

Observations préliminaires sur l'ultrastructure de l'ovocyte en développement chez *Ornithodoros moubata*, Murray

(Ixodoidea : Argasidae)

Par A. AESCHLIMANN * et H. HECKER **

Institut Tropical Suisse, Bâle

*A Monsieur le Prof. A. Portmann,
pour son septantième anniversaire,
en témoignage de gratitude et de respect*

Introduction

Ornithodoros moubata est peut-être l'Argaside le mieux connu. Toutefois, sa reproduction pose encore de nombreux problèmes. Leur résolution dépend en partie d'une connaissance intime de l'œuf et de son développement. Le présent travail résume brièvement les quelques connaissances récemment acquises sur l'ultrastructure de l'ovocyte en formation.

On sait que le développement des œufs de tiques dépend de la prise d'un repas de sang. La vitellogénèse s'effectue parallèlement aux premières étapes de la digestion. Aussi avons-nous examiné tout d'abord l'ovaire de femelles vierges et non nourries, puis les ovaires de femelles fécondées et nourries. Les ovaires ont été prélevés le premier, le cinquième, le sixième et le septième jour après la prise de sang.

Comme il s'agit ici d'un travail préliminaire, nous ne passerons pas en revue la littérature traitant du sujet. Soulignons cependant, qu'à notre connaissance, peu de travaux ont été entrepris sur l'ultrastructure d'œufs d'Arthropodes en développement. L'étude de ROTH & PORTER (1964), sur la vitellogénèse d'*Aedes aegypti*, nous a particulièrement intéressé puisqu'il s'agit d'un insecte hématophage, et nous avons souvent comparé nos microphotographies électroniques avec celles de ces auteurs. Nous avons également profité de la publication d'ANDERSON (1964) sur l'ovocyte de *Periplaneta americana*.

Matériel

Les *O. moubata* étudiés proviennent de la région de l'Ulanga, en Tanzanie. Ils sont élevés depuis plusieurs années à l'Institut Tropical Suisse, selon la méthode décrite par GEIGY & HERBIG (1955). Pour une bonne connaissance de

* Ce travail a été réalisé en partie grâce à l'appui financier de la Lalor Foundation, Wilmington, Delaware, U.S.A.

** Nous remercions Mlles Ch. Brack et M. J. Burekhardt pour leur aide technique.

La morphologie de l'ovaire, nous renvoyons le lecteur au travail de WAGNER-JEVSEENKO (1958). Rappelons cependant que les œufs en développement font saillie à la surface de l'ovaire et qu'ils ne sont rattachés au tissu sous-jacent que par un mince funicule composé de quelques cellules. Les œufs de tiques ne sont donc pas entourés de cellules folliculaires, comme c'est le cas chez les Insectes. Les œufs et le tissu ovarien sont enveloppés d'une couche de substance homogène, finement granuleuse, que nous avons appelée le manteau.

Méthode

La dissection (voir GEIGY & HERBIG, 1955) permet d'isoler sans difficulté l'ovaire de la tique.

Pour la microscopie électronique, nous avons employé les deux méthodes suivantes :

1° Il s'agit de disséquer les Ornithodores directement dans une solution froide (0-4° C) d'aldéhyde glutarique à 2,5 %, en tampon phosphate de pH 7,2. Cette première fixation est suivie d'une deuxième, l'organe étant traité au tétraoxyde d'osmium à 1 %, en tampon véronal de pH 7,2.

2° La tique est disséquée sous liquide physiologique froid (NaCl, 0-4° C), puis l'ovaire est fixé dans une solution à 1 % de tétraoxyde d'osmium, selon la méthode de KELLENBERGER, RYTER & SECHAUD (1958).

Ces deux méthodes de fixations permettent d'évaluer la réalité des structures.

La déshydratation fut effectuée dans de l'acétone et l'inclusion dans de l'Araldite. Les coupes furent contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb.

(Coupe à Ultratome LKB ; épaisseur : 400 à 800 Å. Observation au microscope électronique Zeiss EM 9.)

Résultats

Ovaire de femelles vierges et non nourries

Nous savons que les cellules du funicule assurent l'unique contact entre l'ovocyte et le tissu ovarien. Elles ont particulièrement retenu notre attention.

Cellules du funicule (Fig. 1)

Noyau. Les fixations employées laissent reconnaître un noyau à double membrane poreuse avec, accolée à la membrane interne, des agglomérats d'hétérochromatine. Un nucléole, de texture plutôt dense, est bien visible.

Cytoplasme. Il contient les organelles classiques, c'est-à-dire des mitochondries à cristae, un ergastoplasme comprenant, mais peu développés, des tubes avec ribosomes et des vacuoles sans ribosomes. Une zone de Golgi n'a pas encore été décelée. On rencontre assez fréquemment des microtubules.

Membrane cellulaire. Elle présente des plis qui deviennent de plus en plus accentués et nombreux du côté de l'ovocyte. Le

