

LES CELLULES FOLLICULAIRES SECONDAIRES
DE LA CREVETTE *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* (DECAPODE PALAEMONIDE) :
MISE EN EVIDENCE D'UN RESEAU TUBULAIRE IMPLIQUE
DANS LES ECHANGES ENTRE L'HEMOLYMPHE ET L'OVOCYTE

J.J. MEUSY, P. JUGAN et C. ZERBIB
Laboratoire de Sexualité et Reproduction des Invertébrés
Université Paris VI, Bât. A, 4 place Jussieu,
75230 PARIS Cedex 05.

R E S U M E

L'étude ultrastructurale de l'ovaire de la crevette *Macrobrachium rosenbergii* a permis de mettre en évidence dans les cellules de l'épithélium folliculaire secondaire un réseau tubulaire de 0,15 µm environ de diamètre. Ce réseau, très anastomosé et circonvolutionné est en communication avec l'espace extracellulaire. Il constitue une structure temporaire qui a pour effet d'augmenter considérablement la perméabilité de l'épithélium folliculaire.

A B S T R A C T

The epithelial cells of the ovary secondary follicles have been studied in the prawn *Macrobrachium rosenbergii* using electron microscope and horseradish peroxidase. A network of circonvolutioned and anastomosed tubules, measuring about 0,15 µm in diameter, communicates with the extracellular space. This tubular network is a temporary structure which extensively increases the permeability of the follicular epithelium.

M O T S - C L E S : *Macrobrachium rosenbergii*, vitellogénèse, épithélium folliculaire, réseau tubulaire, vitellogénine.

K E Y W O R D S : *Macrobrachium rosenbergii*, vitellogenesis, follicular epithelium, tubular network, vitellogenin.

La vitellogénèse secondaire est caractérisée par l'entrée de la vitellogénine dans les ovocytes (voir revue dans Meusy, 1980 ; Meusy et Charniaux-Cotton, 1983-84). Ceux-ci sont entourés individuellement par une assise de cellules folliculaires dites "secondaires", provenant d'un tissu permanent (Charniaux-Cotton, 1974, 1980).

Rappelons que la vitellogénine, précurseur sérique du vitellus protéique, est une lipo-glyco-caroténoprotéine de haut poids moléculaire, synthétisée par le tissu adipeux ; elle est véhiculée par l'hémolymphe et pénètre dans les ovocytes en vitellogénèse secondaire par endocytose (micropinocytose).

Chez la crevette *Macrobrachium rosenbergii* dont l'ovaire a fait l'objet de travaux récents (Fauvel, 1981, 1983), une étude ultrastructurale de l'épithélium folliculaire secondaire fait apparaître des structures inhabituelles qui semblent constituer une voie de transit vers l'ovocyte.

MATERIEL ET METHODES

Les crevettes *M. rosenbergii* proviennent des élevages du Centre Océanologique du Pacifique (Tahiti, Polynésie française). Elles sont élevées au laboratoire à une température de 28°C. La photophase est de 12 h. L'alimentation est constituée de moules.

Les ovaires sont fragmentés et préfixés durant 1 h par une solution de glutaraldéhyde 2 % - paraformaldéhyde 3 % dans un tampon cacodylate de sodium 0,2 M à pH 7,4. Après rinçage de quelques minutes dans ce même tampon, les ovaires sont fixés durant 30 mn par une solution de tétroxyde d'osmium à 1 % dans le tampon. Ils sont rincés, déshydratés par l'éthanol et inclus dans l'Epon. Les coupes ultrafines sont contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb. Elles sont observées au microscope électronique Philips EM 200 ou EM 300.

Des fragments d'ovaires en début de vitellogenèse secondaire sont incubés durant 5 mn dans une solution saline enrichie de 5 % de peroxydase (Sigma grade VI ; PM : 40 000 daltons). Les ovaires sont préfixés durant 3 h, rincés 24 h dans le tampon cacodylate de sodium. La peroxydase est révélée par le tétrachlorhydrate de diaminobenzidine (DAB Sigma) suivant la méthode de Graham et Karnovsky (1966). Ils sont ensuite fixés par le tétroxyde d'osmium comme précédemment. Des témoins sont effectués en omettant le DAB, l'eau oxygénée ou l'incubation dans la solution de peroxydase.

