement "rafraichie" par l'apport de nouveau matériel. Cet apport pourrait expliquer en partie les variations enregistrées. Quoi qu'il en soit, nous avons pris un maximum de précautions lors des expériences, notamment en répartissant les femelles de façon purement aléatoire à l'intérieur des lots et en prenant bien soin d'avoir des lots témoins en suffisance pour chaque essai.

Certains paramètres sont plus stables que le poids. Il s'agit en particulier du "rendement" de la ponte exprimé par le rapport R_2 ¹⁾. En moyenne, une femelle pond 0,72 oeufs par milligramme de sang ingéré, ou encore 0,39 mg de "matière" pour 1 mg de sang ingéré. Soulignons que ce rapport est relatif puisque nous mesurons le poids frais des oeufs et le poids de sang concentré après élimination du liquide coxal. Le rapport entre poids gorgé et poids à jeun (R_1) est également un critère stable. Une femelle de O. moubata quintuple approximativement son poids après un repas sanguin, sans compter le liquide coxal éliminé pendant et sitôt après la nutrition. En corrigeant ce facteur par les données de BALASHOV (1972) concernant O. tholozani, nous obtenons chez O. moubata un poids de tique gorgée environ

1) défini sous 3.1.3. tel que : $R_2 = \frac{\text{nombre d'oeufs pondus}}{\text{poids de sang ingéré}}$

huit fois supérieur au poids à jeun ¹⁾. Ce résultat est en accord avec les chiffres cités par BALASHOV; cet auteur indique un accroissement de 5 à 12 fois pour les Argasides.

Le poids des ovaires secs est un critère intéressant, bien qu'il soit difficile d'obtenir des mesures homogènes chez les femelles accomplissant leur vitellogénèse.

Le poids des oeufs varie peu d'un échantillon à l'autre; sur quatre lots pesés, les différences enregistrées n'excèdent pas 3,2 %. Le poids moyen d'un oeuf se situe au voisinage de 0,54 mg.

Cette étude préalable nous a permis de constater que, malgré certains paramètres fluctuants (poids moyen des femelles et durée de préoviposition notamment), il est possible de travailler avec O. moubata moyennant de sérieuses précautions quant à la conception des expériences et à leur interprétation.

4.2. STIMULATION DE LA VITELLOGENESE AU MOYEN D'UN FACTEUR CHIMIQUE PRODUIT PAR LE MALE

Nos résultats fixent la valeur du poids moléculaire de ce facteur entre 1'600'000 et 1'900'000. Il faut cependant relever que ces données ne sont pas absolues. En effet, la substance active est éluée sur la colonne en un temps plus court que la ferritine, qui constitue la protéine standard la moins retenue de notre droite étalon. Cela nous oblige à extrapoler à partir de cette droite et la moindre imprécision dans l'étalonnage peut alors modifier la valeur cherchée. D'autre part, le poids moléculaire estimé dans ce travail constitue un poids apparent, valable seulement pour les protéines "sphériques". Or, il est connu que certaines glycoprotéines en particulier ont un poids moléculaire réel bien inférieur à celui que l'on peut mesurer par filtration sur gel (ANDREWS, 1964, 1965). Nous ne pouvons

1) BALASHOV signale une perte de liquide coxal représentant le 39 % du poids de sang ingéré chez la femelle de O. tholozani. En supposant qu'il en est de même chez O. moubata, nous pouvons calculer l'augmentation de poids réelle.

également exclure la formation d'agrégats entraînant une surestimation de la taille des molécules. Néanmoins, il est très probable que la substance active se présente sous la forme d'une grosse molécule. Nous confirmons donc ici les résultats de GERMOND & AESCHLIMANN (1977) qui indiquent un poids moléculaire d'au moins 150'000, pour cette substance. Ces auteurs soulignent d'autre part la grande thermolabilité du produit et formulent l'hypothèse qu'il s'agit d'une protéine ou d'un complexe protéique.

Chez les insectes, plusieurs auteurs ont isolé des substances analogues produites par le mâle et stimulant la vitellogénèse et la ponte chez la femelle. Ces composés sont des peptides chez Drosophila melanogaster (BURCKHARDT, 1975), des dérivés d'acides aminés chez D. funebris (BAUMANN, 1974) ou encore des protéines chez Aedes aegypti (FUCHS & HISS, 1970). La taille de ces molécules actives est relativement modeste comparée à nos résultats. Le poids moléculaire est inférieur à 3000, sauf pour la matrone α , présente dans les glandes annexes du mâle d'A. aegypti (P.M. = 60'000).

Chez O. moubata, nos résultats montrent que l'activité de la substance persiste après digestion par la trypsine, bien que les conditions d'incubation soient proches de l'optimum pour l'enzyme (pH 8,0; température : 30° C). D'autre part, l'activité de cette substance se perd au cours d'une ultrafiltration (Sephadex, ou Minicon B-15), empêchant ainsi de concentrer le produit à des fins d'analyse. A l'aide des tests biochimiques de LOWRY & al (1951)¹⁾ et de SEDMAK & GROSSBERG (1977)²⁾, nous n'avons jamais pu mettre des protéines en évidence dans les fractions actives, au sortir d'une colonne de Bio-Gel. Ces observations peuvent nous amener à douter de la nature protéique de la substance. On peut toutefois supposer qu'un des

1) seuil de sensibilité : 5 à 10 μg d'albumine par ml.

2) seuil de sensibilité : 0,5 μg d'albumine par ml.

polypeptides qui serait libéré par l'action de la trypsine reste actif. Il est également possible que les conditions d'hydrolyse, choisies pour être optimales, ne permettent pas une digestion complète de la substance. En effet, la durée d'incubation, fixée à 30 minutes, est peut-être trop courte et une faible activité résiduelle suffirait à laisser croire que la protéine est encore intacte, bien que la caséine soit digérée à plus de 95 % dans les mêmes conditions expérimentales.

Il est par conséquent établi que si la substance active est une protéine, elle agit à très faible concentration, comme le font les hormones.

Ces observations nous amènent à formuler un certain nombre d'hypothèses quant à la nature de la substance active étudiée. Il s'agit peut-être d'une petite molécule, protéique ou non, incorporée à un grand complexe. S'il en est ainsi, l'incorporation se fait vraisemblablement dans le spermiphore. Rappelons que les spermatides, chez les tiques, sont stockées au niveau des vésicules séminales du mâle et n'accomplissent leur dernière phase de maturation que dans les voies génitales de la femelle (élongation et activation physiologique : revue par BALASHOV, 1972, & OLIVER, 1974). L'hypothèse qu'une petite molécule puisse être incorporée à un gros transporteur lors de la spermiogénèse a l'avantage d'expliquer pourquoi un broyat actif de vésicules séminales ne présente aucun effet dans les fractions à haut poids moléculaire, contrairement au surnageant de spermiphores prélevés chez la femelle ayant copulé.

Nos recherches ont confirmé que les homogénats de testicules, ou de glandes annexes, n'ont aucun effet gonadotrope chez la femelle, contrairement aux broyats de vésicules séminales. Ceci appuie les résultats d'AESCHLIMANN (1968) et GERMOND & AESCHLIMANN (1977). Il semble bien établi que ce sont les spermiphores eux-mêmes qui synthétisent, ou du moins qui activent et transportent la substance concernée. Celle-ci serait libérée dans la femelle après la copulation. Il nous semble donc judicieux d'assimiler ce produit

à une phéromone ¹⁾, bien qu'il n'ait un contact avec le milieu extérieur que dans l'utérus de la femelle. Chez les insectes, les travaux publiés montrent que de telles substances sont synthétisées au niveau des paragonies, ou glandes annexes du mâle et transportées vers la femelle par le fluide séminal (FUCHS & HISS, 1970; BAUMANN, 1974; revue par HINTON, 1974, HUGIGNARD & al, 1977). Ces produits sont de même susceptibles d'être définis comme des phéromones.

