

## MODIFICATIONS ULTRASTRUCTURALES DU CHORION DANS LES KYSTES PRÉHUMIDIFIÉS D'ARTEMIA

Jeanne CASTRITSI-CATHARIOS \*, Pantelis CONSTANTOULAKIS \*,  
Theodore KATSORCHIS \*\* et Vassili KIORTSIS \*

\* Zoological Laboratory · University of Athens.

\*\* Department of Biology · University of Athens,  
Panepistimiopolis, Athens · Greece GR-157 71.

### *Abstract*

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN THE CHORION OF PREHYDRATED ARTEMIA CYSTS.

Ultrastructural changes of the chorion were studied in prehydrated *Artemia* cysts, by electron microscopy. After incubation for 12, 24, 48 and 72 hours, in hygrometers (under controlled relative humidity, that range from 19 % to 99 %) we observed in cysts that were maintained for at least 48 h in 99 % of relative humidity, some chorionic alveoli, containing electron dense structures. We presume that ions and/or molecules migrate during prehydration from inside the cyst to the alveolar layer.

### *Résumé*

Les modifications de l'ultrastructure du chorion ont été étudiées au microscope électronique sur les kystes préhumidifiés d'*Artemia*. Après incubation pendant 12, 24, 48 et 72 heures dans des hygromètres (humidité relative variant de 19 à 99 %) on constate que, quand 99 % d'humidité est maintenue pendant au moins 48 h, plusieurs alvéoles du chorion contiennent des structures denses aux électrons. On suppose que des ions (ou des molécules) migrent de l'intérieur du kyste vers la couche alvéolaire au cours de la préhumidification.

### *Introduction.*

On sait que des kystes d'*Artemia*, incubés à des pressions relatives de vapeur d'eau élevées (au dessus de 96 %), subissent une réduction de poids et montrent une diminution de viabilité ; ce n'est pas le cas à des pressions inférieures à 92,5 %. Le point critique de l'humidité relative, dit « activité de l'eau », est de 92,5 % (CLEGG, 1974). Le contenu en eau, requis pour amorcer l'activité métabolique du kyste, est estimé à 0,65 g H<sub>2</sub>O/g de poids sec.

