

Biologie du développement et de la reproduction / Developmental and reproduction biology

Caractérisation ultrastructurale des stades ovariens de l'abeille ouvrière mellifère, *Apis mellifera mellifera* Linné (Hymenoptera, Apidae)

Mohamed Koudjil^{a,*}, Salah Eddine Doumandji^b

^a *Université Hassiba-Benbouali, faculté des sciences agronomiques et des sciences biologiques, département d'agronomie, B.P. 151, Chlef, Algérie*

^b *Institut national agronomique, département de zoologie agricole et forestière, Hacén Badi, El-Harrach, Alger, Algérie*

Reçu le 12 mai 2007 ; accepté après révision le 2 janvier 2008

Présenté par Pierre Buser

Résumé

La classification des stades ovariens demeure encore imprécise. L'ultrastructure du follicule basal a permis de résoudre ce problème. Du sixième au huitième jour de la vie adulte de l'abeille ouvrière, la longueur de l'ovariole ne dépasse guère 2 mm. Les ovocytes basaux des stades 1 et 2 se caractérisent par la présence de nombreuses plages de granules cernées par les cylindres dilatés du réticulum endoplasmique granulaire. Ces cylindres décondensent les granules protéiques et les globules lipidiques, générant ainsi des corps multivésiculaires. L'ovocyte basal, au troisième stade de développement, mesure $0,35 \pm 0,05$ mm de long. Ce stade de la fin prévitellogénèse se caractérise par l'apparition, dans l'ooplasm, de nombreux tubules, dont l'extrémité dilatée constitue un lysosome. Dès le début de la deuxième semaine, la vitellogénèse commence. Le stade 4 est défini par l'apparition, dans l'ooplasm, des granules vitellins en relation avec les formations tubulaires. Au bout de 14 à 16 jours de la vie adulte, $25 \pm 7,1\%$ des abeilles ouvrières atteignent la fin de la vitellogénèse, ou stade 5. L'ovariole, d'environ 7 mm de long, comporte 11 follicules. Ce stade 5 est distingué par la synthèse de la membrane vitelline, la régression de la taille des granules vitellins et des noyaux accessoires. Le sixième stade, ou maturation ovocytaire, est atteint chez $12,5 \pm 3,5\%$ des ouvrières âgées entre 18 et 20 jours. Il est défini par la présence du chorion, la dissolution des granules vitellins, la disparition des noyaux accessoires et la dégénérescence totale des cellules folliculaires. *Pour citer cet article : M. Koudjil, S.E. Doumandji, C. R. Biologies 331 (2008).*

© 2008 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Ultrastructural characterization of the ovarian stages of the worker bee, *Apis mellifera mellifera* Linné (Hymenoptera, Apidae). The classification of the ovarian stages remains still vague. The ultrastructure of the basal follicle made it possible to solve this problem. From the sixth to the eighth day of the worker bee's adult life, the length of the ovariole hardly exceeds 2 mm. The basal oocytes of stages 1 and 2 are characterized by the presence of many ranges of granules encircled by the dilated cylinders of the granular endoplasmic reticulum. These cylinders decondensate the proteinic granules and the lipidic globules generating multivesicular bodies. The basal oocyte, at the third stage of development, measures 0.35 ± 0.05 mm in length. This stage of the previtellogenesis' end is characterized by the appearance, in the ooplasm, of many tubules, whose dilated end constitutes a

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : kjlmhmed@yahoo.fr (M. Koudjil).

lysosome. At the beginning of the second week, vitellogenesis starts. Stage 4 is defined by the appearance, in the ooplasm, of the yellow granules in relationship to the tubular formations. At the 14th to 16th days of the adult life, $25 \pm 7.1\%$ of the worker bees reach the end vitellogenesis, or stage 5. The ovariole, about 7 mm in length, contains 11 follicles. This stage 5 is distinguished by the synthesis from the vitelline membrane, the regression of the size of yellow granules and the accessory cores. The sixth stage or oocyte maturation is reached by $12.5 \pm 3.5\%$ of the workers aged 18 to 20 days. It is defined by the presence of the chorion, the dissolution of the yellow granules, the disappearance of the accessory nuclei and the total degeneration of the follicular cells. **To cite this article: M. Koudjil, S.E. Doumandji, C. R. Biologies 331 (2008).**