Chez certaines tiques, le fluide séminal véhicule également la ou les substances actives (*Dermacentor variabilis* : PAPPAS & OLIVER, 1972; *Amblyomma hebraeum* : SPICKETT, 1978; *O. tholozani*; GALUN & WARBURG, 1967). Cependant, ces auteurs ne prouvent pas que la synthèse ait lieu dans les glandes accessoires. Aucun de ces travaux ne met en évidence la nature chimique du produit actif, ni son poids moléculaire. GALUN & WARBURG suggèrent qu'il pourrait éventuellement s'agir de catécholamines chez *O. tholozani*, ce qui n'a toutefois pas été prouvé.

O. moubata représente donc le seul exemple connu d'Arthropode où les spermiphores véhiculent eux-mêmes le messenger chimique permettant le déroulement complet du processus vitellogénèse-ponte, chez la femelle. En plus du transport, il se pourrait même que le spermiphore soit responsable de la synthèse du produit; ceci reste cependant à démontrer.

Nous avons établi également que le stimulus persiste sur une assez longue durée chez la femelle (deux mois et demi au minimum), comme si un "commutateur" était enclenché une fois pour toutes. Ces observations mériteraient d'être complétées en suivant le phénomène sur une plus longue période. AESCHLIMANN & GRANDJEAN (1973 b) ont d'ailleurs montré que des femelles de *O. moubata* ayant copulé une seule fois peuvent pondre tous les 3 mois durant 2 ans, moyennant un repas de sang chaque trimestre. Mais la présence de spermiphores vivants dans l'utérus, suite à la copulation, interdit une comparaison directe avec nos résultats.

1) Selon KARLSON & LUSCHER (1959), une phéromone est une substance sécrétée par un individu dans le milieu extérieur et agissant sur un autre individu de la même espèce, chez lequel elle provoque une réaction comportementale ou un processus de développement.

4.3. STIMULATION DE LA VITELLOGÈNESE PAR L'ACTION MECANIQUE DE LA COPULATION

Chez les femelles vierges d'O. moubata, la stimulation mécanique par des billes d'acier placées dans l'utérus permet le déroulement complet de la vitellogénèse et de la ponte. Le nombre d'oeufs récoltés, bien que variant d'un lot à l'autre, est en général un peu plus faible que chez les témoins ayant copulé. Le rôle de l'utérus dans la transmission du stimulus n'est pas clairement établi. Le vagin, par exemple, pourrait aussi être impliqué dans ce processus, puisqu'il est également distendu par le passage des billes. Soulignons que nous ne savons pas si la distension est vraiment nécessaire au déclenchement du stimulus. Il est possible que le simple frottement des billes dans le système génital suffise à induire le signal. Nous ignorons également si ce signal est transmis par voie nerveuse ou humorale.

Nos travaux sont à rapprocher de ceux d'OLIVER (1975) sur Amblyomma americanum et de LEAHY & GALUN (1972) sur Argas persicus. Ces auteurs montrent en effet qu'une action mécanique stimule la vitellogénèse chez A. americanum et A. persicus. Mais ce stimulus est incomplet puisqu'il n'induit pas la ponte, ni même l'ovulation. Chez O. moubata, au contraire, nos résultats démontrent que la stimulation fait pondre une femelle vierge.

Chez plusieurs espèces d'insectes, la copulation influence positivement la vitellogénèse et la ponte par un moyen purement mécanique. L'implantation d'un spermatophore artificiel dans la bursa copulatrix d'une femelle de Diploptera provoque le même effet sur la maturation des oeufs qu'une copulation normale (ENGELMANN, 1959; ROTH & STAY, 1961); une telle implantation, ainsi que l'accouplement avec un mâle castré, active la vitellogénèse chez la femelle de Leucophaea (ENGELMANN, 1960).

Aucun phénomène de synergie entre stimulation mécanique et chimique n'a clairement été mis en évidence lors de nos expériences, en raison du faible nombre d'individus utilisés. Toutefois, l'action chimique à elle seule paraît plus efficace que l'action mécanique.

Chez O. moubata, la copulation provoque donc la vitellogénèse et la ponte par deux stimuli, l'un chimique et l'autre mécanique.

4.4. STIMULATION DE LA VITELLOGENESE PAR L'IMPLANTATION DE "CERVEAUX"

Nos résultats indiquent de façon claire que l'implantation de "cerveaux" stimule la vitellogénèse de femelles vierges et nourries depuis 100 jours. Mais cette stimulation ne supplée pas la copulation normale puisqu'elle ne provoque pas la ponte. Les ovocytes accomplissent une vitellogénèse abortive, comparable à celle décrite par AESCHLIMANN (1968) et GERMOND & AESCHLIMANN (1977) chez les femelles vierges et nourries. Mais il est difficile d'observer des différences dans la réponse au stimulus, selon l'état du "cerveau" transplanté. En effet, ni le sexe, ni l'état physiologique du donneur ne semblent avoir une grande influence sur la réponse enregistrée. La présence ou l'absence du complexe rétro-cérébral n'apporte pas non plus de modification notable dans les réponses observées. AESCHLIMANN (1968) a montré, chez O. moubata, que des broyats de "cerveaux" provenant de femelles nourries et ayant copulé, injectés dans l'hémocoèle de femelles vierges juste avant le repas sanguin, provoquent la ponte après une période normale de pré-oviposition. Par contre, si les "cerveaux" broyés proviennent de femelles vierges (à jeun ou non), l'injection n'a pratiquement pas d'effets. Nous avons répété ces expériences, mais en injectant

les homogénats ¹⁾ à des femelles vierges et nourries depuis 100 jours. Les résultats négatifs enregistrés (absence de vitellogénèse ou mort des individus, selon que le broyat avait subi ou non une centrifugation préalable) montrent bien qu'il est impossible de comparer directement les effets d'un traitement sur des tiques se trouvant dans des états physiologiques différents. Le repas sanguin, administré directement après l'injection, agit probablement comme un stimulus supplémentaire, puisqu'il permet l'ébauche de la vitellogénèse (AESCHLIMANN, 1968). Chez beaucoup d'espèces d'insectes, les stimuli liés à la copulation, la photopériode et la nourriture notamment, influencent l'organisme via les cellules neurosécrétrices (CNS) (voir revues par HIGHNAM, 1965; HIGHNAM & HILL, 1977). Chez Rhodnius prolixus, des neurosécrétions facilitent la ponte de la femelle (DAVEY, 1967, 1974). En ce qui concerne Locusta migratoria, le système neurosécréteur contrôle directement la biosynthèse des protéines au niveau des corps gras et également l'activité des corpora allata (GIRARDIE, 1966). Chez les moustiques tels qu'Aedes aegypti, des neurosécrétions agissent directement sur l'ovaire de la femelle qui, lui, va contrôler la synthèse des vitellogénines au niveau des corps gras, par l'intermédiaire d'ecdysone (LEA, 1972; HAGEDORN & FALLON, 1973; FALLON & al, 1974). Le cerveau joue donc souvent un rôle déterminant dans le cycle reproducteur de la femelle (revues de ENGELMANN, 1970; DOANE, 1973). Chez les tiques, plusieurs travaux montrent que l'activité neurosécrétrice du "cerveau" varie en fonction de la copulation et du repas sanguin chez la femelle (EICHENBERGER, 1970; EISEN & al, 1973; GABBAY & WARBURG, 1976). Nos résultats concernant les transplantations chez O. moubata sont difficiles à interpréter et un certain nombre d'hypothèses peuvent être envisagées. Tout d'abord, il est possible que le stimulus appliqué soit de nature non-spécifique et que certaines