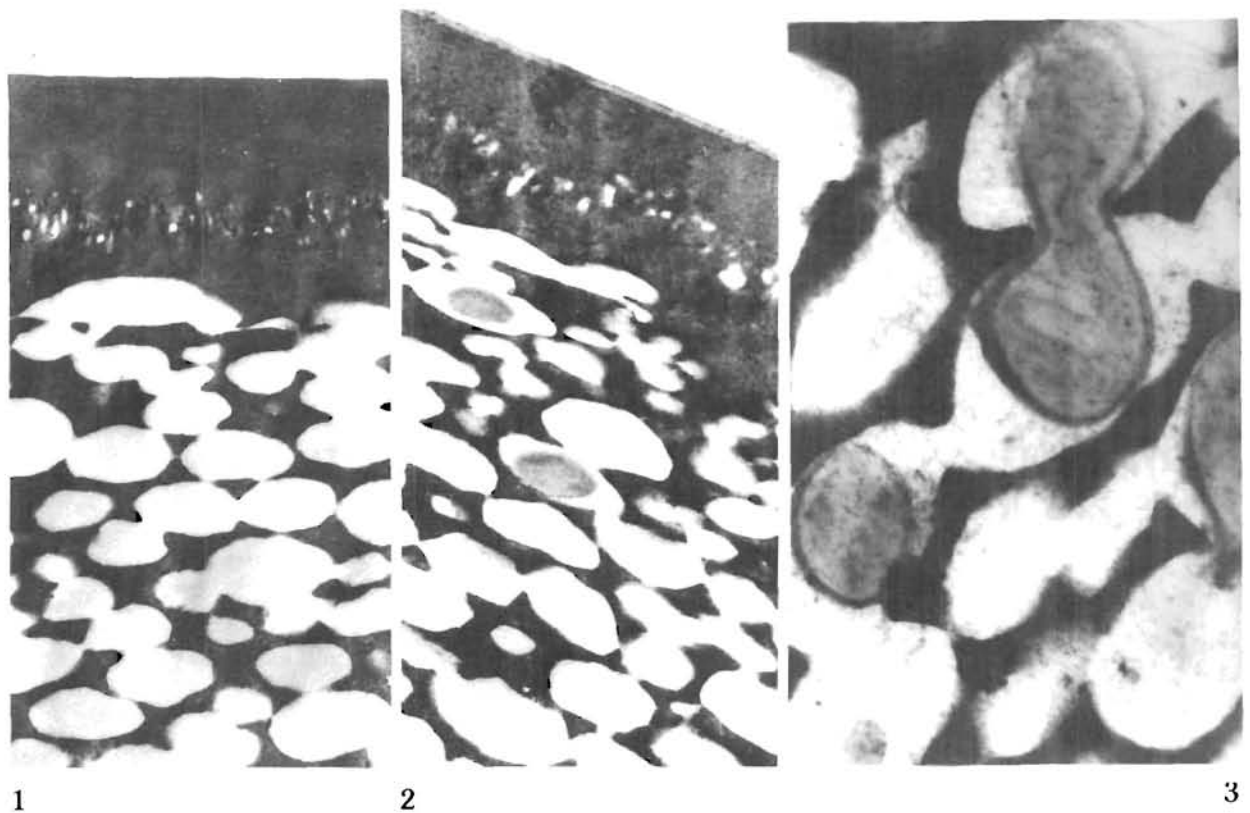


FIG 1. — Coupe du chorion (couche alvéolaire), vue au microscope électronique de transmission ( $\times 27\ 600$ ) ; incubation pendant 48 h à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  ; humidité relative basse (19 %). Pas d'inclusions dans les alvéoles ; à noter que la couche corticale est très dense aux électrons. 2. — Coupe de la couche alvéolaire du chorion après préhumidification à humidité relative élevée (97-99 %) ; nombreuses inclusions (« gemidia ») dans les alvéoles ; incubation pendant 48 h à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  ( $\times 27\ 600$ ). 3. — Couche alvéolaire du chorion d'un kyste traité comme celui de la fig. 2 à plus fort grossissement ( $\times 56\ 000$ ) ; plusieurs inclusions (« gemidia ») dont l'une passe par le canal de communication des 2 alvéoles.

1. — Electromicrograph of the alveolar layer of the chorion ( $\times 27\ 600$ ) ; incubations time 48 hrs at  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ . in 19 % relative humidity ; no « inclusions » in the alveoli ; note the electron-dense cortex. 2. — Electromicrograph of the alveolar layer of the chorion, after prehydration at high relative humidity (97-99 %) ; incubation time 48 hrs at  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  ; numerous inclusions (« gemidia ») ( $\times 27\ 600$ ). 3. — Higher magnification of the alveolar layer of a cyst treated as in fig. 2 ; note various inclusions (« gemidia ») on of them interconnecting two alveoli ( $\times 56\ 000$ ).

HUMIDITÉ RELATIVE	DURÉE D'INCUBATION (heures)	CONTENU EN EAU (%)
19 %	12	3.1
	24	3.0
	48	2.9
	72	2.8
69-71 %	12	11.7
	24	12.1
	48	12.2
	72	12.3
88-90 %	12	32.6
	24	33.1
	48	35.0
	72	36.0
97-99 %	12	54.1
	24	68.3
	48	80.3
	72	85.0

TABL. 1. — Contenu en eau des kystes en fonction de l'humidité relative et de la durée d'incubation. Water content (mg  $\text{H}_2\text{O}/100$  mg dried cysts) of cysts, connected to relative humidity (%) and incubation time (hour).

## Méthode.

Les kystes, appartenant à l'espèce *Artemia franciscana*, sont fournis par Carolina Biological Supply Co., Burlington, N. Carolina, U.S.A. Ces kystes ont été incubés à température constante ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ) et illumination continue, dans des hygromètres contenant une solution de  $\text{CaCl}_2$  à concentrations variables : 19 % ( $\text{CaCl}_2$  anhydre) ; 69-71 % (humidité ambiante) ; 88-90 % ( $\text{CaCl}_2$  en solution sursaturée ; 500 %) ; 97-99 % ( $\text{CaCl}_2$  en solution sursaturée ; 400 %). La durée d'incubation était 12, 24, 48, 72 heures et chaque test répété trois fois.