RESULTATS

Les cellules folliculaires secondaires forment un épithélium simple autour de l'ovocyte (fig. 1 et 2). Leur cytoplasme présente un réticulum endoplasmique bien développé, de nombreuses mitochondries à crêtes transversales, des dictyosomes et des microtubules peu abondants. Leur noyau est ovale (5 x 3 µm).

La structure qui retient surtout l'attention est constituée par un réseau de tubules anastomosés et circonvolutionnés, d'un diamètre de 0,15 µm environ, délimités par une membrane unique (fig. 3). Leur contenu, assez dense aux électrons, présente un aspect finement granulaire. Ce réseau communique avec tous les espaces extracellulaires : vers l'extérieur du follicule, entre les cellules folliculaires adjacentes (fig. 3, 4), vers l'ovocyte où il peut être pénétré par des microvillosités (fig. 5). Sa répartition dans la cellule n'est pas toujours homogène mais ne paraît pas privilégier systématiquement une région particulière, centrale ou périphérique, ni traduire une polarité. Aucune relation n'a pu être observée entre ce réseau et les organites cytoplasmiques, notamment le réticulum endoplasmique granulaire.

Il est important de préciser que le réseau tubulaire est absent des cellules de l'épithélium folliculaire lorsque celles-ci n'ont pas encore entouré les ovocytes prêts à entrer en vitellogenèse secondaire (fig. 6). Au début de la mise en place de l'enveloppe folliculaire secondaire (intervenant au début du stade C du cycle de mue), certaines cellules épithéliales possèdent un réseau tubulaire encore peu développé (fig. 7). Celui-ci apparaît alors essentiellement sous forme de dilatations qui affectent localement des systèmes membranaires en

communication avec l'espace extracellulaire. Ces dilatations sont souvent terminales mais peuvent aussi former des branchements perpendiculaires.

Après incubation pendant 5 mn de fragments d'ovaires en vitellogenèse secondaire dans un milieu contenant de la peroxydase, une réaction positive à la diaminobenzidine est observée au niveau de la lame basale, dans le réseau tubulaire, à la surface des microvillosités ovocytaires et dans certains globules vitellins périphériques (fig. 8, 9, 10).

DISCUSSION

Les études cytologiques réalisées jusqu'à présent chez les Crustacés Malacostracés (Zerbib, 1977 ; Rateau et Zerbib, 1978 ; Shade et Shivers, 1980 ; Talbot, 1981), de même que chez les Insectes (Rubenstein, 1979), les Poissons (Selman et Wallace, 1982), les Amphibiens (Dumont, 1978) et les Reptiles (Neaves, 1972) n'ont pas révélé dans les cellules folliculaires de structure analogue au réseau tubulaire observé chez *Macrobrachium rosenbergii* et suggèrent que la vitellogénine transite par les espaces intercellulaires.

En revanche, une structure d'apparence analogue au réseau tubulaire des cellules folliculaires de *M. rosenbergii* a été décrite dans les cellules à chlorures des branchies de poissons (Laurent et Dunel, 1980 ; Pisam, 1981) où elle est impliquée dans les mécanismes d'osmorégulation.

Le réseau tubulaire est une structure temporaire concomitante de la vitellogenèse secondaire, c'est-à-dire de l'entrée de la vitellogénine dans les ovocytes. Les résultats des incubations d'ovaires en présence de peroxydase indiquent qu'il est perméable aux molécules d'assez grosse taille qui atteignent ainsi rapidement l'ovocyte. Après 5 mn d'incubation, les globules vitellins périphériques sont déjà marqués par la peroxydase alors que 30 mn sont nécessaires pour obtenir le même résultat chez *Orchestia gammarellus* (Zerbib, 1977). Il est probable que le réseau tubulaire participe, grâce à ses multiples anastomoses, au transfert de la vitellogénine du compartiment hémolympatique au compartiment ovocytaire. Des expériences de marquage devraient permettre d'apporter prochainement des éléments complémentaires.

L'origine du réseau tubulaire ainsi que son devenir après la ponte ne sont pas clairement établis. Sa formation semble résulter de profonds remaniements qui affectent les systèmes membranaires de l'épithélium folliculaire.