1) Equivalent de un "cerveau" par femelle pour la dilution 1/1

substances, s'écoulant par des lésions de l'organe transplanté, agissent directement sur le processus de digestion en l'augmentant temporairement. A l'appui de cette hypothèse, rappelons que les "cerveaux" de tiques mâles se montrent également très actifs. La substance stimulante ne serait donc pas liée au sexe. Comme deuxième hypothèse, nous pouvons suggérer que des neurosécrétions spécifiques à l'activation de la vitellogénèse jouent effectivement un rôle chez O. moubata et que le petit nombre d'individus testé n'a pas suffi à mettre en évidence des variations quantitatives du taux de ces sécrétions. Les femelles d'O. moubata à jeun montrent d'ailleurs une légère activité neurosécrétrice, bien que celle-ci soit nettement plus faible qu'après le repas sanguin (EICHENBERGER, 1970). Il est probable également que l'activité neurosécrétrice du "cerveau" transplanté subisse l'effet d'un mécanisme de rétroaction de la part de l'hôte et modifie ainsi très rapidement son propre état physiologique après la transplantation. Une telle rétroaction est suggérée par GABBAY & WARBURG (1976) chez O. tholozani. Ces auteurs observent que le nombre de cellules neurosécrétrices oscille faiblement entre le 2e et le 10e jour suivant le repas sanguin. Ils attribuent ces variations à un effet de rétroaction des différents stades de la digestion sur le "cerveau".

4.5. STIMULATION DE LA VITELLOGENESE PAR UN APPORT
 EXOGENE D'HORMONES JUVENILES. ETUDE DES EFFETS
 INHIBITEURS DES "PRECOCENE 1 et 2"

Jusqu'à présent, l'endocrinologie des Arthropodes s'est principalement développée chez les insectes, où l'on a clairement mis en évidence le fait que les hormones juvéniles jouent un rôle important pour la vitellogénèse chez un grand nombre d'espèces.

Ces hormones agissent souvent comme dernier relais, en stimulant la biosynthèse des vitellogénines au niveau du corps gras et l'incorporation de celles-ci dans les ovocytes (voir revue par HIGHNAM & HILL, 1977). Les "Precocene" interfèrent sélectivement avec la biosynthèse d'hormones juvéniles dans les corpora allata, chez certains insectes (BOWERS & al, 1976; PRATT & BOWERS, 1977; PENER & al, 1978; BROOKS & al, 1979; PRATT & al, 1980). Un apport exogène d'hormone juvénile peut néanmoins rétablir une vitellogénèse normale chez Drosophila melanogaster par exemple (LANDERS & HAPP, 1980).

Nos résultats montrent que l'injection d'un mélange de stéréoisomères des hormones juvéniles I et III provoque la vitellogénèse et la ponte chez des femelles d'O. moubata, vierges et nourries depuis 100 jours. La dose optimale est voisine de 50 microgrammes d'hormone par individu. Nous n'avons pu déterminer une différence spécifique d'activité entre JH-I et JH-III. D'autre part, les pontes enregistrées après injection d'hormones juvéniles sont plus tardives et moins abondantes qu'après une copulation normale. L'injection d'isomères naturels de JH-I et JH-III stimule la ponte dans moins de 15 % des cas. JH-II est par contre plus active (29 % de pontes pour une dose de 100 μ g par individu). Les isomères naturels des hormones juvéniles ont donc une action très faible, voire nulle, sur la vitellogénèse et la ponte d'O. moubata. Il est intéressant de noter que BASSAL & ROSHDY (1974) parviennent à stopper la diapause d'Argas arboreus et à provoquer la ponte chez des femelles nourries et ayant copulé. Mais ces auteurs ne réussissent pas à induire la ponte chez des femelles vierges et nourries. Le produit utilisé est un analogue d'hormone juvénile¹⁾ et non l'hormone naturelle des insectes. Rappelons toutefois que O. moubata ne subit pas de diapause, ce qui ne permet pas d'effectuer un rapprochement entre les deux espèces.

1) Il s'agit de l'acétaldéhyde 2 - (2-ethoxyethoxy) éthyl-p-(méthylthio) phényl acétal.

Nos observations contredisent celles de MANSINGH & RAWLINS (1977) qui constatent une nette inhibition de la ponte par différents analogues d'hormone juvénile chez Boophilus microplus. Précisons cependant que B. microplus est un Ixodide dont la biologie est très différente de celle des Argasides. Il est par conséquent difficile d'établir des comparaisons.

Les traitements effectués sur O. moubata à l'aide des "Precocene 1 et 2" ont des conséquences différentes suivant le produit utilisé, la dose administrée, ainsi que le moment où la tique est mise en contact avec la substance. Le "Precocene 1" ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) empêche les femelles de se nourrir s'il est appliqué avant le repas sanguin. Le même produit, à une dose identique, ralentit la vitellogénèse et retarde la ponte quand l'application est faite après le repas de sang; le nombre de pontes observées est également plus faible que chez les témoins ayant copulé. Le "Precocene 2" paraît moins actif que le "Precocene 1". Il conduit néanmoins à des pontes retardées dans des conditions extrêmes (traitements faits avant et après le repas sanguin avec une dose de $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Ces résultats sont en accord partiel avec ceux de POUND & OLIVER (1979) qui provoquent l'inhibition de la vitellogénèse chez des femelles de O. parkeri au moyen du "Precocene 2". Mais ces auteurs parviennent à annuler l'effet du produit par une application de JH-III, ce qui semble montrer que l'action inhibitrice du "Precocene" est ici relativement spécifique. Chez O. moubata, au contraire, nos observations suggèrent plutôt un effet toxique non-spécifique, puisque la vitellogénèse n'est fortement ralentie qu'à des doses sublétales. Le métabolisme de la tique est perturbé et n'est probablement plus capable d'assumer correctement la vitellogénèse. Pour un retour au fonctionnement normal, il faut attendre le moment où l'animal n'est plus en contact avec le produit (11 jours après le repas). Des processus de détoxification jouent peut-être un rôle dans le rétablissement des fonctions métaboliques. Chez A. persicus, O. coriaceus et Rhipicephalus sanguineus,

des traitements au "Precocene 2" diminuent également l'activité vitellogénique des femelles sans qu'il soit possible d'annuler les effets du produit au moyen d'applications externes d'hormones juvéniles (LEAHY & BOOTH, 1980).

Soulignons encore que personne n'a pu, jusqu'ici, démontrer la présence d'hormones juvéniles endogènes chez les tiques. Pour expliquer nos résultats, nous pouvons envisager essentiellement deux hypothèses. Tout d'abord, il est possible que l'injection d'hormones juvéniles stimule la vitellogénèse et la ponte de façon non-spécifique chez O. moubata. L'action antigonadotrope des "Precocene", qui apparaît comme non-spécifique également, et spontanément réversible, viendrait renforcer cette hypothèse. Mais dans ce cas, il est difficile d'expliquer les différences d'activité enregistrées entre un mélange d'isomères et les hormones naturelles des insectes. Il est par conséquent plus probable qu'il existe des substances endogènes, de nature semblable aux hormones juvéniles, chez O. moubata. Ces produits, pour autant qu'ils existent, doivent posséder une structure relativement différente de celle des hormones d'insectes. Cette hypothèse permet d'expliquer pourquoi un mélange d'isomères stimule la vitellogénèse de façon nettement plus forte que les hormones naturelles des insectes. Les pontes tardives proviennent peut-être de la lente diffusion du produit hors de la goutte d'huile ou encore d'une activité biologique réduite, due à la non-identité des composés endogènes et exogènes.

