

VARIATIONS MORPHOLOGIQUES DE L'APPAREIL NUCLÉAIRE CHEZ LES CILIÉS ASTOMES *ALMOPHRYA BIVACUOLATA* ET *A. MEDIOVACUOLATA* (PROTOZOA : CILIOPHORA) ENDOCOMMENSaux D'OLIGOCHÈTES TERRICOLES DU CAMEROUN

NANA P.A.*, NGASSAM P.*, FOKAM Z.*, BRICHEUX G.**.***, BOUCHARD P.**, COFFE G.**.***, SIME GANDO T.**.*** & ZÉBAZÉ TOGOUET S.H.*

Summary: MORPHOLOGICAL VARIATIONS OF THE NUCLEAR APPARATUS OF ASTOME CILIATES *ALMOPHRYA BIVACUOLATA* AND *A. MEDIOVACUOLATA* (PROTOZOA: CILIOPHORA) ENDOCOMMENSAL OF TERRICOLOUS OLIGOCHAETES IN CAMEROON

The silver impregnation supplemented by DAPI and Feulgen nuclear coloration enabled us to study the morphological variations of the nuclear apparatus of two species of endocommensal Astome ciliates, *Almophrya bivacuolata* (de Puytorac & Dragesco, 1968) and *A. mediovacuolata* (Ngassam, 1983). We highlighted important digitations and the presence of dark bands in the structure of the "H" macronucleus of the small cellular types as well as the presence of intermediate forms between "H" and "X" in these two species.

KEY WORDS: Astome ciliates, *Almophrya*, macronucleus, silver impregnation, DAPI colouring.

Résumé :

L'imprégnation argentique complétée par la coloration nucléaire de Feulgen et la coloration au DAPI nous ont permis d'étudier les variations morphologiques de l'appareil nucléaire chez deux espèces de ciliés Astomes, *Almophrya bivacuolata* (de Puytorac et Dragesco, 1968) et *A. mediovacuolata* (Ngassam, 1983) endocommensaux. Nous avons mis en évidence d'importantes digitations et la présence de bandes sombres dans la structure du macronoyau en "H" des petits types cellulaires ainsi que la présence de formes intermédiaires entre "H" et "X" dans ces deux espèces.

MOTS CLÉS : Ciliés Astomes, *Almophrya*, macronoyau, imprégnation argentique, coloration au DAPI.

INTRODUCTION

Les annélides oligochètes Glossoscolecidae du genre *Alma* du Cameroun et du Gabon hébergent une abondante faune commensale de ciliés astomes dans leur tube digestif (de Puytorac & Dragesco, 1968, 1969; de Puytorac, 1969; Ngassam, 1983; Ngassam *et al.*, 1998 ; Fokam, 2005). Parmi ces ciliés, le genre *Almophrya* regroupe trois espèces, *A. bivacuolata* de Puytorac & Dragesco, 1968, *A. laterovacuolata* de Puytorac & Dragesco, 1968 et *A. mediovacuolata* Ngassam, 1983 qui se distinguent par la position et le nombre de vacuoles pulsatiles. Les analyses biométriques et cytophotométriques de l'ADN nucléaire de ces ciliés ont permis de mettre en évidence quatre types cellulaires chez *A. mediovacuolata* (Pm, Mm, Gm1 et Gm2) (Dupy-Blanc & Ngassam, 1983) et trois chez *A. bivacuolata* (Hp, Hm et Xg) (Dupy-Blanc & Ngassam, 1986). La coloration au 4',6'-diamidino-2-phenylindole

(DAPI) (Williamson, D.H. et Fennell, D.J., 1975) est une méthode rapide qui nous a permis d'étudier la diversité morphologique du macronoyau qui présente des formes originales non décrites chez *A. bivacuolata*. Nous avons également pu mettre en évidence la présence d'une succession de bandes dans le macronoyau des *A. mediovacuolata* de petite taille.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

PRÉLÈVEMENT ET DISSECTION DES VERS

Des annélides oligochètes Glossoscolecidae du genre *Alma* ont été récoltés sur les berges de la rivière Sanaga à Ebebda, à 60 km au nord de Yaoundé (Cameroun), et dans les parties émergées du cours d'eau Anga'a à Nkolbikogo, à environ 8 km au S-SW de Yaoundé. Deux espèces ont été échantillonnées. *A. nilotica* dont les spécimens mesurent en moyenne 18 cm de long et pèsent 1,38 g et *A. emini*, 31 cm et 2,8 g. La récolte a été réalisée par des saignées profondes et rapides dans le sol, à proximité des tortillas. Les vers ont été récoltés, puis identifiés selon les clés d'Omodéo, 1958 et conservés dans la terre humide pendant une semaine maximum pour éviter la défaunation. Soixante individus par espèce sont disséqués en distinguant les trois segments du tube digestif antérieur

* Laboratoire de Biologie Générale, Université de Yaoundé I, Faculté des Sciences, BP 812, Yaoundé, Cameroun.