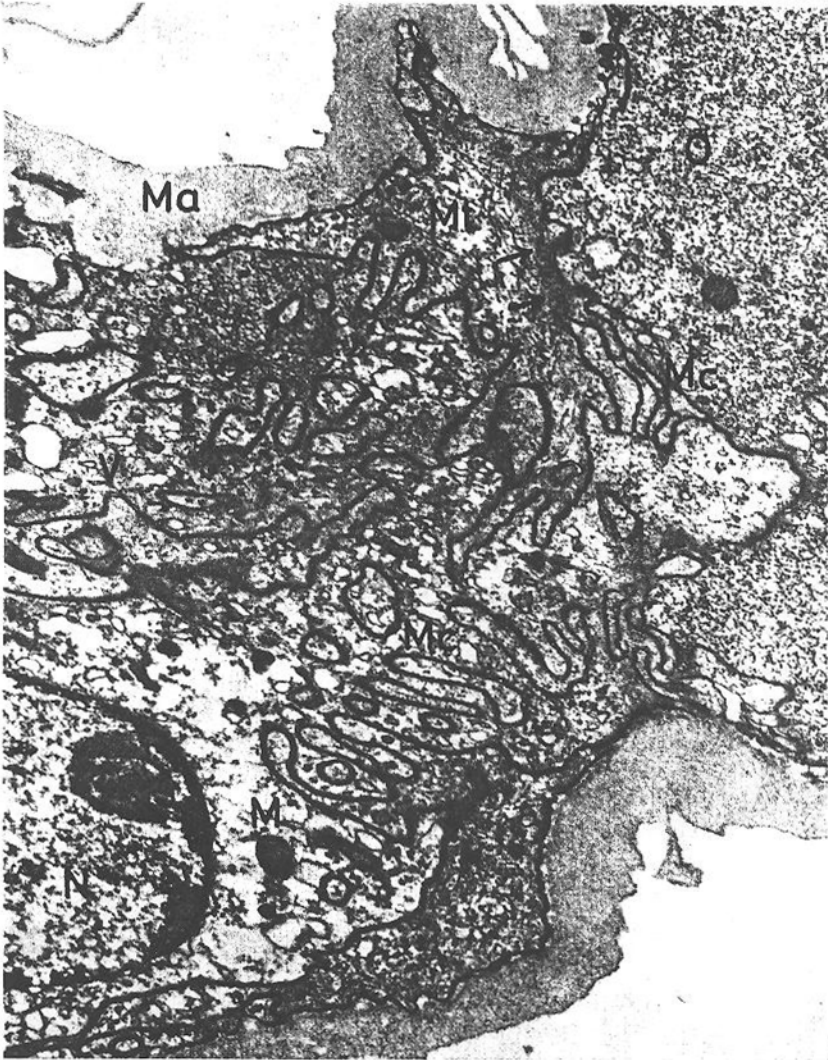


Fig. 1. Ovaire, 1 jour après la nutrition. Femelle fécondée. A gauche, cellules du funicule avec un noyau (N), des mitochondries (M), des vacuoles de l'ergastoplasme (V) et des microtubules (Mt). Les membranes cellulaires (Mc) forment de nombreux plis (augmentation de la surface). Les flèches (→) indiquent un endroit présumé de transport de substances entre une cellule du funicule et l'ovocyte (O). Un manteau (Ma), finement granulé, entoure l'ovocyte et le tissu ovarien. Agr. 15 000 ×.

contact avec l'ovocyte est intime, au contraire de ce qui a été observé chez *Aedes* (ROTH & PORTER, 1964). La membrane de l'ovocyte présente elle-même des replis qui s'imbriquent dans ceux des cellules du funicule. Il est à présumer que l'augmentation de la surface de ces membranes, de même que leur étroit contact, favorisent l'arrivée à l'œuf des matériaux de base nécessaires à la formation du vitellus.

Ovocyte

Noyau. Le jeune ovocyte possède un gros noyau sans hétérochromatine décelable, malgré la préfixation à l'aldéhyde glutarique. Dans le caryoplasme, nous avons toujours observé la présence d'un nucléole d'aspect réticulé (Fig. 2). Souvent, celui-ci est accompagné de corpuscules arrondis et finement granulés. D'après ANDERSON (1964), ces corpuscules pourraient être des projections du nucléole. La membrane nucléaire est richement pourvue de pores (Fig. 2). Sur une coupe tangentielle, la membrane nucléaire apparaît comme un tamis aux mailles rondes (Fig. 3). Les pores montrent en leur milieu un point sombre, opaque aux électrons, qui pourrait être le diaphragme réglant les échanges entre cytoplasme et caryoplasme (FAWCETT, 1966).

Cytoplasme (Fig. 4 et 5). On y trouve de nombreuses mitochondries, souvent réunies en une couche à la périphérie de l'ovocyte. Leur taille et leur forme sont variables. Elles peuvent être arrondies, mais aussi plus ou moins allongées ; certaines atteignent même parfois une longueur remarquable (Fig. 4). Localisés dans la matrice de la mitochondrie, entre les cristae mitochondriales, on observe souvent des grana mitochondriales (Fig. 4 et 5). L'ergastoplasme se compose de vésicules réparties irrégulièrement dans le cytoplasme. Celui-ci contient également de nombreux ribosomes librement dispersés. Plusieurs zones de Golgi, peu développées, ont été mises en évidence. Nous avons également retrouvé les structures décrites par ROSHDY (1961) chez *Argas persicus*, sous l'étiquette de « Rickettsia-like microorganisms » (Fig. 4).

Membrane de l'ovocyte. La membrane de l'ovocyte, recouverte par ce que nous avons appelé le manteau (identique à la Tunica propria de *Periplaneta americana*, ANDERSON, 1964), présente des particularités qu'il nous faut maintenant décrire.

Cette membrane — type « unit membrane » — peut produire, en s'invaginant comme le doigt d'un gant, des prolongements tubulaires qui, de la surface de l'ovocyte, s'enfoncent profondément à l'intérieur du cytoplasme (Fig. 6). Ces tubes présentent parfois des ramifications. Il arrive aussi que la membrane forme, à la péri-