4.6. VITELLOGENINES ET VITELLINES

Par disc-électrophorèse, nous avons recensé huit bandes protéiques différentes dans l'hémolymphe et sept dans les broyats d'oeufs de O. moubata. Nous n'avons pas tenu compte d'autres bandes, moins fortement colorées, en raison justement de leur rôle quantitatif peu important lors de la vitellogénèse. La comparaison avec les résultats de DIEHL (1970), portant sur la même souche d'O. moubata et sur des dosages identiques à ceux

que nous avons utilisés, permet quelques remarques. Précisons toutefois que les échantillons de DIEHL, ayant migré sur un front moins large (gel en cylindres), sont en fait plus concentrés que les nôtres. Par conséquent, un certain nombre de bandes très fines, parce que peu concentrées, n'apparaissent pas dans nos résultats.

HL₁ et HL₂ semblent correspondre à H₆, les réactions spécifiques étant identiques. La concentration faible de notre gel (4,5 %) pourrait expliquer la résolution en deux bandes, de ce qui, chez DIEHL, n'en formait qu'une seule, mais relativement épaisse.

HL₃, également une HGLP, concorde parfaitement avec H₇, vu sa forte concentration et le fait qu'elle se trouve en plus grande quantité chez une femelle ayant copulé que chez son homologue vierge, cela huit jours après le repas sanguin. HL₄ correspond très probablement à H₈. Sa concentration augmente dans l'hémolymphe des tiques nourries, vierges ou non, quel que soit leur sexe. Il s'agit d'une GLP. Cette protéine ne peut être appelée vitellogénine sensus stricto, même si elle intervient peut-être dans la croissance de l'ovocyte, car elle n'est pas spécifique au sexe (voir critères de définition des vitellogénines et vitellines chez HAGEDORN & KUNKEL, 1979). DIEHL pense qu'il s'agit d'une "protéine alimentaire" en rapport avec la nutrition des tissus.

HL₇ et HL₈ montrent une coloration brune, visible à l'oeil nu, comme H₁₄ et H₁₅ chez DIEHL; toutefois, HL₇ et HL₈ se révèlent être des HLP, alors que H₁₄ et H₁₅ sont des GLP. Nous ne pouvons donc assimiler ces quatre bandes deux à deux. La concentration de HL₇ et HL₈ est plus forte chez les mâles et les femelles vierges à jeun que chez les femelles nourries (fig. 15 d). Il est par conséquent possible que ces protéines soient d'éventuels précurseurs de vitellogénines. Pour résoudre la question, il serait nécessaire de recourir à des méthodes impliquant des traceurs radio-actifs.

Dans l'électrophorèse d'extraits d'oeufs, O₃ a toujours l'aspect d'une large tache, paraissant constituée de trois bandes. Après purification, la résolution n'est pas meilleure;

il se produit donc vraisemblablement une dégradation de O_3 en cours d'électrophorèse. Il faut lyophiliser O_3 purifié (OP_2) pour que les trois bandes se séparent de façon nette (fig. 21). La bande principale migre à la même distance que HL_2 ; la bande ayant le plus grand Rf se déplace comme HL_3 , O_3 n'est donc pas directement comparable à E_6 et E_7 de DIEHL. Toutefois, ces trois bandes sont constituées d'HGLP et migrent dans des zones correspondantes. Les purifications entreprises sur O_3 , HL_3 et HL_4 montrent qu'il existe une parenté évidente entre HL_3 et O_3 . Leurs spectres sont identiques entre eux ¹⁾ et correspondent au spectre des lipovitellines de l'oeuf chez Dermacentor andersoni (BOCTOR & KAMEL, 1976); HL_4 , par contre, ne montre aucune absorbance dans la lumière visible. HL_3 et O_3 portent donc un pigment dérivé directement de l'hémoglobine de l'hôte. Ce pigment est transporté dans l'hémolymphe sur HL_3 principalement et se retrouve dans l'oeuf sur O_3 . Tous les tests immunologiques montrent une parenté entre O_3 et HL_3 , mais leurs poids moléculaires sont différents ($2,0 \cdot 10^6$ pour OP_2 ; $2,7 \cdot 10^6$ pour HL_3 et $0,7 \cdot 10^6$ pour HL_4 ²⁾). L'électrophorèse en SDS confirme que O_3 et HL_3 ne sont pas identiques entre elles; HL_4 est également différente de ces deux substances.

Cette électrophorèse (tableau 32) ne permet pas d'affirmer que les sous-unités situées à des niveaux semblables sont identiques entre elles, mais nous pouvons néanmoins en faire l'hypothèse. Celle-ci conduit à plusieurs constatations. Tout d'abord, la sous-unité a n'existe que chez HL_3 ; ensuite, les sous-unités b et c se trouvent dans O_3 et HL_3 ; d est présent dans les trois substances, alors que e est inclus dans HL_4 et O_3 ; enfin, f et g sont propres à O_3 (à moins qu'il ne s'agisse d'impuretés). Nous avons donc établi que l'incorporation des vitellogénines

1) Les deux spectres possèdent un pic dans l'UV (278 nm), un autre dans le domaine visible (398nm). Le rapport A_{398}/A_{278} est proche de 0,41, pour les deux substances.

2) Soulignons que ces poids moléculaires très élevés indiquent peut-être des artefacts dus aux conditions d'extraction de ces produits. Il est possible en effet que nous soyons en présence de dimères, trimères ou même tétramères de la protéine native.

de l'hémolymphe dans le vitellus de l'oeuf s'accompagne de transformations structurales. Lors du passage $HL_3 \longrightarrow O_3$, la bande a disparaît et les sous-unités e, f g apparaissent. Si e de O_3 provenait bien de e de HL_4 , on pourrait alors considérer cette dernière protéine comme une vitellogénine, mais avec les réserves énoncées plus haut. A première vue, il est difficile de trouver une explication à la provenance de f et g, ces sous-unités étant peut-être synthétisées par l'oeuf lui-même ou pouvant dériver de la fragmentation d'une autre bande (a, par exemple). On peut penser plus simplement qu'une autre vitellogénine les fournit, comme par exemple HL_1 et HL_2 , que nous n'avons pu obtenir purifiées du fait de leur relativement faible concentration dans l'hémolymphe.

La structure de HL_3 se modifie donc notablement lors de son incorporation dans l'oeuf. Les modifications concernent l'assemblage des sous-unités et des pertes ou des scissions de fragments protéiques. Chez les insectes, par contre, les vitellogénines subissent des changements relativement mineurs lors de leur incorporation dans le vitellus de l'oeuf. La teneur en lipides peut varier (Philosamia cynthia : CHINO & al, 1976; Locusta migratoria : CHINZEI & al, 1981), ou les sous-unités se regrouper (trimérisation chez Leucophaea maderae : DEJMAL & BROOKES, 1972). Toutefois, aucune espèce d'insecte étudiée jusqu'à présent ne montre des modifications entre vitellogénines et vitellines aussi profondes que celles enregistrées chez O. moubata.

Pour les autres tiques, les auteurs n'ont pas analysé les transformations subies par les vitellogénines au cours de leur incorporation dans l'ovocyte. Dans un travail ultérieur, il serait intéressant de purifier HL_1 et HL_2 . Ces deux HGLP semblent être des vitellogénines (elles ne sont présentes que chez des femelles nourries) et pourraient représenter des stades intermédiaires de la transformation supposée $HL_3 \longrightarrow O_3$. Leur électrophorèse en SDS nous fournirait probablement des données intéressantes.