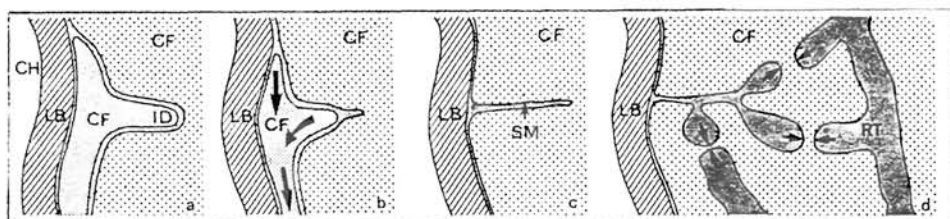


Figure 11. Représentation hypothétique de la formation du réseau tubulaire.
a. Cellules de l'épithélium folliculaire avant la formation du follicule secondaire. Les cellules présentent de nombreuses interdigitations.
b. Formation du follicule secondaire. Les cellules de l'épithélium folliculaire s'étalent sur l'ovocyte en croissance et les digitations se rétractent.
c. Formation du follicule secondaire (suite). Des systèmes membranaires en communication avec l'espace extracellulaire subsistent.
d. Formation du réseau tubulaire. Les systèmes membranaires se vésiculisent et s'anastomosent. (Mêmes abréviations que pour les figures 1-10)

Il est probable que les interdigitations affectant les cellules de l'épithélium folliculaire se rétractent au moment où ces cellules s'étalent à la surface de l'ovocyte en croissance (fig. 11). Les systèmes membranaires subsistant après ce processus de rétraction se vésiculiseraient et, après anastomoses, formeraient le réseau tubulaire.

Cette structure semble revêtir un intérêt particulièrement important pour la connaissance du rôle de l'épithélium folliculaire dans les mécanismes de la vitellogénèse secondaire.

Addendum

MM. J.M. Arcier et M. Bréhelin nous ont informés, lors de la tenue du Colloque, qu'ils avaient mentionné dans une publication récente l'existence d'un réseau semblable dans l'épithélium folliculaire d'un autre Palaemonidé, *Palaemon adspersus* (Etude histologique et ultrastructurale du tissu folliculaire au cours des cycles de développement ovarien chez *Palaemon adspersus* (Rathke, 1837). *Arch. Biol.*, 93, 79-97 (1982)). Cette structure est en effet identifiable sur la figure 6 de l'article précité. Il serait intéressant de savoir si la présence du réseau tubulaire est limitée aux seuls Décapodes Palaemonidés.

Remerciements

Nous remercions vivement le Centre Océanologique du Pacifique, particulièrement MM. D. Cognie et A. Michel, de nous approvisionner en matériel vivant. Nous sommes également reconnaissants au Bureau du Transport du Centre d'Expérimentation du Pacifique pour les facilités d'acheminement qu'il nous offre.

Charniaux-Cotton, H., 1974 - Données nouvelles concernant la vitellogénèse des Crustacés Malacostracés obtenues chez l'Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas) : folliculogénèse à partir d'un tissu permanent ; action du busulfan ; action inhibitrice de l'hormone juvénile. *C.R. Acad. Sci.*, 279, sér. D, p. 563-566.

Charniaux-Cotton, H., 1980 - Experimental studies of reproduction in Malacostraca Crustaceans. Description of vitellogenesis and its endocrine control. *Advances in Invertebrate Reproduction*, W.H. Clark Jr. and T.S. Adams, eds, Elsevier North Holland, p. 177-186.

Dumont, J.N., 1978 - Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). VI. The route of injected tracer transport in the follicle and developing oocyte. *J. Exp. Zool.*, 204, p. 193-218.

Fauvel, C. 1981. - Etude de l'ovaire de la Crevette d'eau douce *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) au cours du cycle de reproduction. Première description de la folliculogénèse secondaire chez un Crustacé Décapode. *C.R. Acad. Sci.*, 292, sér. III, p. 547-552.

Fauvel, C., 1983 - L'ovaire de *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Crustacé Décapode) au moment de l'ovulation. *C.R. Acad. Sci.*, 296, sér. III, p. 1053-1058.