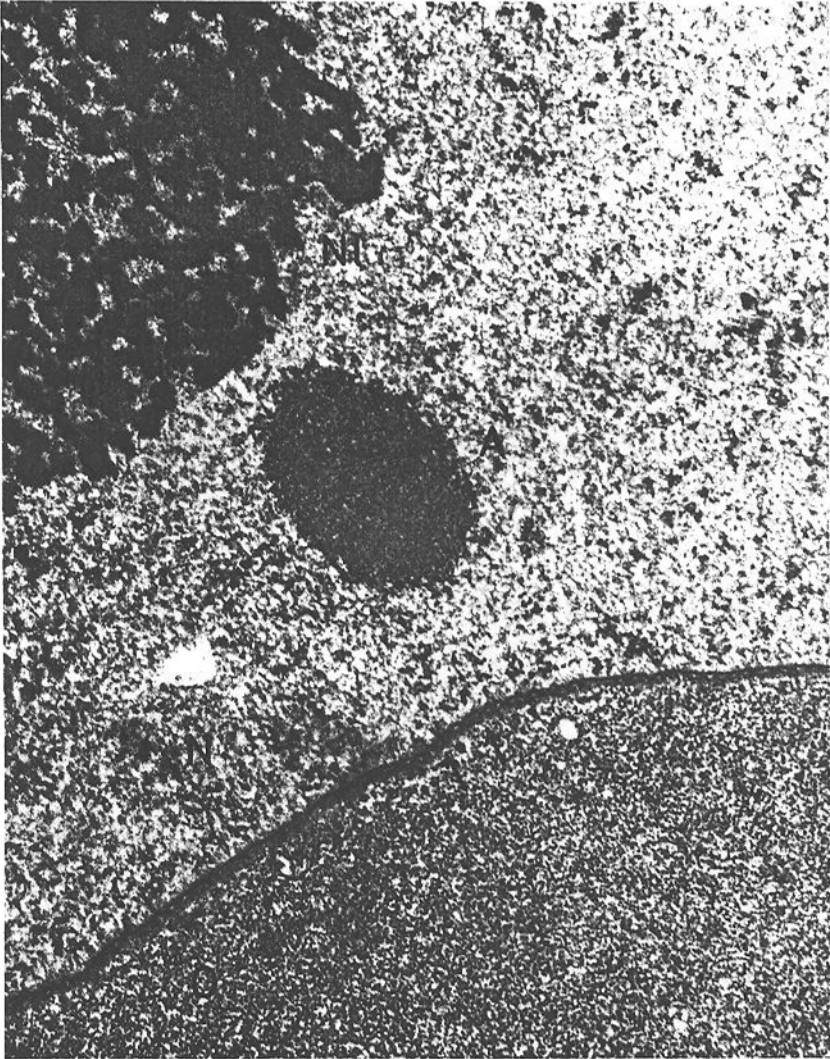


Fig. 2. Ovocyte. Femelle à jeun, vierge. Portion du noyau (N) avec nucléole reticulé (NL) et un corps secondaire (A). O : ovocyte (→) : pores dans la membrane du noyau. Agr. 18 000 X.

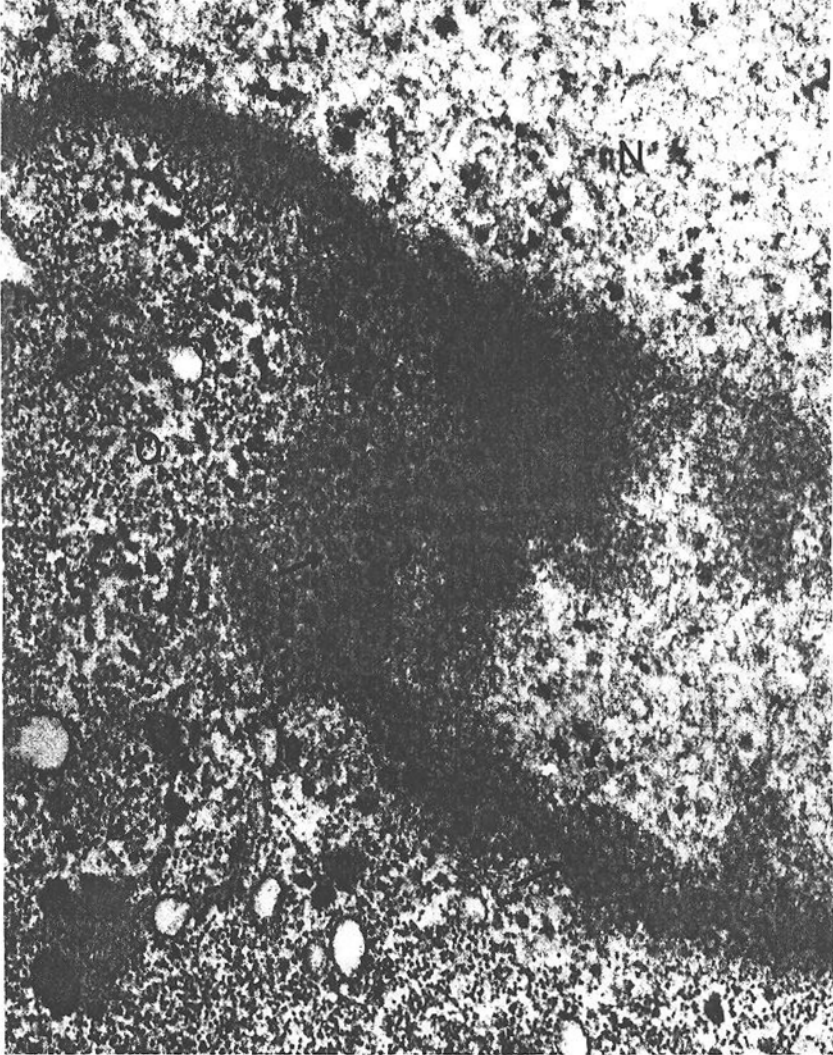


Fig. 3. Ovocyte. Femelle à jeun, vierge. Membrane nucléaire coupée tangentielle-
ment, montrant des pores coupés transversalement. Remarquez (→) le point
opaque aux électrons, à l'intérieur du pore. N : Noyau. O : cytoplasme de
l'ovocyte. Agr. 30 000 ×.