La situation de HL_4 est un peu particulière. Cette protéine est de petite taille, comparée à HL_3 et O_3 (P.M. : $0,7 \cdot 10^6$).

Elle n'absorbe pas la lumière visible, donc ne porte pas de pigment du type "hème". Aucune parenté immunologique ne la lie à O_3 . Par contre, ses deux sous-unités principales HL_{4d} et HL_{4e} migrent respectivement à la même hauteur que O_{3d} et O_{3e} . Nous ne pouvons évidemment pas conclure à une identité $HL_{4d} - O_{3d}$ et $HL_{4e} - O_{3e}$, d'autant plus qu'il faudrait alors expliquer pourquoi le sérum anti- O_3 reste inactif vis-à-vis de HL_4 . Des difficultés techniques liées à un manque de temps nous ont empêchés de colorer spécifiquement l'électrophorogramme SDS des trois protéines purifiées. Il aurait été intéressant de savoir, par exemple, quelles sous-unités véhiculent le groupement hème ou portent des sucres. De telles analyses pourraient se révéler utiles par la suite, afin de clarifier la situation. En reprenant les quatre critères de HAGEDORN & KUNKEL (1979)¹⁾, nous pouvons admettre la dénomination de vitellogénine et vitelline, pour HL_3 et O_3 respectivement, puisque toutes les conditions sont remplies. Signalons à propos du deuxième critère que l'origine extraovarienne du vitellus chez O. moubata a été montrée par la microscopie électronique (AESCHLIMANN & HECKER, 1967, 1969; JENNI, 1971).

En ce qui concerne HL_4 , même s'il était prouvé que cette substance participe à l'élaboration du vitellus (ce qui est loin d'être le cas), on ne pourrait la nommer vitellogénine, car elle ne vérifie pas le troisième critère. En effet, sa présence en grande quantité dans l'hémolymphe dépend de l'état

1) D'après HAGEDORN & KUNKEL (1979), on peut admettre quatre critères qui permettent de définir les vitellogénines et les vitellines chez les insectes :

- 1°) Elles forment habituellement 60-90% des protéines solubles de l'œuf.
- 2°) Elles ne sont pas synthétisées par l'ovocyte, mais par le corps gras.
- 3°) On ne les trouve en grandes quantités que chez les femelles et à certaines périodes seulement, d'où le terme couramment utilisé de "female specific proteins", ou encore plus simplement de "female proteins".
- 4°) Elles sont absorbées sélectivement par l'ovocyte durant la vitellogénèse et concentrées jusqu'à 100 fois à l'intérieur de celui-ci.

physiologique de l'animal (à jeun ou nourri), et non de son sexe (cf. fig. 15). Cela confirme l'hypothèse de DIEHL (1970) la classant comme "protéine alimentaire", avec la possibilité éventuelle de contribuer au stockage de vitellus.

BOCTOR & KAMEL (1976) ont isolé deux lipovitellines antigéniquement semblables, à partir des oeufs de D. andersoni. Ces protéines, possédant un poids moléculaire de $4,7 \cdot 10^6$ et $8,7 \cdot 10^6$, ont tendance à se fragmenter lors du stockage ou de la lyophilisation des solutions. Des phénomènes identiques se sont produits avec O_3 lors de notre travail.

Ces auteurs décrivent des spectres d'absorption pratiquement semblables aux nôtres. Ce fait indique que les pigments inclus dans HL_3 et O_3 pourraient être des protoporphyrines, ainsi que cela a été suggéré chez D. andersoni. WIGGLESWORTH (1943) montre d'ailleurs que les pigments découverts dans l'oeuf d'O. moubata se trouvent sous forme d'hématine alcaline. Malheureusement, la comparaison entre D. andersoni et O. moubata ne peut se faire au niveau des vitellogénines, BOCTOR & KAMEL n'en ayant pas isolé. Les vitellines de Dermacentor possèdent donc un certain nombre de points communs avec O_3 , à savoir : un poids moléculaire élevé (supérieur à 10^6), une nature similaire (HGLP) et un spectre d'absorption dénonçant la présence de groupes prosthétiques dérivant directement de l'hème prélevé dans le sang de l'hôte. Plusieurs travaux montrent par ailleurs que de tels groupes prosthétiques sont également liés à des vitellogénines et vitellines chez d'autres espèces de tiques (Ixodes ricinus : WIGGLESWORTH, 1943; Boophilus microplus : BREMNER, 1959; TATCHELL, 1971).

Au vu des différents résultats énoncés dans ce travail, nous pouvons tenter d'esquisser un schéma global, représenté dans la figure 30, et traduisant les conséquences du repas sanguin et de la copulation sur la femelle d'O. moubata. Les voies empruntées par les différents stimuli sont encore parfois hypothétiques et nécessiteront des travaux ultérieurs pour être clairement comprises.

- 1) Chez O. moubata, la femelle peut se nourrir indépendamment de la copulation, mais elle en dépend cependant pour la ponte. La copulation permet non seulement la fécondation des ovocytes, mais aussi le déroulement complet de la vitellogénèse par deux voies distinctes, l'une mécanique et l'autre chimique. L'avantage d'un tel système se résume à une économie de matière nutritive. Seule la perspective d'une ponte viable permet le développement complet des ovocytes. Cette économie est d'autant plus intéressante pour l'espèce que la tique n'est jamais assurée de pouvoir se nourrir à intervalles réguliers.
- 2) Une stimulation chimique de la ponte n'est pas un phénomène rare chez les Arthropodes, nous l'avons souligné. Néanmoins, le système mis en évidence chez O. moubata fait preuve d'originalité sur deux points, tout au moins. Il s'agit d'abord du lieu de synthèse de la substance active, situé vraisemblablement au niveau du spermiophore lui-même, et de la très grande taille apparente de la molécule. L'effet mécanique exercé sur le système génital par la présence de spermatophores accorde en somme une double assurance, permettant un bon déroulement de la vitellogénèse lorsque la femelle a copulé.

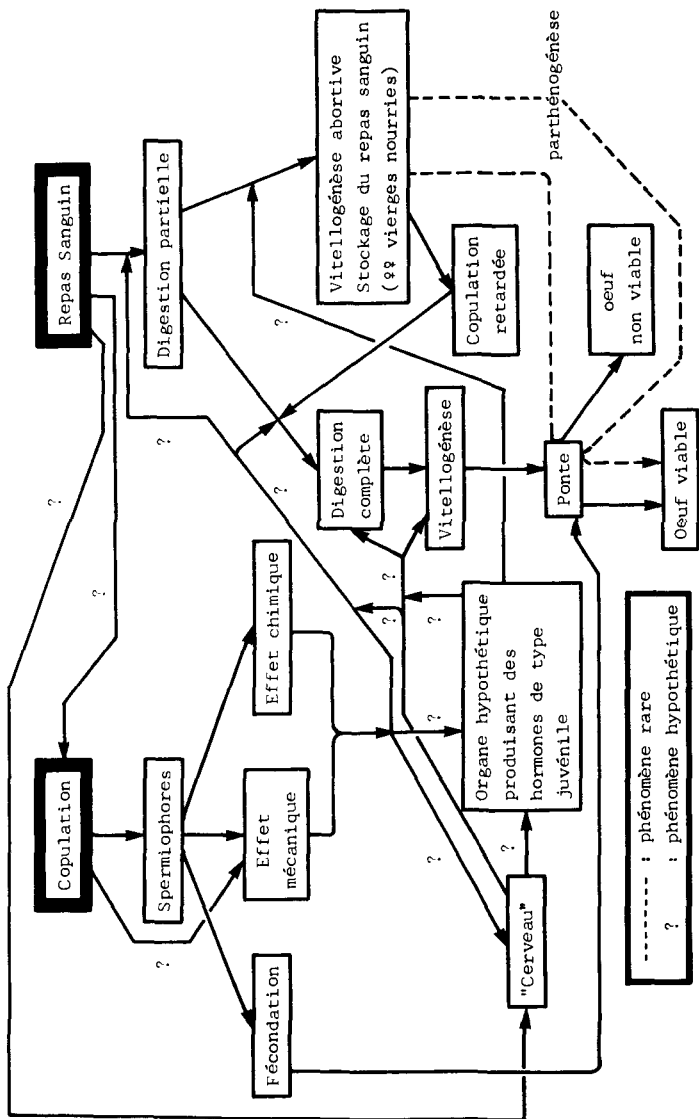


FIGURE 30 Schéma synthétique des relations existant entre le repas sanguin et la copulation chez *O. moubata* femelle.