- Graham, R.C. et Karnovsky M.J., 1966 - The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney : ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14, p. 291-302.
- Laurent P. et Dunel S., 1980 - Morphology of gill epithelia in fish. *Ann. J. Physiol.*, 238, R 147 - R 159.
- Meusy, J.J., 1980 - Vitellogenin, the extraovarian precursor of the protein yolk in Crustacea : a review. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 20, p. 1-21.
- Meusy, J.J. et Charniaux-Cotton, H., 1983-84 - Endocrine control of vitellogenesis in Malacostraca Crustaceans. *Advances in Invertebrate Reproduction*, Elsevier North Holland (sous-presses).
- Neaves, W.B., 1972 - The passage of extracellular tracers through the follicular epithelium of lizard ovaries. *J. Exp. Zool.*, 179, p. 339-364.
- Pisam, M., 1981 - Membranous systems in the "chloride cell" of teleostean fish gill ; their modifications in response to the salinity of the environment. *Anat. Rec.*, 200, p. 401-414.
- Rateau, J.G. et Zerbib, C., 1978 - Etude ultrastructurale des follicules ovocytaires chez les Crustacé Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas). *C.R. Acad. Sci.*, 286, sér. D, p. 65-68.
- Rubenstein, C., 1979 - The role of an epithelial occlusion zone in the termination of vitellogenesis in *Hyalophora cecropia* ovarian follicles. *Develop. Biol.*, 71, p. 115-127.
- Selman, K. and Wallace, R.A., 1982 - Oocyte growth in the sheepshead minnow : uptake of exogenous proteins by vitellogenic oocytes. *Tissue and Cell*, 14, 555-571.
- Shade, M.L. and Shivers, R.S., 1980 - Structural modulation of the surface and cytoplasm of oocytes during vitellogenesis in the lobster, *Homarus americanus*. An electron microscope - protein tracer study. *J. Morphol.*, 163, 13-26.
- Talbot, P., 1981 - The ovary of the lobster, *Homarus americanus*. II. Structure of the mature follicle and origine of the chorion. *J. Ultrastruct. Res.*, 76, 249-262.
- Zerbib, C., 1977 - Endocytose ovocytaire chez le Crustacé Amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas). Démonstration par la peroxydase. *C.R. Acad. Sci.*, 284, sér. D, 757-760.

LEGENDE DES FIGURES 1-10

Abréviations utilisées

CF : cellule de l'épithélium folliculaire secondaire ; CH : compartiment hémolympatique ; EV : enveloppe vitelline ; G : appareil de Golgi ; GL : globule lipidique ; CV : globule vitellin ; ID : interdigitation ; LB : lame basale ; M : mitochondrie ; MAV : macrovillosité ; MIV : microvillosité ; MT : microtubule ; N : noyau ; OV : ovocyte en vitellogenèse secondaire ; REG : réticulum endoplasmique granulaire ; RT : réseau tubulaire ; SM : système membranaire ; VP : vésicule de pinocytose.

Fig. 1 et 2 : Aspect d'ensemble d'une cellule de l'épithélium folliculaire secondaire montrant le réseau tubulaire. L'ovocyte est en vitellogenèse secondaire.

Fig. 3 : Cellules de l'épithélium folliculaire secondaire (détail). On remarque que le réseau tubulaire communique avec l'espace extracellulaire situé entre les cellules folliculaires adjacentes et à l'extérieur du follicule (côté de la lame basale).

Fig. 4 : Cellule de l'épithélium folliculaire (détail). Communication du réseau tubulaire avec l'extérieur du follicule (compartiment hémolympatique).

Fig. 5 : Cellule de l'épithélium folliculaire secondaire (détail). Le réseau tubulaire est pénétré par les microvillosités de l'ovocyte qui est ici au début de la vitellogenèse secondaire (l'enveloppe vitelline n'est pas encore présente). Il est donc en continuité avec l'espace périovocyttaire.

Fig. 6 : Tissu folliculaire secondaire avant la formation des follicules secondaires. On remarque l'absence de réseau tubulaire et les nombreuses interdigitations cytoplasmiques. Les noyaux sont très lobés et présentent une chromatine très condensée.

Fig. 7 : Cellules de l'épithélium folliculaire secondaire en début de vitellogenèse secondaire. Le réseau tubulaire est encore peu développé. Il apparaît essentiellement sous forme de dilatations affectant des systèmes membranaires en communication avec l'espace extracellulaire.

Fig. 8 : Cellule de l'épithélium folliculaire secondaire après 5 mn d'incubation dans une solution de peroxydase. La peroxydase apparaît au niveau de la lame basale, de l'ensemble du réseau tubulaire, des microvillosités ovocytaires, des vésicules d'endocytose et des globules vitellins périphériques.

Fig. 9 : Cellule de l'épithélium folliculaire secondaire après 5 mn d'incubation dans une solution de peroxydase (détail). La lame basale et l'ensemble du réseau tubulaire sont fortement marqués par la peroxydase.

Fig. 10 : Cellule de l'épithélium folliculaire secondaire après 5 mn d'incubation dans une solution de peroxydase (détail). La peroxydase pénètre dans tous les systèmes membranaires et le réseau tubulaire.