** Clermont Université, Université Blaise Pascal, LMGE, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand.

*** CNRS, UMR6023, BP 80026, F-63171 Aubière Cedex.

Correspondance : Paul Alain Nana

Tel.: +237 74727421 / +237 99441503 / +237 99846269

E-mail : nanapaul4life@yahoo.fr

(prostomium), moyen et postérieur (pygidium). Chaque portion est séparée en trois fragments (proximal, moyen et distal). Les fragments obtenus sont vidés séparément dans une boîte de pétri contenant du liquide physiologique de Ringer ou de l'eau minérale du commerce Supermont (Bicarbonate HCO_3^- 128,0mg/L, Chlorure Cl^- 2,1 mg/L ; Sulfate SO_4^{2-} 1,0 mg/L ; Nitrate NO_3^- 4,1 mg/L ; Calcium Ca^{++} 16,0 mg/L ; Magnésium mg^{++} 10,2 mg/L ; Potassium K^+ 5,2 mg/L et Sodium Na^+ 12,7 mg/L).

IDENTIFICATION DES CILIÉS ASTOMES

Les ciliés ont été identifiés sur le vivant sous la loupe binoculaire Wild M5 suivant les clés de de Puytorac & Dragesco 1968 et de Ngassam, 1983. En dehors de leur forme (ovoïde ou arrondie), le trait saillant de leur morphologie est le nombre et la disposition des vacuoles pulsatiles.

TRAITEMENT ET COLORATION DES NOYAUX

Les ciliés triés à la main ont été fixés en saïère par du paraformaldéhyde 4 % en tampon PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 8 mM KH_2PO_4 2 mM, pH = 7.4) pendant 1 h. Après deux lavages au PBS, les cellules sont incubées dans du PBS plus DAPI à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 15 min. Après un dernier lavage en PBS, les cellules sont montées entre lame et lamelle en PBS-Glycerol-DABCO (1 % DABCO dans 90 % glycerol, PBS) selon Johnson *et al.* (1982). Les lames sont ensuite stockées à 4 °C au noir. Les cellules sont observées sur un microscope à fluorescence (Leica) avec un filtre d'émission bleu.

Les noyaux ont également été colorés par la méthode de Feulgen (Blanc, 1965). Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique (microscope Wild M20) et les schémas réalisés à partir d'une chambre claire. Les mensurations ont été effectuées d'après les dessins réalisés.

RESULTATS & DISCUSSION

CARACTÉRISTIQUES DES CILIÉS

A. bivacuolata possède toujours deux vacuoles, situées chacune entre les branches du macronoyau. On peut trouver trois types cellulaires selon la taille (petit **p** \approx 270 μm , moyen **m** \approx 400 μm et grand **g** \approx 500 μm). Les ciliés *A. mediovacuolata* présentent également trois types de taille (petit **P** \approx 260 μm , moyen **M** \approx 370 μm et grand **G** \approx 785 μm) et se caractérisent par une rangée axiale de vacuoles pulsatiles (7 à 10) disposées entre les deux branches verticales du macronoyau.

L'APPAREIL NUCLÉAIRE CHEZ *A. BIVACUOLATA*

Le macronoyau est en forme de chromosome avec deux branches qui ressemblent à des chromatides réunies au niveau d'un centromère (figure 1). Cette forme de chromosome varie cependant du X au H (figures 1 a-d). La forme en "X" (de Puytorac & Dragesco, 1968), parfois fortement pourvue d'excroissances et de digitations, est caractéristique des cellules de grande taille (**Xg**). La forme en "H" porte sur ses branches de très nombreuses excroissances. Cette forme est caractéristique des cellules petites et moyennes, "**Hp**" et "**Hm**" (Figures 1 c-d). Il existe également une forme intermédiaire entre le macronoyau en "H" et en "X" (figure 1 b) avec deux U unis à leur base par un pont. La figure 2 présente les formes en "X" (figure 2 a) et en "H" (figure 2 b) de ces noyaux et de part et d'autre deux vacuoles pulsatiles, ainsi que les excroissances et les digitations des macronoyaux. Les *A. bivacuolata* ont toujours été considérés comme possédant uniquement des macronoyaux en X (de Puytorac & Dragesco, 1968).