- 3) Nous n'avons pu établir de façon claire le rôle du "cerveau" comme organe-relais. La vitellogénèse est faiblement stimulée par l'implantation de cet organe, mais cette stimulation pourrait être non-spécifique.
- 4) Les traitements effectués à l'aide d'hormones juvéniles proches de celles des insectes induisent la vitellogénèse et la ponte. Nous pouvons, de ce fait, supposer comme hypothèse de travail, qu'il existe un organe produisant des substances voisines des hormones juvéniles chez O. moubata. De telles substances influenceraient la vitellogénèse de la femelle de façon peut-être comparable à ce qui a été montré chez les insectes.
- 5) Des vitellogénines apparaissent dans l'hémolymphe de la femelle après le repas sanguin et la copulation. Ces protéines sont probablement synthétisées par des cellules du corps gras (DIEHL & al, 1982). Nous avons montré qu'une vitellogénine tout au moins subit des modifications structurales relativement importantes lors de son incorporation dans l'ovocyte. Ces transformations portent sur le nombre de sous-unités et non seulement sur une variation de la composition en lipides, comme cela a été décrit chez certains insectes (CHINO & al, 1976; CHINZEI & al, 1981). Le futur oeuf n'étant pas entouré de cellules folliculaires chez les tiques, nous pouvons supposer que les transformations chimiques des vitellogénines s'opèrent dans l'ovocyte lui-même.
- 6) Des différences physiologiques et morphologiques séparent les Chélicérates des Insectes. L'anatomie d'un grand nombre d'espèces est connue depuis longtemps, mais leur physiologie est encore souvent perçue de façon fragmentaire. L'étude comparative des systèmes endocriniens régissant la vie des Arthropodes permettra, dans l'avenir, de mieux saisir les liens unissant les différents groupes entre eux. Notre travail s'est inscrit dans une telle perspective.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma vive gratitude au professeur A. Aeschlimann, Directeur de l'Institut de Zoologie de l'Université de Neuchâtel, qui m'a proposé le sujet de ce travail et fait bénéficier de son expérience et de ses connaissances étendues en acarologie; en tant que directeur de thèse, il a corrigé mon manuscrit avec patience et compétence.

Ma sincère reconnaissance va également au professeur P.A. Diehl, qui a mis à ma disposition son savoir et ses qualités de chercheur en me conseillant tout au long de ma recherche. Je lui sais gré d'avoir consenti à évaluer mon travail en tant que membre de mon jury de thèse.

Mes remerciements s'adressent de même au Dr. J.L. Connat, qui a relu et corrigé mon manuscrit en ne ménageant ni son temps, ni sa peine; il a bien voulu faire partie du jury de thèse.

Le professeur H. Huggel, de Genève, a accepté de mettre ses compétences à disposition pour juger de cette recherche. Je lui en suis sincèrement reconnaissant.

Le Dr. M. Brossard m'a aidé à mener à bien la réalisation des tests immunologiques, ce dont je le remercie.

Mme V. Fivaz, laborantine, a fait prospérer notre élevage durant plusieurs années, permettant ainsi l'exécution pratique de ce travail; je l'en remercie également.

Mes remerciements s'adressent de même à tous mes collègues de l'Institut de Zoologie et à toutes les personnes qui m'ont aidé, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Cette étude a pu être entreprise grâce à l'appui financier du Fonds national suisse de la Recherche scientifique, que je remercie ici de sa générosité.

Pour terminer, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à ma femme, qui s'est chargée avec soin et efficacité du travail de dactylographie et n'a pas craint d'investir son temps afin de permettre la mise au propre de ce manuscrit.

B I B L I O G R A P H I E

- AESCHLIMANN, A. (1958) Développement embryonnaire d'Ornithodoros moubata MURRAY et transmission transovarienne de Borrelia duttoni. Acta Tropica 15, 15-64.
- AESCHLIMANN, A. (1968) La ponte chez Ornithodoros moubata MURRAY. Revue suisse de Zool. 75, 1033-1039.
- AESCHLIMANN, A. (1976) Les tiques, leur biologie et les maladies qu'elles transmettent. Annales 1975-1976, Université de Neuchâtel; Neuchâtel, Suisse, 27 pp.
- AESCHLIMANN, A., HECKER, H. (1967) Observations préliminaires sur l'ultrastructure de l'ovocyte en développement chez Ornithodoros moubata MURRAY. Acta Trop. 24, 225-243.
- AESCHLIMANN, A., HECKER, H. (1969) Vitellogénèse et formation cuticulaire chez l'oeuf d'Ornithodoros moubata MURRAY. (Ixodoidea: Argasidae). Etude au microscope électronique. Acarologia 11, 180-192.
- AESCHLIMANN, A., GRANDJEAN, O. (1973 a) Influence of natural and "artificial" mating on feeding, digestion, vitellogenesis and egg-laying in ticks (Ixodoidea). Folia Parasitologica (Praga) 20, 67-74.
- AESCHLIMANN, A., GRANDJEAN, O. (1973 b) Observations on fecundity in Ornithodoros moubata, MURRAY (Ixodoidea : Argasidae). Relationships between mating and oviposition. Acarologia 15, 206-217.
- ANDREWS, P. (1964) Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex Gel-Filtration. Biochem. J. 91, 222-223.
- ANDREWS, P. (1965) The Gel-Filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem. J. 96, 595-606.

- ARTHUR, D.R. (1962) Ticks and Disease. International Series on Pure and Applied Biology, Zoology Division, vol. 9, 445 pp. Oxford: Pergamon Press.
- BALASHOV, Yu., S. (1972) A translation of bloodsucking ticks (Ixodoidea). - Vectors of diseases of man and animals. Misc. Publ., Ent. Soc. Amer. 8, 161-376.
- BASSAL, T.T.M., ROSHDY, M.A. (1974) Argas arboreus : Juvenile hormone analog termination of diapause and oviposition control. Exp. Parasitol. 36, 1, 34-39
- BAUMANN, H. (1974) Die Paragoniensubstanzen von Drosophila funebris: Isolation, Struktur, Biosynthese und Wirkung. Thèse, Univ. Zürich. 69 pp.
- BERGOT, B.J., JAMIESON, G.C., RATCLIFF, M.A., SCHOOLEY, D.A. (1980) JH Zero: New naturally occurring insect juvenile hormone from developing embryos of the tobacco hornworm. Science 210, 336-338.
- BINNINGTON, K.C. (1981) Ultrastructural evidence for the endocrine nature of the lateral organs of the cattle tick Boophilus microplus. Tissue and cell. 13, 475-491.
- BINNINGTON, K.C., OBENCHAIN, F.D. (1982) Structure and function of the circulatory, nervous and neuroendocrine systems of ticks. In "Physiology of ticks". Editors: F.D. OBENCHAIN & R. GALUN, Pergamon Press. 351-398.
- BOCTOR, F.N., KAMEL, M.Y. (1976) Purification and characterization of two lipovitellins from eggs of the tick, Dermacentor andersoni. Insect Biochem. 6 (3), 233-240.