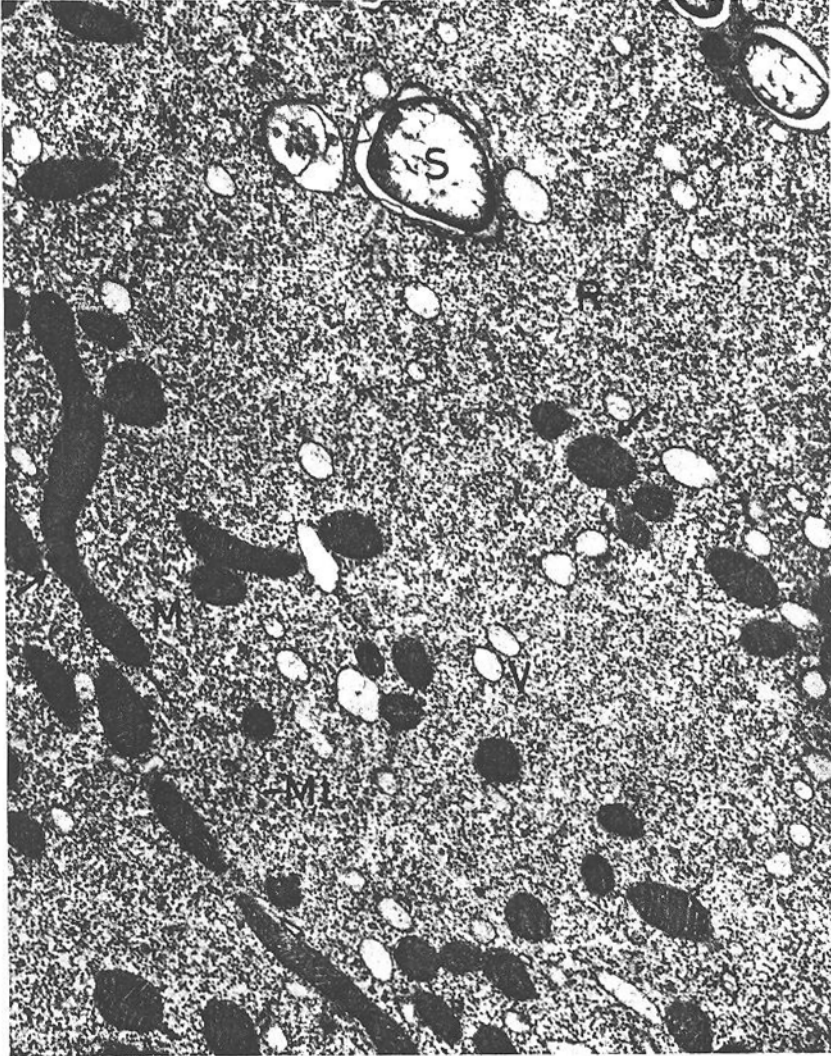


Fig. 4. Portion d'un ovocyte. Femelle à jeun, vierge. Mitochondries (M) longues ou arrondies, souvent avec des Grana mitochondriales (→). V : vacuoles de l'ergastoplasme. Mt : microtubules coupés longitudinalement. S : symbiote (« Rickettsia-like microorganism » de Roshdy). R : ribosomes donnant un aspect granuleux au cytoplasme. Agr. 18 000 ×.



Fig. 5. Détail des mitochondries. Femelle à jeun, vierge. La fixation au tétraoxyde d'osmium permet de voir nettement, entre les cristae, les grana mitochondriales (→). V : vacuoles de l'ergastoplasme. R : ribosomes. Agr. 54 000 ×.

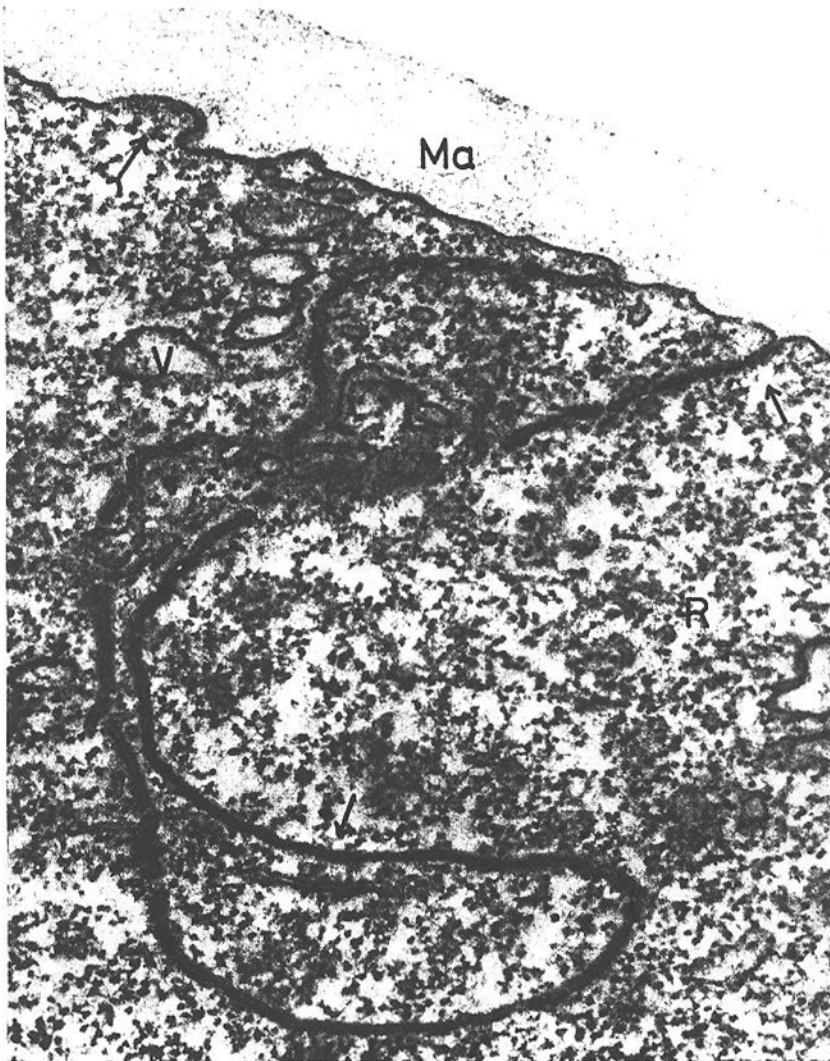


Fig. 6. Ovocyte. Femelle à jeun, vierge. La flèche (\rightarrow) dénonce l'invagination de la membrane cellulaire et montre également (\rightarrow) une projection de cette même membrane dans le manteau (Ma). V : vacuole de l'ergastoplasme. R : ribosomes. Agr. 54 000 \times .

phérie de l'ovocyte, des vacuoles de tailles diverses. D'autre part, elle envoie, du côté du manteau, des crêtes digitiformes de hauteur variable, coudées pour la plupart et orientées différemment (Fig. 6).

Après s'être gorgée de sang, la tique effectue sa vitellogénèse. Nous avons examiné les ovaires le premier, le cinquième, le sixième et le septième jour après la nutrition, afin de trouver des œufs, soit en plein développement, soit quasiment prêts à être pondus. L'ultrastructure des ovocytes, du cinquième au septième jours, montre alors des différences essentielles par rapport à l'ultrastructure des ovocytes de femelles à jeun ou du premier jour après la nutrition. Nous reprenons donc, dans le même ordre que précédemment, tout d'abord la description des cellules du funicule, puis ensuite celle de l'ovocyte en développement.

Ovaires de femelles fécondées et nourries

Cellules du funicule

Noyau. Pas de changement notable.

Cytoplasme. Les mitochondries et l'ergastoplasme sont à peu près semblables que chez la femelle à jeun. Il n'y a toujours pas d'appareil de Golgi visible. Les microtubules sont par contre plus nombreux, particulièrement en bordure de l'ovocyte (Fig. 7). Dans cette région, on observe également la présence de nombreuses vacuoles remplies d'une substance opaque aux électrons.