Avant la division, le macronoyau se condense en masse ovoïde. Après la division, il reprend progressivement la forme en "H" très festonnée et irrégulière. Les

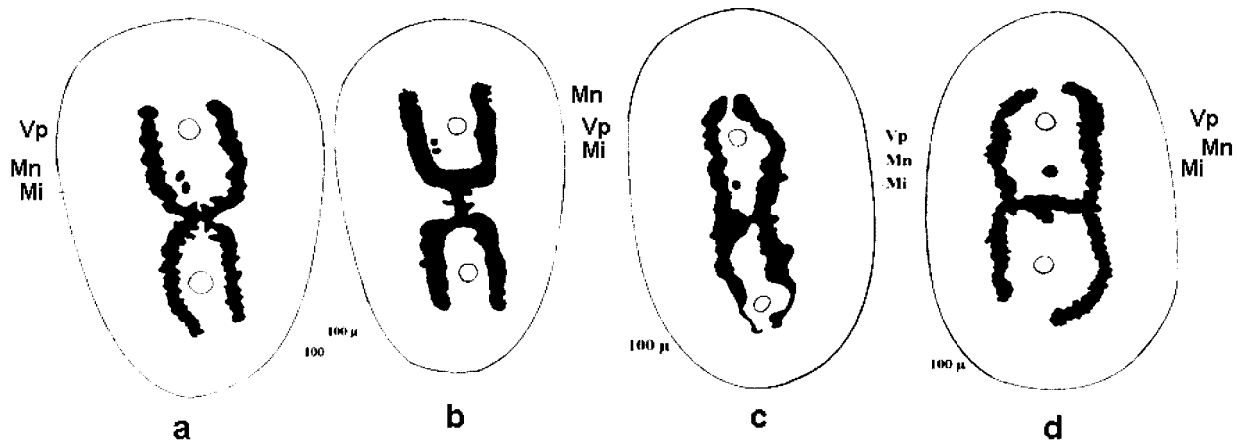


Fig. 1. – Variations morphologiques de l'appareil nucléaire chez *Almophrya bivacuolata*.

Vp : vacuole pulsatile ; **Mn** : macronoyau ; **Mi** : micronoyau ; **a** : macronoyau en "X" et deux micronoyaux ; **b** : macronoyau de forme transitoire entre "X" et "H" et deux micronoyaux ; **c** et **d** : macronoyau en "H" et un micronoyau.

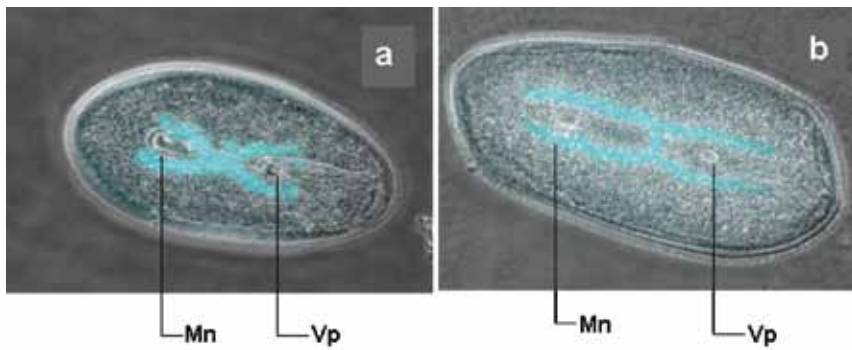


Fig 2. – Photographie de l'appareil nucléaire d'*Almophrya bivacuolata*, mettant en évidence les excroissances et les digitations. Superposition d'images prises en contraste de phase et en microscopie à fluorescence après coloration au DAPI (bleu). **a** : macronoyau en forme de "X"; **b** : macronoyau en forme de "H".
Mn : macronoyau ; **Vp** : vacuole pulsatile.