© 2008 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots-clés : *Apis mellifera mellifera* ; Granule vitellin ; Ovocyte basal ; Stade ovarien ; Tubules

Keywords : *Apis mellifera mellifera*; Basal oocyte; Yellow granule; Ovarian stage; Tubules

Abridged English version

Considering the importance of the worker bee in the reproduction field, its ovary deserves to be well studied. We tried to solve the problem of the classification of the ovarian stages through the ultrastructure of the basal follicle. The bees incipient from the *Apis mellifera mellifera* were provided by the French National Institute of the Agronomic Research (INRA) of Bures-sur-Yvette, near Paris. Experiments were made at the Laboratory of Physiology of the Insects of the Pierre-and-Marie-Curie University, Paris-6. The bees were maintained in constant conditions of breeding: small cage of $6 \times 8 \times 10$ cm, temperature $32 \pm 1^\circ\text{C}$, relative humidity $75 \pm 5\%$, permanent food of *Candy* (honey + powder sugar + pollen) and water. Natural mortalities throughout breeding are lower than 10%. The workers were anaesthetized using CO_2 . The ovaries were dissected and fixed for 40 min at 4°C with 2% glutaraldehyde in a 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3. These ovaries were post-fixed with 1% osmium tetroxide in the same 0.1 M buffer during 60 min, dehydrated in a series of graded ethanol, and embedded in Epon 812. Sections were coloured with blue toluidine for light microscopy, for orientation. For electronic microscopy, thin sections were coloured with uranyl acetate and lead citrate. Thin sections were examined with a Philips 201 transmission electronic microscope.

The results reveal that the first basal follicle constitutes stage 1. This follicle is surrounded by a basal lamina of 1- μm thickness. The perioocytar follicular cells, well provided in mitochondria, pile up the oocyte, which is very rich in proteinic granules and lipidic globules osmiophiles (Fig. 1). In the ooplasm, the dilated cylinders of the rough endoplasmic reticulum (RER) surround entirely dense ranges of granules (Fig. 2) and decondensate proteinic granules and lipidic globules, thus forming multivesicular bodies (Fig. 3). The third basal follicle constitutes stage 2; its bunch of tropho-

cytes is twice as long as that of the oocyte. At the end of the previtellogenesis, or stage 3, the length of the bunch of trophocytes is higher, or merely equal to that of the oocyte. The basal lamina remains a little thicker and the follicular cells are quite deeper. In the cortex of the oocyte, the accessory cores are comparatively numerous (Fig. 4). The tubules generate at one end a multivesicular body, which becomes a lysosome (Fig. 5). In a zone of the ooplasm, the tubules are numerous. The lysosomes could mean the outline of future vitelline granules (Fig. 6). At the beginning of vitellogenesis, or stage 4, the length of the oocyte becomes higher than that of the bunch of trophocytes. The appearance of small vitelline granules contiguous to many tubules shows the beginning of vitellogenesis. The intercellular space between the oocyte and the follicular perioocytar cells becomes important. A dense hemolymphatic material settles on the external face of the plasmic membrane of the oocyte (1); then a covered well is formed (2), which generates a pinocytosis vesicle (3) that separates (4) and integrates in the young vitelline granule (5) (Fig. 7). The apical pole of the follicular cells is enriched with mitochondria and reinforced with dictyosomes of the Golgi complex and of RER fragments. The core equipped with nucleoles is bulky. The glycogen is important (Fig. 8). At the end of the vitellogenesis, or stage 5, the saturation of the ooplasm by the vitelline granules and the appearance of the vitelline membrane characterize essentially this phase; the lipidic globules are semi-osmiophiles (Fig. 9). In certain zones of the ooplasm, the vitelline granules and accessory cores are contiguous to the secretion vesicles. The lipidic globules in full being not osmiophiles, they are thus only equipped with saturated lipids (Fig. 10). The basal lamina is reduced to the tenth of its initial thickness. The follicular cells of many lysosomic vesicles are contiguous to the external nuclear membrane and to the cylinders of the RER. The secretion vesicles are accompanied by fragments of RER to the plasmic mem-