- BOULETREAU-MERLE, J. (1975) Influence de l'accouplement sur la physiologie reproductrice des femelles de Drosophila melanogaster (Meig.). Thèse, Univ. Claude Bernard, Lyon. 320 pp.
- BOWERS, W.S., OHTA, T., CLEERE, J.S., MARSELLA, P.A. (1976) Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. Science, Wash. 193, 542-547.
- BREMNER, K.C. (1959) Studies on "haemixodovin", the pigment in the eggs of the cattle tick Boophilus microplus (Acarina: Ixodidae). Aust. J. Biol. Sci. 12, 263-273.
- BROOKS, G.T., PRATT, G.E., JENNINGS, R.C. (1979) The action of precocenes in milkweed bugs (Oncopeltus fasciatus) and locusts (Locusta migratoria). Nature 281, 570-572.
- BURCKHARDT, J.S. (1975) Isolation und Charakterisierung von zwei Substanzen aus den männlichen Anhangsdrüsen von Drosophila melanogaster und ihre Wirkung auf virginelle Weibchen. Inaugural Dissertation. Zürich, Univ., Phil. Fak. II, Diss. von 1975.
- BURGDORFER, W. (1951) Analyse des Infektionsverlaufes bei Ornithodoros moubata MURRAY und der natürlichen Uebertragung von Sp. duttoni. Acta trop. 8, 193-262.
- BURGDORFER, W., BARBOUR, A.G., HAYES, S.F., PETER, O, AESCHLIMANN, A. (1983) Erythema chronicum migrans-a tickborne spirochetosis. Acta Tropica 40, 79-83.
- CHINO, H., YAMAGATA, M., TAKAHASHI, K. (1976) Isolation and characterization of insect vitellogenin. It's identity with hemolymph lipoprotein II. Biochim. Biophys. Acta 441, 349-353.

- CHINZEI, Y., CHINO, H., WYATT, G.R. (1981) Purification and properties of vitellogenin and vitellin from Locusta migratoria. Insect Biochem. 11, 1-8.
- CLARKE, J.T. (1964) Simplified "disc" (polyacrylamide gel) electrophoresis. Annals New-York Academy of Sciences 428-436.
- DAVEY, K.G., (1965) Copulation and egg-production in Rhodnius prolixus: the role of the spermathecae. J. Exp. Biol. 42, 373-378.
- DAVEY, K.G. (1967) Some consequences of copulation in Rhodnius prolixus. J. Insect Physiol. 13, 1629-1636.
- DAVEY, K.G. (1974) Symposium on reproduction of arthropods of medical and veterinary importance. VI. Reproduction in the female of some haematophagous insects. J. Med. Ent. 11, 40-45.
- DEJMAL, R.K., BROOKES, V.J. (1972) Insect lipovitellin, Chemical and physical characteristics of a yolk protein from the ovaries of an insect, Leucophaea maderae. J. Biol. Chem. 247, 869-874.
- DHANDA, V. (1967) Changes in neurosecretory activity at different stages in the adult Hyalomma dromedarii Koch, 1884. Nature (London) 214, 508-509.
- DIEHL, P.A. (1970) Zur Oogenese bei O. moubata MURRAY unter besonderer Berücksichtigung der Vitellogenese. Acta Trop. 27, 301-355.
- DIEHL, P.A., AESCHLIMANN, A., OBENCHAIN, F.D. (1982) Tick reproduction: oogenesis and oviposition. In "Physiology of ticks". Editors: F.D. Obenchain & R. Galun, Pergamon Press, 277-350.

- DOANE, W.W. (1973) Role of hormones in insect development.
In : Developmental Systems: Insects (Ed. by Counce S.J. & Waddington C.H.) 2, 291-497 Academic Press, London.
- EICHENBERGER, G. (1970) Das Zentralnervensystem von O. moubata MURRAY und seine postembryonale Entwicklung. Acta Trop. 27, 15-53.
- EISEN, Y., WARBURG, M.R., GALUN, R. (1973) Neurosecretory activity as related to feeding and oogenesis in the fowl-tick Argas persicus (Oken). Gen. Comp. Endocrinol. 21, 331-340.
- ENGELMANN, F. (1959) The control of reproduction in Diptoptera punctata. Biol. Bull. 116, 406-419.
- ENGELMANN, F. (1960). Mechanisms controlling reproduction in two viviparous cockroaches (Blattaria). Ann. N.Y. Acad. Sci. 89, 516-536.
- ENGELMANN, F. (1970) The physiology of insect reproduction. Pergamon Press, Oxford.
- FALLON, A.M., HAGEDORN, H.H., WYATT, G.R., LAUFER, H. (1974) Activation of vitellogenin synthesis in the mosquito Aedes aegypti by ecdysone. J. Insect Physiol. 20, 1815-1923.
- FUCHS, M.S., HISS, E.A. (1970) The partial purification and separation of the protein components of matrone from Aedes aegypti. J. Insect. Physiol. 16, 931-939.
- GABBAY, S., WARBURG, M.R. (1976) Neurosecretory activity as related to feeding, mating and oögenesis in the female cave tick, Ornithodoros tholozani. J. Insect Physiol. 22 (9), 1291-1301.

- GABE, M. (1955) Données histologiques sur la neurosécrétion chez les Arachnides. Arch. Anat. micr. morph. 44, 351-383.
- GALUN, R.L., WARBURG, M. (1967) Studies on the reproductive physiology of the tick Ornithodoros tholozani (Laboulbène & Mégnin): The effect of mating on oogenesis. Acta Soc. Zool. bohemoslov. 31, 329-334.
- GEIGY, R., MOOSER, H. (1955) Untersuchungen zur Epidemiologie des afrikanischen Rückfallfiebers in Tanganyika. Acta trop. 12, 327-345.
- GEIGY, R., HERBIG, A. (1955) Erreger und Ueberträger tropischer Krankheiten. Acta trop. Suppl. 6.
- GERMOND, J.E., AESCHLIMANN, A. (1977) Influence of Copulation on Vitellogenesis and Egg-laying in Ornithodoros moubata MURRAY (Ixodoidea: Argasidae). Advances in Invertebrate Reproduction 1, (29), 308-318.
- GIRARDIE, A. (1966) Contrôle de l'activité génitale chez Locusta migratoria. Mise en évidence d'un facteur gonadotrope et d'un facteur allatotrope dans la pars intercerebralis. Bull. Soc. Zool. Fr. 91, 423-439.
- GRAF, J.F. (1978) Copulation, nutrition et ponte chez Ixodes ricinus L. (Ixodoidea : Ixodidae) - 3e partie. Bull. Soc. Entomol. Suisse 51, 343-360.
- HAGEDORN, H.H., FALLON, A.M. (1973) Ovarian control of vitellogenin synthesis by the fat body in Aedes aegypti. Nature 244, 103-105.
- HAGEDORN, H.H., KUNKEL, J.G. (1979) Vitellogenin and vitellin in insects. Ann. Rev. Entomol. 24, 475-505.