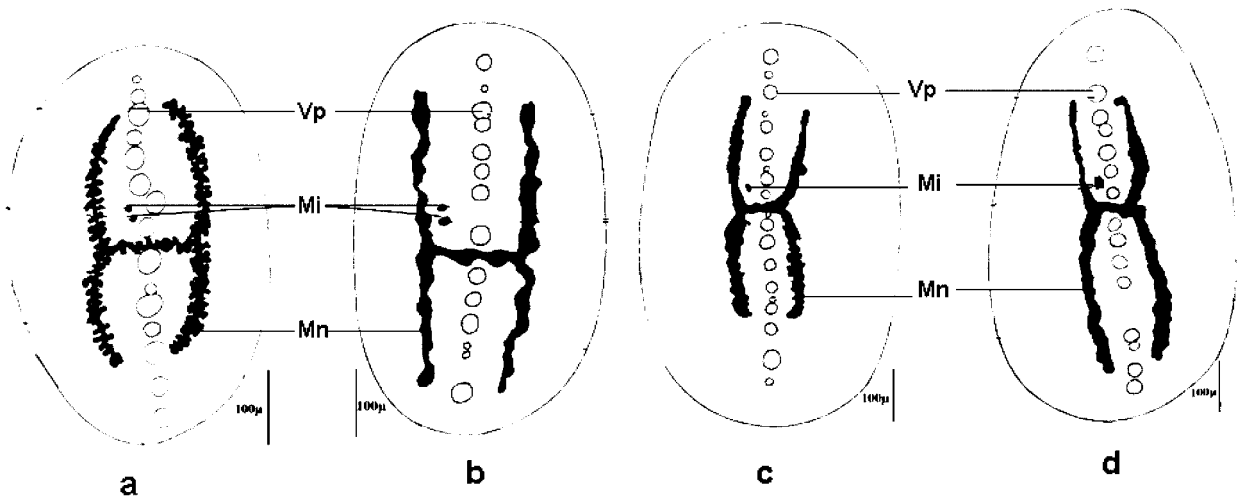


Fig 3. - Variations morphologiques de l'appareil nucléaire d'*Almophrya mediovacuolata* dans les cellules classées par ordre de taille. **a** : macronoyau en "H" très dentelé, à aspect empilé, et deux micronoyaux ; **b** : macronoyau en "H" moins dentelé et deux micronoyaux ; **c** : macronoyau en "H" peu dentelé et un micronoyau ; **d** : macronoyau en "H" non dentelé et un micronoyau.

Vp : vacuole pulsatile ; **Mn** : macronoyau ; **Mi** : micronoyau.

extrémités des branches latérales tendent à se rejoindre pour emprisonner la vacuole pulsatile. Situé entre les branches supérieures du macronoyau, le micronoyau ovoïde est unique chez les cellules Hm et Hp (Dupuy-Blanc & Ngassam, 1983).

L'APPAREIL NUCLÉAIRE CHEZ *A. MEDIOVACUOLATA*

Le macronoyau prend généralement l'aspect du "H" quelle que soit la taille des cellules (figure 3) ; les branches sont plus dentelées chez les cellules de petite taille (figure 3 a) que chez celles ayant une taille moyenne à grande (figures 3 b-d). Bien que généralement en forme de "H" (figure 4 a), quelques formes en "X" ont été trouvées (figure 4 b) dans ces macronoyaux. Les figures 4 c et d montrent les striations du macronoyau dues à l'alternance de bandes. Ces bandes étant facilement reconnaissables par leur épaisseur et leur espacement différent, leur comptage nous a permis de dénombrer une moyenne de 138 bandes.

Le micronoyau, unique ou double, arrondi ou ovoïde, se localise sur la partie supérieure de la branche transversale du macronoyau et varie de 7 à 25 μm de diamètre (figure 4).