Membrane cellulaire. Les replis de la membrane cellulaire, au contact de l'ovocyte, sont nombreux, plus allongés, et s'imbriquent encore plus étroitement que chez l'ovaire de la femelle à jeun, avec les prolongements de la membrane de l'ovocyte (Fig. 7). La Fig. 8 laisse supposer que des vacuoles se détachent des microvilli des cellules funiculaires. Ces vacuoles sont chargées de substances, qu'elles transporteraient ainsi dans l'ovocyte. Nous aurions donc un phénomène de micropinocytose tel que l'ont décrit ANDERSON (1964) pour *Periplaneta americana* et ROTH & PORTER (1964) pour *Aedes aegypti*. Un transport de substances du funicule dans l'ovocyte semble débiter dès le premier jour après la nutrition (Fig. 1).

Ovocyte, 5 à 6 jours après la nutrition.

Noyau. Il ne montre pas de changement notable sinon que sa taille est plus grande comme d'ailleurs celle de l'ovocyte.

Cytoplasme (Fig. 9). Les mitochondries sont réparties réguliè-

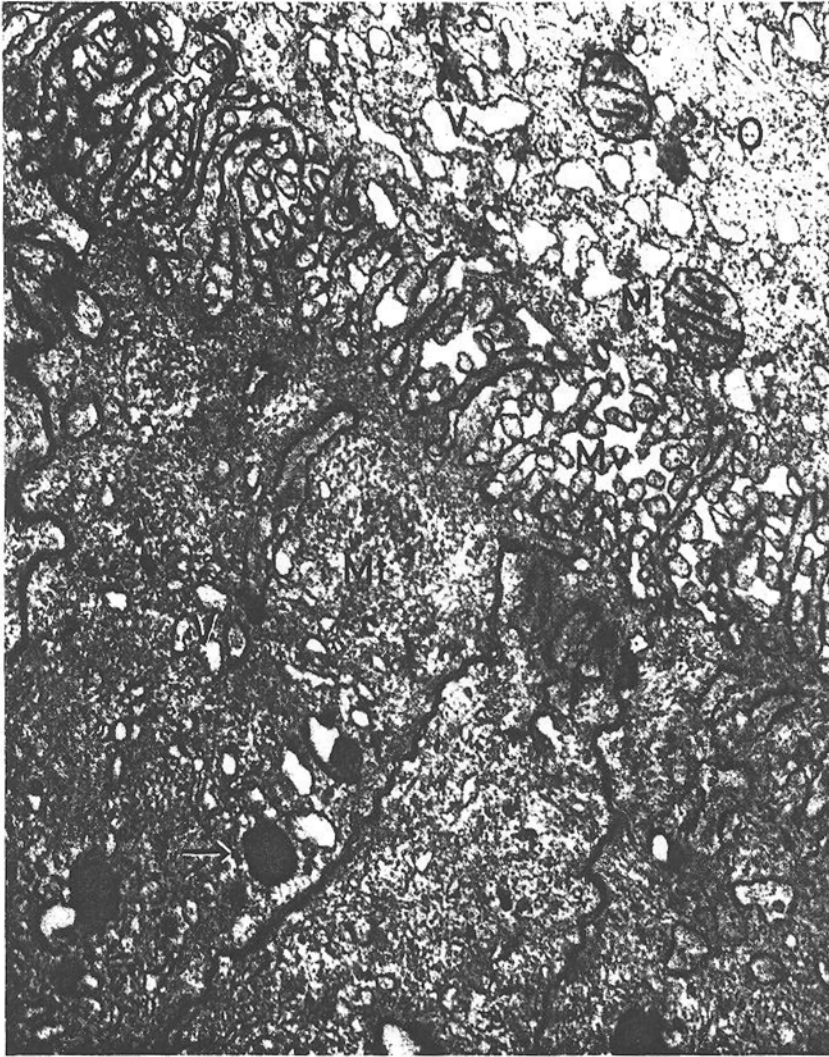


Fig. 7. Ovaire 5 jours après la nutrition. Femelle fécondée. Le bas de la photographie représente des cellules du funicule, avec des vacuoles (V) quelques-unes étant remplies d'une substance opaque aux électrons (→). Remarquez les nombreux microtubules (Mt) coupés transversalement. Les microvilli (Mv) des cellules du funicule et les microvilli de l'ovocyte (O) s'imbriquent les uns dans les autres. M : mitochondries de l'ovocyte. Agr. 24 000 ×.