- HIGHNAM, K.C. (1965) Some aspects of neurosecretion in arthropods. Zool. Jb. (Physiol.) 71, 558-582.
- HIGHNAM, K.C., HILL, L. (1977) The comparative endocrinology of the Invertebrates. Ed. by E. Arnold Ltd, London. 356 pp.
- HINTON, H.E. (1974) Symposium on reproduction of arthropods of medical and veterinary importance. III. Accessory functions of seminal fluid. J. Med. Ent. 11, 19-25.
- HOOGSTRAAL, H. (1978) Biology of ticks. In: Tick borne diseases and their vectors, edited by Wilde J.K.H. Proc. Internat. Conf. (Edinburgh, September-October 1976) pp. 3-14.
- HOOGSTRAAL, H., AESCHLIMANN, A. (1982) Tick-Host Specificity. Bull. Soc. Entomol. Suisse 55, 5-32.
- HUIGNARD, J., QUESNEAU-Thierry, A., BARBIER, M. (1977) Isolement, action biologique et évolution des substances paragoniales contenues dans le spermatophore d'Acanthoscelides obtectus (coléoptère). J. Insect Physiol. 23 (3), 351-357.
- JENNI, Leo (1971) Synthese und Aufnahme von Proteinen während der Vitellogenese in Ovocyten von Ornithodoros moubata MURRAY (Ixodoidea: Argasidae). Acta Tropica 28, 105-163.
- KARLSON P., LUSCHER M. (1959) Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. Nature, Lond. 183, 55-56
- KHALIL, G.M., SHANBAKY, N.M. (1975) The subgenus Persicargas (Ixodoidea: Argasidae: Argas). 21. The effect of some factors in the process of mating on egg development and oviposition in Argas (P.) arboreus. J. med. Ent. 12, 47-51.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, (15), 680-685.

- LAMOTTE, M. (1971) Initiation aux méthodes statistiques en biologie. Ed. par Masson & Cie, Paris.
- LANDERS, M.H., HAPP, G.M. (1980) Precocene inhibition of vitellogenesis in Drosophila melanogaster. *Experientia* **36**, 619-620.
- LEA, A.O. (1972) Regulation of egg maturation in the mosquito by the neurosecretory system: the role of the corpus cardiacum. *Gen. comp. Endocr. Suppl.* **3**, 602-608.
- LEAHY, M.G., GALUN, R. (1972) Effect of mating on oogenesis and oviposition in the tick Argas persicus (Oken). *Parasitology* **65**, 167-178.
- LEAHY, M.G., BOOTH, K.S. (1980) Precocene induction of tick sterility and ecdysis failure. *J. Med. Entomol.* **17**, 18-21.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, B.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- MANSINGH, A., RAWLINS, S.C. (1977) Antigonadotropic action of insect hormone analogues on the cattle tick Boophilus microplus. *Naturwissenschaften* **64**, 41.
- MAURER, H.R. (1971) Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. W. de Gruyter, Berlin, 222 pp.
- OBENCHAIN, F.D., OLIVER, J.H., Jr. (1975) Neurosecretory System of the American Dog Tick, Dermacentor variabilis (Acari: Ixodidae). II. Distribution of secretory cell types, axonal pathways and putative neurohemal-neuroendocrine associations; comparative histological and anatomical implications. *J. of Morphology* **145**, (3), 269-293.

- OLIVER, J.H., Jr. (1974) Symposium on reproduction of arthropods of medical and veterinary importance. IV. Reproduction in ticks (Ixodoidea). J. Med. Ent. 11, 26-34.
- OLIVER, J.H., Jr., MURPHY, R.W., OBENCHAIN, F.D. (1975) Reproduction in ticks (Acari: Ixodoidea). 4. Effects of mechanical and chemical stimulation on oocyte development in Amblyomma americanum. J. of Parasitol. 61, 782-784.
- OUCHTERLONY, O. (1949) Antigen-antibody reactions in gels. Acta Path. Microbiol. 26, 507-515.
- PAPPAS, P.J., OLIVER, J.H., Jr. (1971) Mating necessary for complete feeding of female Dermacentor variabilis (Acari: Ixodidae). J. Ga. Ent. Soc. 6, 122-124.
- PAPPAS, P.J., OLIVER, J.H., Jr. (1972) Reproduction in ticks (Acari: Ixodoidea), 2. Analysis of the stimulus for rapid and complete feeding of female Dermacentor variabilis (Say). J. Med. Entomol. 9, 47-50.
- PENER, M.P., ORSHAN, L., De WILDE (1978) Precocene II causes atrophy of corpora allata in Locusta migratoria. Nature 272, 350-353.
- POUND, J.M., OLIVER, J.H., Jr. (1979) Juvenile Hormone: Evidence of its role in the reproduction of ticks. Science, 206, 355-357.
- PRATT, G.E., BOWERS, W.S. (1977) Precocene II inhibits juvenile hormone biosynthesis by cockroach corpora allata in vitro. Nature, London. 265, 548-550.
- PRATT, G.E., JENNINGS, R.C., HAMNETT, A.F., BROOKS, G.T. (1980) Lethal metabolism of precocene-I to a reactive epoxide by locust corpora allata. Nature 284, 320-323.

- ROELLER, H., DAHM, K.H., SWEELY, C.C., TROST, B.M. (1967) The structure of the juvenile hormone. *Angew. Chem.* 6, 179-180.
- ROSHDY, M.A., SHOUKREY, N.M., COONS, L.B. (1973) The subgenus Persicargas (Ixodoidea: Argasidae: Argas). 17. A neurohemal organ in A.(P.) arboreus Kaiser, Hoogstraal, and Kohls. *J. of Parasitol.* 59 (3), 540-544.
- ROTH, L.M., STAY, B. (1961) Oocyte development in Diploptera punctata (Eschscholtz) (Blattaria). *J. Insect. Physiol.* 7, 186-202.
- ROTHSCHILD, L. (1961) Structure and movements of ticks spermatozoa. *Quart. J. Micr. Sci.* 102, 239-248.
- SEDMAK, J.J., GROSSBERG, S.E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. *Analyt. Biochem.* 79, 544-552.
- SHANBAKY, N.M., KHALIL, G.M. (1975) The subgenus Persicargas (Ixodoidea: Argasidae: Argas). 22. The effect of feeding on hormonal control of egg development in Argas (Persicargas) arboreus. *Exp. Parasit.* 37, 361-366.
- SIEGEL, S. (1956) Non parametric statistics for the behavioral sciences. Internat. Student Edition/Mc-Graw-Hill, Kogakusla Ltd., Tokyo.
- SLAMA, K., ROMANUK, M., SORM, F. (1974) Insect hormones and bioanalogues. Springer-Verlag, Wien and New-York.
- SOLOMON, K.R., MANGO, C.K.A., OBENCHAIN, F.D. (1982) Endocrine mechanisms in ticks: effects of insect hormones and their mimics on development and reproduction. In "Physiology of ticks". Editors: F.D. Obenchain & R. Galun. Pergamon Press, 399-438.

- SPICKETT, A.M. (1978) Effects of ⁶⁰Co irradiation on Amblyomma hebraeum Koch, 1844 (Acarina: Ixodidae). Onderstepoort J. vet. Res. 45, 197-201.
- SPIEGEL, M.R. (1972) Statistique. Série Schaum, Ed. par Mc Graw-Hill, Paris.
- TATCHELL, R.J. (1971) Electrophoretic studies on the proteins of the hemolymph, saliva, and eggs of the cattle tick, Boophilus microplus. Insect Biochem. 1, 47-55.
- WIGGLESWORTH, V.B. (1943) The fate of haemoglobin in Rhodnius prolixus (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. Proc. R. Soc. Lond. (B) 131, 313-339.