CONCLUSION

Les formes en "H" et intermédiaires entre "H" et "X" du macronoyau, mises en évidence chez *Almophrya bivacuolata*, infirment l'hypothèse de Puytorac & Dragesco (1968) selon laquelle le macronoyau d'*A. bivacuolata* prend toujours l'aspect d'un "X". Chez *A. bivacuolata*, les cellules Xg diffèrent de Hp et Hm non seulement par la taille du macronoyau (à peu près le double de celle des Hp) et sa forme en "X", mais aussi par l'existence de deux micronoyaux. Cette grande diversité de formes de l'appareil nucléaire, témoignerait d'une forte diversité au sein de cette espèce. Rappelons (Dupuy Blanc & Ngassam, 1983) que les teneurs en ADN

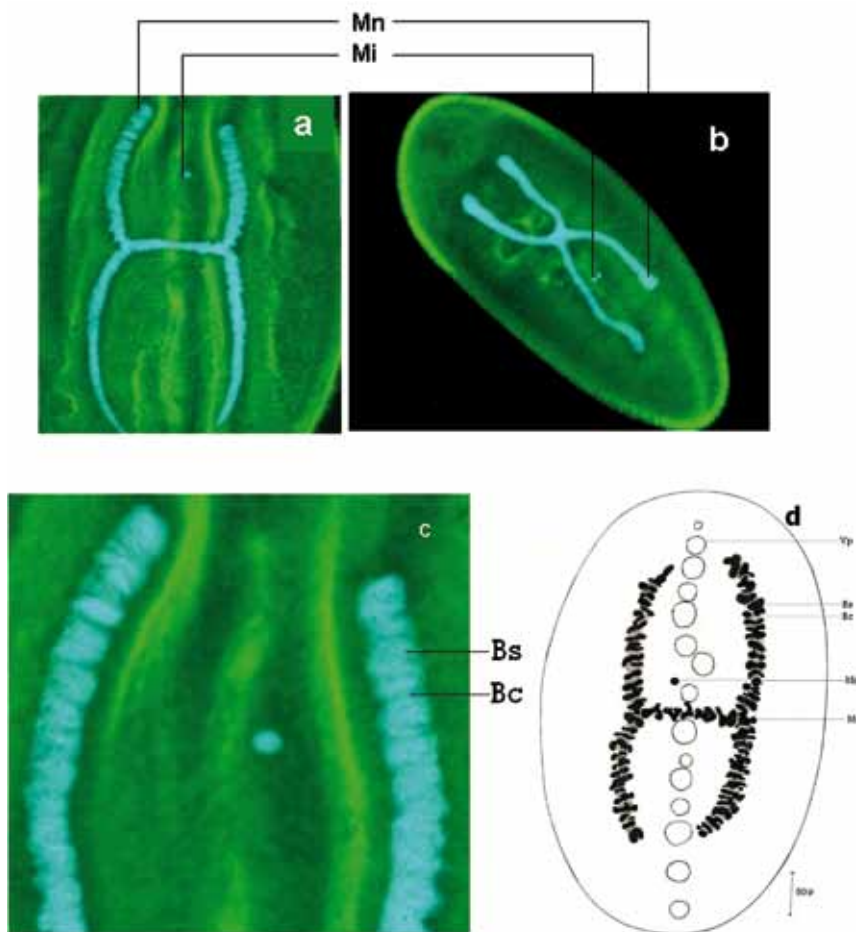


Fig. 4. – Appareil nucléaire d'*Almophrya mediovacuolata*. Superposition d'images prises en microscopie à fluorescence après marquage du noyau par le DAPI. **a** et **d** : macronoyau en "H" à aspect empilé ; **b** : macronoyau en forme de "X"; **c** : partie du macronoyau en "H" montrant les distributions distinctes d'une alternance de bandes sombres et de bandes claires (interbandes) dans les cellules Pm.

Bs : bande sombre ; **Bc** : bande claire ; **Mi** : micronoyau ; **Mn** : macronoyau ; **Vp** : vacuole pulsatile.

micronucléaire des trois populations (Hp, Hm, Xg) sont dans un rapport 1 : 2 : 3, ce qui indiquerait une polyploïdisation des micronoyaux. Les teneurs en ADN macronucléaire sont dans un rapport 1 : 3 : 8.

Les populations d'*Almophrya mediovacuolata* présentent généralement un macronoyau en forme de "H" ; elles diffèrent entre elles non seulement par l'aspect peu ou pas dentelé de leur macronoyau, mais également par le nombre de micronoyaux (un ou deux). En effet, les cellules Mm et Gm1 sont uni-micronucléées alors que les formes Pm et Gm2 sont bi-micronucléées. Les macronoyaux des formes Pm présentent une digitation contrairement à celles des formes Mm, Gm1 et Gm2 non digitées. Il est probable que l'alternance des bandes soit une particularité du macronoyau en forme de "H" des *A. mediovacuolata* de petite taille, structure inédite de macronoyau traduisant un remaniement chromatinien persistant durant l'interphase et dénué de tout processus sexuel. Ces bandes sombres pourraient représenter des régions de forte concentration de la chromatine. Elles apparaissent dans le macronoyau interphasique d'*A. mediovacuolata* et évoquent les structures des chromosomes polytènes observées lors de l'édification du