Le contenu des kystes en eau non fixée est déterminé, selon la méthode Karl-Fisher, par titration d'extraits préparés avec de l'éther gluco-éthylénique.

Pour le microscope électronique les kystes sont fixés au tétraoxyde d'osmium à 1 %, après préfixation au glutaraldéhyde à 2 %, tamponné au cacodylate de sodium 0,1 M (pH = 7,5) ; les coupes ultrafines de 80  $\mu\text{m}$  sont contrastées à l'acétate d'uranyle, et au citrate de plomb avant d'être observées au microscope électronique de transmission (Philips E.M. 200, à 80 KV, à condensateur double).

## Résultats et discussion.

Les rapports entre l'humidité relative, le contenu en eau et la durée d'incubation sont représentés tabl. 1. En augmentant la pression de la vapeur d'eau, on a observé que les kystes équilibrent l'humidité de l'eau contenue avec celle du milieu environnant jusqu'à une limite, qui est estimée entre 90 et 99 %. La capacité des kystes à équilibrer cette humidité se perd, quand ils ont absorbé 0,65 g d'eau par gramme de poids sec (CLEGG, 1977 ; CONTE, 1980).

Le taux d'éclosion le plus élevé a été observé après préhumidification à l'humidité maximum (95 %) pendant 24 h.

Jusqu'à présent les recherches sur l'ultrastructure du chorion concernaient soit le stade de diapause, soit ceux du développement. Les kystes qui ont été préhumidifiés pendant 12, 24, 48 et 72 h à des pressions de vapeur inférieures à 88-90 %, n'ont pas montré des modifications morphologiques et structurales. En revanche, dans les kystes incubés aux pressions les plus élevées (limite critique d'hydratation) on constate que plusieurs alvéoles du chorion contiennent des corps denses aux électrons. Nous appelons ces structures « gemidia » (du verbe grec *γέμειν*, guémein, qui signifie remplir). Leur présence à l'intérieur des alvéoles était constante ; raison pour laquelle on ne peut les considérer comme des artefacts. On sait que ces alvéoles communiquent entre elles, soit par confluence, soit par des tubules rectilignes étroits dont le diamètre (30  $\mu\text{m}$ ) est semblable à celui des pores radiaux du cortex. Les alvéoles des kystes préhumidifiés, préparés par la technique de « freeze-etching », contiennent aussi des cristaux minuscules (LIESBRECHT, cité par MORRIS et AFZELIUS, 1967). On suppose par des processus lytiques que des ions ou des molécules migrent de proche en proche de l'intérieur du kyste vers la couche alvéolaire et occupent, pendant les phases successives de l'hydratation, la cavité des alvéoles.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leur gratitude au Dr P. SORGELOOS pour ses conseils et la critique constructive du manuscrit.

## BIBLIOGRAPHIE

- CASTRITSI-CATHARIOS (J.), KATSORCHIS (Th.), KIORISIS (V.), APOSTOLOPOULOS (N.). 1984. — Effets de la préhumidification sur les kystes d'*Artemia* (taux d'éclosion, taille et ultrastructure). — *Thalassographica*, **7** : 19-26.
- CLEGG (J.S.), 1974. — Interrelationships between water and metabolism in *Artemia* cysts. Hydration and dehydration from liquid and vapor phases. — *J. Exp. Biol.*, **61** : 219-308.
- CLEGG (J.S.) et CONTE (F.), 1980. — A review of the cellular and development biology of *Artemia*. — In : shrimp *Artemia*, vol. 2 : Physiology, Biochemistry, Molecular Biology : 12-53, par G. PERSOONE, P. SORGELOOS, O. ROELS et E. JASPERS, Universa Press Edit. Wetteren, Belgium 664 p.
- MORRIS (J.E.) et AFZELIUS (B.A.), 1967. — The structure of the shell and outer membranes in encysted *Artemia salina* embryos during cryptobiosis and development. — *J. Ultrastr. Res.*, **20** : 244-259.

Manuscrit soumis le 21.08.1984, accepté le 10.05.1985.