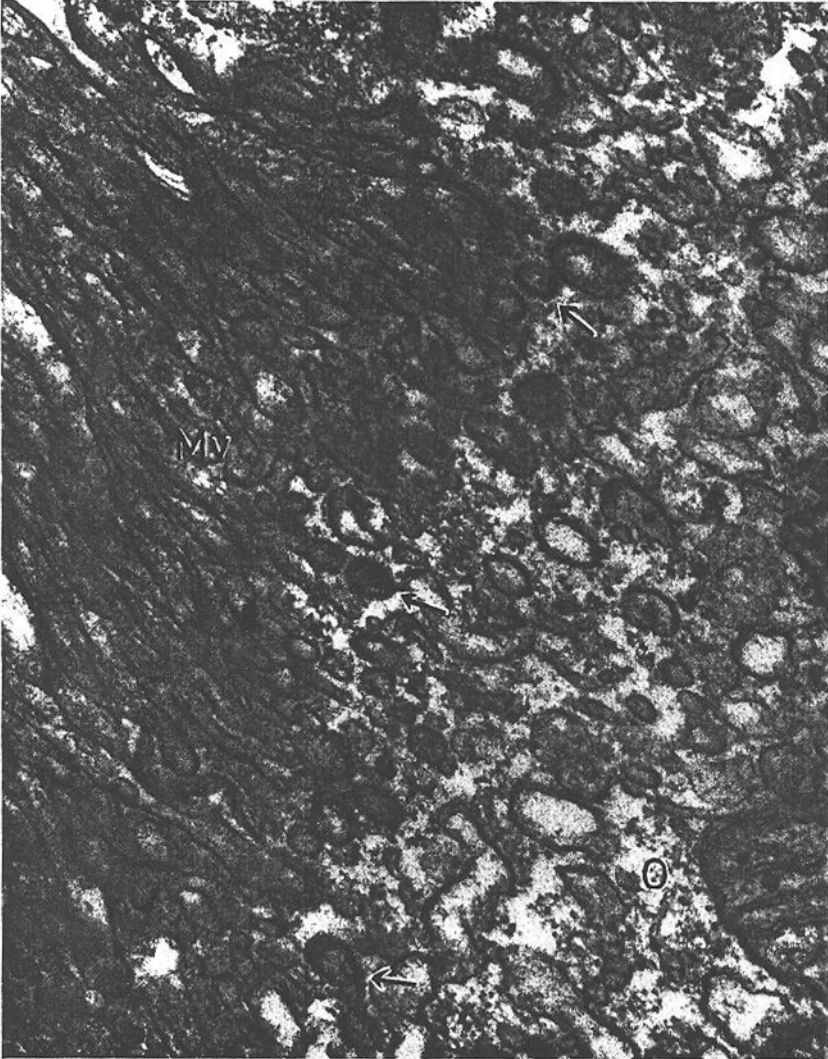


Fig. 8. Ovaire, 5 jours après la nutrition. Femelle fécondée. A droite, l'ovocyte (O). A gauche, les microvilli (Mv). Des vacuoles (→), pleines d'une substance sombre, semblent se former dans la région des microvilli (micropinocytose) et se répartissent ensuite dans le cytoplasme de l'ovocyte. Agr. 54 000 ×.

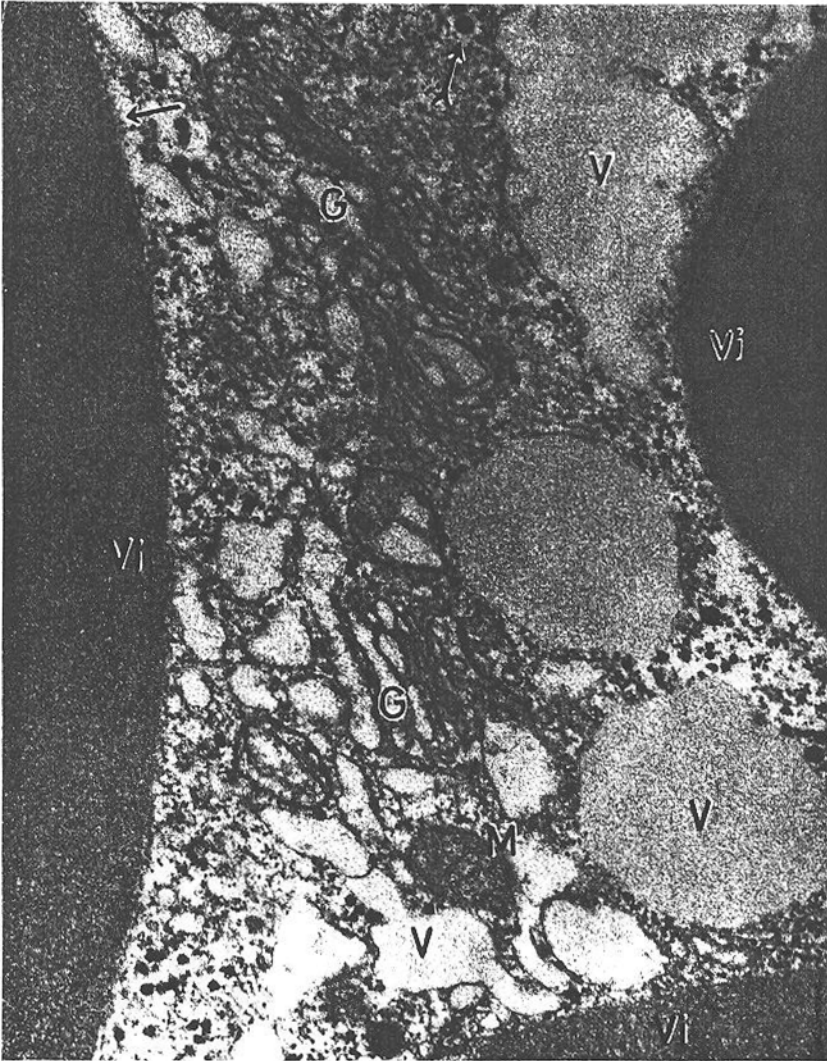


Fig. 9. Portion d'un ovocyte, 6 jours après la nutrition. Femelle fécondée. Vi : vitellus entouré d'une membrane (→). G : zone de Golgi. V : vacuoles contenant des substances dont l'opacité aux électrons varie. M : mitochondries. On trouve dans le cytoplasme, en plus des ribosomes, des particules sombres (>>) qui, selon toute vraisemblance, sont du glycogène. Agr. 24 000 X.