macronoyau des Hypotriches (Murti & Prescott, 1999). Les différences de structure entre le macronoyau en masse, lors de la division cellulaire, et le macronoyau en bandes en interphase sont l'indice d'une réorganisation de la chromatine avec processus de polyténisation permanent.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Laurent Palka pour sa relecture éclairée et efficace.

REFERENCES

- BLANC J. Étude cytophotométrique des périodes de duplication de l'AND dans l'appareil nucléaire de *Paramecium caudatum*. *Protistologica*, 1965, 1, 11-15.
- DUPY BLANC J. & NGASSAM P. Observation sur les teneurs en ADN nucléaire de populations de ciliés Astomes du genre *Almophrya* parasitant le même hôte. *Protistologica*, 1983, 19, 385-392.

- DUPY BLANC J. & NGASSAM P. Biometric study and determination of the nuclear DNA contents in populations of Astome ciliates of the type *Almophrya mediovacuolata* Ngassam, 1983. *Arch. Protistenkd*, 1986, 132, 23-33.
- FERNANDEZ-GALIANO D. Une nouvelle méthode pour la mise en évidence de l'infraciliature des ciliés. *Protistology*, 1966, 2, 35-38.
- FOKAM Z. Contribution à la connaissance des Ciliés Astomes endocommensaux d'Annélides Oligochètes terricoles du Sud-Ouest du Cameroun : systématique et biodiversité. Thèse de Doctorat 3^e cycle, Université de Yaoundé, Cameroun, 2005, 205 p.
- JOHNSON G.D., DAVIDSON R.S., MCNAMEE K.C., RUSSELL G., GOODWIN D. & HOLBOROW E.J. Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy. *Journal of Immunological Methods*, 1982, 55 (2), 231-242
- MURTI K.G. & PRESCOTT D.M. Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96 (25), 14436-14439.
- NGASSAM P. Contribution à l'étude des ciliés Astomes et des ciliés Hétérotriches endocommensaux d'oligochètes terricoles de la région de Yaoundé. Mémoire de Master's degree. Université de Yaoundé, Cameroun, 1980, 83 p.
- NGASSAM P. Trois espèces nouvelles de ciliés Astomes des genres : *Almophrya* de Puytorac et Dragesco, 1968, *Mau-pasella* Cépède, 1910, *Njinella* nov. genre, endocommensaux d'Annélides oligochètes de la région de Yaoundé. *Protistologica*, 1983, 19 (1), 131-135.
- NGASSAM P., FOKAM Z., GANGOUÉ P.J. & MOTCHEBE N.G.M. Complément à la connaissance de deux ciliés Astomes endocommensaux d'Oligochètes terricoles de la région de Yaoundé. *Cameroun Journal Biologique et Biochimique Science*, 1998, 8 (1), 17-30.
- OMODEO P. (1958) Oligochetes, *in*: La réserve naturelle intégrale du Mont Nimba. *Mémoires de l'Institut Français d'Afrique Noire, Douala*, 1958, 53, 9-109.
- PUYTORAC P. DE. Les ciliés Astomes Hoplitophryidae. I. Description de nouvelles espèces. *Protistologica*, 1969, 5 (2), 255-268
- PUYTORAC P. DE & DRAGESCO J. Quatre espèces nouvelles de ciliés Astomes chez les *Alma emini* (Mchlsn) (Ver *Criodri-linae*) du Gabon. *Annales de la Station Biologique de Besse-en-chandesse*, 1968, 3, 259-266.
- PUYTORAC P. DE & DRAGESCO J. Description de six genres nouveaux de Ciliés Astomes Hoplitophryidae endoparasites de vers Glossoscolecidae au Gabon. *Biologie Gabon*, 1969, 5 (1), 5-27.
- WILLIAMSON D.H. & FENNELL D.J. *In*: Methods in Cell Biology. Prescott D.M. (ed.), Academic Press, New York, 1975, Vol. XII, 335-351.

Reçu le 1^{er} mars 2010
 Accepté le 14 juillet 2010