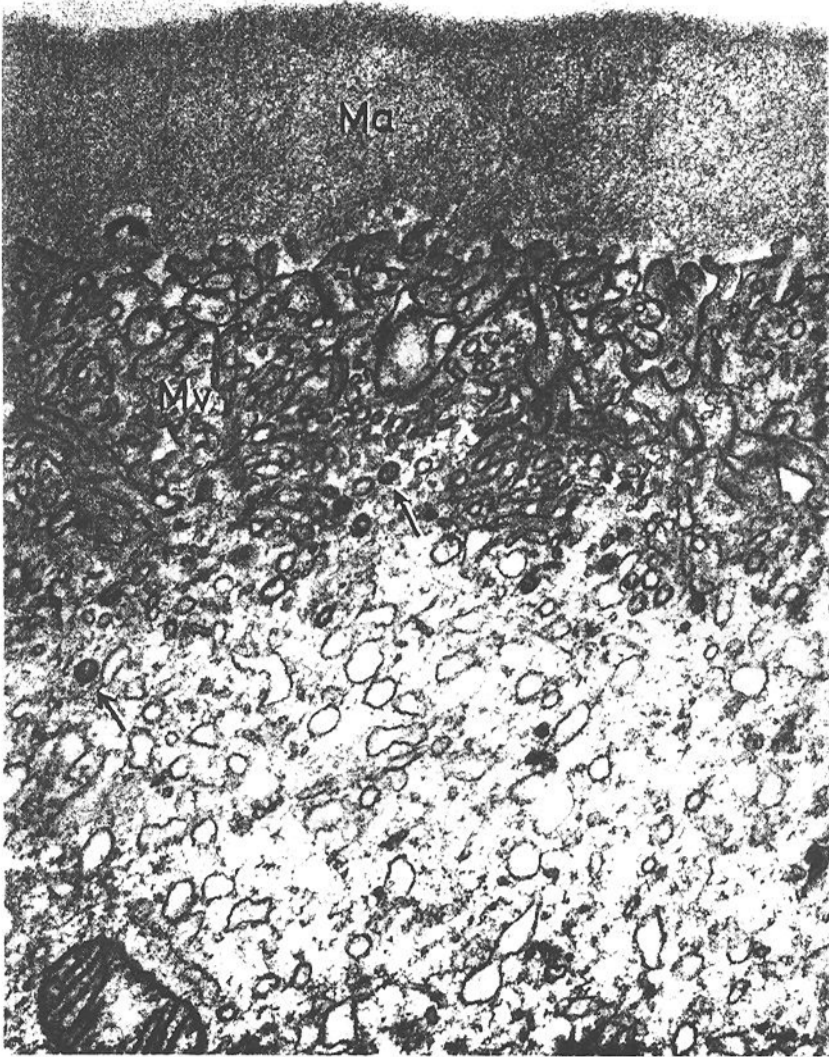


Fig. 10. Portion d'un ovocyte, 5 jours après la nutrition. Femelle fécondée. Début de la formation de la cuticule. En haut, le manteau (Ma), puis les microvilli (Mv) qui sont formés par la membrane de l'ovocyte. De petites vacuoles à contenu sombre (→) sont visibles à la base des microvilli. Peut-être contiennent-elles les substances nécessaires à la formation de la cuticule. Agr. 24 000 \times .



Fig. 11. Portion d'un ovocyte, 6 jours après la nutrition. Femelle fécondée. Même région que pour la Fig. 10. La formation de la cuticule est plus avancée. Le manteau (Ma), du fait de son extension due au grossissement de l'ovocyte, est devenu plus mince. La cuticule, apparaissant en noir à la suite de la fixation au tétraoxyde d'osmium, est déposée parmi les microvilli (Mv). Ceux-ci, peu à peu, seront supprimés. Agr. 45 000 \times .

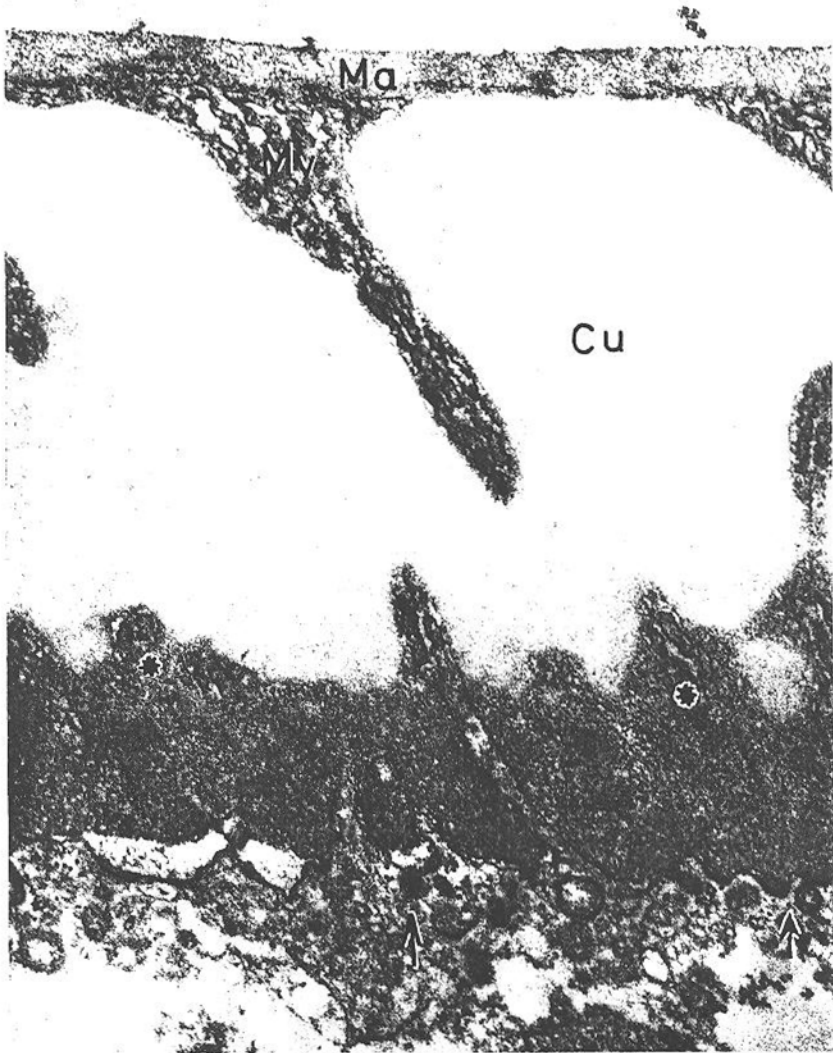


Fig. 12. Portion d'un ovocyte, 7 jours après la nutrition. Femelle fécondée. Même région que pour les figs. 10 et 11. Sous le manteau (Ma), la cuticule (Cu) — en clair après la fixation préliminaire à l'aldéhyde glutarique — a pris, dans une large mesure, la place des microvilli (Mv). La partie interne de la cuticule, encore largement traversée de microvilli (*), a conservé un ton sombre. A la base des microvilli, on reconnaît des vacuoles (→) venues déverser leur contenu et prendre part ainsi à la formation de la cuticule. Agr. 24 000 \times .

ment dans le cytoplasme. Elles ne sont plus réunies en une couche périphérique. Leur nombre a diminué. Toutes sont maintenant de formes arrondies ; les longues mitochondries décrites précédemment ont disparu. Quant à leur structure, elle est restée la même.

L'ergastoplasme se compose toujours de vésicules, non organisées dans le cytoplasme, mais qui sont plus grandes et plus nombreuses. Les ribosomes sont parfois groupés quoique encore toujours de manière lâche.

On rencontre plusieurs zones de Golgi bien développées.

Les microtubules sont toujours présents. Leur nombre ne semble toutefois pas avoir augmenté.

Nous n'avons plus retrouvé, à ce stade du développement des ovocytes, les symbiotes de Roshdy, BUCHNER (1965), dans son interprétation des trouvailles de WAGNER-JEVSEENKO (1958), admet que ces symbiotes pourraient être concentrés en un point précis de la périphérie de l'œuf. Nous n'avons pu encore réunir suffisamment de microphotographies électroniques pour confirmer ce point de vue.

La plus grande partie de l'ovocyte est maintenant occupée par des gouttes de vitellus de tailles diverses qui relèguent au second plan les autres organelles de la cellule (Fig. 9). On relève également, un peu partout dans le cytoplasme, la présence de corpuscules opaques aux électrons dont la structure grossièrement granuleuse ressemble grandement à des éléments de glycogène.

Membrane de l'ovocyte. Cette membrane possédait, nous l'avons vu, dirigés vers le manteau, des microvilli. Ceux-ci sont maintenant plus longs et plus nombreux (Fig. 10). Le manteau est resté le même dans sa structure, mais il est devenu plus mince par suite de son extension due au grossissement des ovocytes.

On sait que chez *O. moubata* (AESCHLIMANN, 1958), l'enveloppe de l'œuf pondu n'est pas un chorion produit par des cellules folliculaires — cas des Insectes — mais une cuticule sécrétée par l'ovocyte elle-même. C'est environ au cinquième jour de l'ovogénèse que débute la sécrétion de la cuticule (Fig. 10). Celle-ci apparaît, au microscope électronique, comme une couche puissante d'une substance homogène, déposée entre les microvilli de la membrane ovocytaire, dont elle finira par prendre la place (Fig. 11 et 12). Il est vraisemblable que la cuticule a son origine dans l'arrivée à la surface de l'œuf de nombreuses petites vacuoles rondes, venant déverser là leur contenu (Fig. 10 et 12). Cette hypothèse demande cependant à être confirmée.

Conclusions

Ce travail préliminaire nous a permis d'approcher le problème de la formation de l'œuf chez *O. moubata*.

Le cas des tiques est d'autant plus intéressant que les ovocytes ne sont pas entourés de cellules folliculaires, comme chez les Insectes par exemple. Deux possibilités de nutrition de l'ovocyte peuvent être logiquement prises en considération :

1° ou bien les substances nécessaires arrivent à l'ovocyte par le seul canal du funicule ;

2° ou bien, en plus de la voie funiculaire, elles pénètrent, traversant le manteau, de tous côtés dans l'ovocyte, en provenance de l'hémolymphe.

Il semble établi qu'une partie des substances nutritives arrive à l'œuf par la voie du funicule. La formation de nombreux microvilli, l'augmentation de surface, d'une part de la membrane des cellules funiculaires, d'autre part de la membrane des ovocytes, ainsi que l'apparition, dans la zone de contact, de vésicules chargées d'un produit présumé proche du vitellus, semble confirmer l'hypothèse d'un transport de substances entre funicule et ovocyte, et servant à la vitellogénèse.

L'absence d'appareil de Golgi dans les cellules du funicule, c'est-à-dire dans des cellules dont le métabolisme semble être très actif, nous a cependant étonné.

N'oublions pas également que la membrane de l'ovocyte présente, se développant à la suite du repas sanguin, un nombre toujours plus grand de microvilli et cela sur toute sa surface. On pourrait admettre l'existence d'une arrivée à l'œuf de substances nutritives à travers le manteau, en provenance directe de l'hémolymphe.

La pénétration dans l'œuf de toute substance — ou de tout autre élément — s'arrêterait avec la formation de la cuticule. Nous avons vu que celle-ci est déposée parmi les microvilli de l'ovocyte. Quel rôle ceux-ci jouent-ils exactement dans la résorption des substances nutritives ? Dans quelle mesure favorisent-ils la formation de la cuticule de l'œuf ? Cela, nous l'ignorons encore et nous poursuivons les recherches dans le but de résoudre ces problèmes.

Littérature

- AESCHLIMANN, A. (1958). Développement embryonnaire d'*Ornithodoros moubata* (Murray) et transmission transovarienne de *Borrelia duttoni*. — *Acta trop.* 15, 15-64
- ANDERSON, E. (1964). Oocyte differentiation and vitellogenesis in the roach *Periplaneta americana*. — *J. Cell Biol.* 20, 131-155

- BUCHNER, PAUL. (1965). Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Revised Engl. version. — New York, London: Interscience Publishers, 909 pp.
- FAWCETT, DON W. (1966). The cell. An atlas of fine structure. — Philadelphia, London: W. B. Saunders, 448 pp.
- GEIGY, R. & HERBIG, A. (1955). Erreger und Überträger tropischer Krankheiten. — Basel: Verlag für Recht und Gesellschaft, 472 pp. (Acta trop. Suppl. 6)
- KELLENBERGER, E., RYTER, A. & SECHAUD, J. (1958). Electron microscope study of DNA-containing plasms. II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. — Biophys. Biochem. Cytol. 4, 671-678
- ROTH, T. F. & PORTER, K. R. (1964). Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* L. — J. Cell Biol. 20, 313-332
- ROSHDY, M. A. (1961). Observations by electron microscopy and other methods on the intracellular Rickettsia-like microorganisms in *Argas persicus* (Ixodoidea, Argasidae). — J. Insect. Pathol. 3, 148-166
- WAGNER-JEVSEENKO, O. (1958). Fortpflanzung bei *Ornithodoros moubata* und genitale Übertragung von *Borrelia duttoni*. — Acta trop. 15, 118-168

Zusammenfassung

Bei *Ornithodoros moubata* wurde die Feinstruktur von Ovocyten und deren Entwicklung zu reifen Eiern im Laufe der Vitellogenese untersucht. Besondere Aufmerksamkeit widmete man der Beziehung zwischen den Funiculuszellen des Ovars und den sich ausdifferenzierenden Eiern. Auch konnte die Bildung der Eihülle verfolgt werden, die von den reifenden Eiern sezerniert wird und somit kein Chorion im Sinne der Insekten ist.

Summary

The development of young ovocytes to mature eggs after a bloodmeal—especially the apparition of the yolk—was studied with the electron microscope. Special attention was paid to the relation between the ovarian cells of the funicle and the developing eggs. It was possible too to study in details the formation of the egg's envelope, which is not a chorion as in insects, but a cuticle secreted by the egg itself.