brane (Fig. 11). The ends of the parallel spans of the RER and the mitochondria are transformed into lysosomes: myelinic bodies and large lysosomic vesicles (Fig. 12). In the apical pole of the follicular cells, the dense granules, attacked by lysosomic vesicles, generate microvesicles of secretion 160 to 330 Å in diameter, which are contiguous to the plasmic membrane of the oocyte. The intercellular space between the follicular cells and the oocyte is very important. In the cortex of the oocyte, the vesicles of pinocytoses and the glycogen can constitute the glycoproteic reserve of the oocyte and the synthesis equipment of the vitellin envelopes (Fig. 13). The microvillar labyrinths of the oocyte are occupied by vesicles of endocytose containing glycogen grains (Fig. 14). The end of the maturation of the oocyte, or stage 6, is marked by the dissolution of the vitelline granules and the appearance of tubules (Fig. 15). The vitelline reserve appears, finally, in the form of fragments of microfilament and glycoproteic granules. The reduced microvilli of the oocyte are inserted in the very fine vitelline membrane. The chorion is composed of an endochorion and an exochorion (Fig. 16). The follicular cells in degeneration present very circonvolitional plasmic membranes, strongly dilated cylinders of RER, and numerous lysosomes (Fig. 17).

1. Introduction

Les abeilles ouvrières, jusqu'ici négligées, forment un domaine de recherches intéressant pour l'ovaire. Influencées par la présence de la reine et du couvain, ces ouvrières restent stériles. Néanmoins, chez certaines abeilles, les ovaires se développent jusqu'à la ponte des œufs. Ces ovaires sont de type méroïstique polytrophique. Le follicule comporte un ovocyte accompagné de 47 trophocytes et une assise de cellules folliculaires qui enveloppent l'ensemble ovocyte-trophocytes [1,2]. À l'éclosion, l'ouvrière adulte comporte 2 à 20 ovarioles par ovaire, alors que la reine en compte 160 à 180 par ovaire [3,4]. L'inhibition ovarienne est maintenue par la phéromone mandibulaire de la reine [5] et la phéromone de couvain [6–9]. L'absence de contact avec ces deux types de phéromones pourrait entraîner un développement précoce des abeilles [10,11]. Ainsi, 72% des ouvrières développent leurs ovaires [12]. Le cycle de développement ovarien dépend de l'âge de l'ouvrière. Il consiste en des stades de développement complet et parfois de régression et de dégénérescence finale.

La classification des stades ovariens est abordée par appréciation de la taille et l'observation de la forme de l'ovaire [1,13,14], la forme des œufs des abeilles ou-

vrières [3] et l'évolution du volume de l'ovocyte chez la reine *Apis mellifica* [15]. Cette classification reste imprécise, voire même ambiguë dans certaines phases critiques du développement. C'est la raison pour laquelle nous avons été amenés à étudier l'ultrastructure de l'ovaire de l'abeille mellifère de l'Europe occidentale, *Apis mellifera mellifera*, pour mieux définir les stades évolutifs. De plus, une description cytologique plus complète et plus approfondie de l'ovaire est nécessaire, en particulier chez *Apis*, pour laquelle il n'existe aucune donnée récente.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

Les abeilles naissantes de la race *Apis mellifera mellifera* ont été fournies par l'Institut national de la recherche agronomique (Inra) de Bures-sur-Yvette, Paris. Les expériences ont été menées au laboratoire de physiologie des insectes de l'université Pierre-et-Marie-Curie, Paris-6.

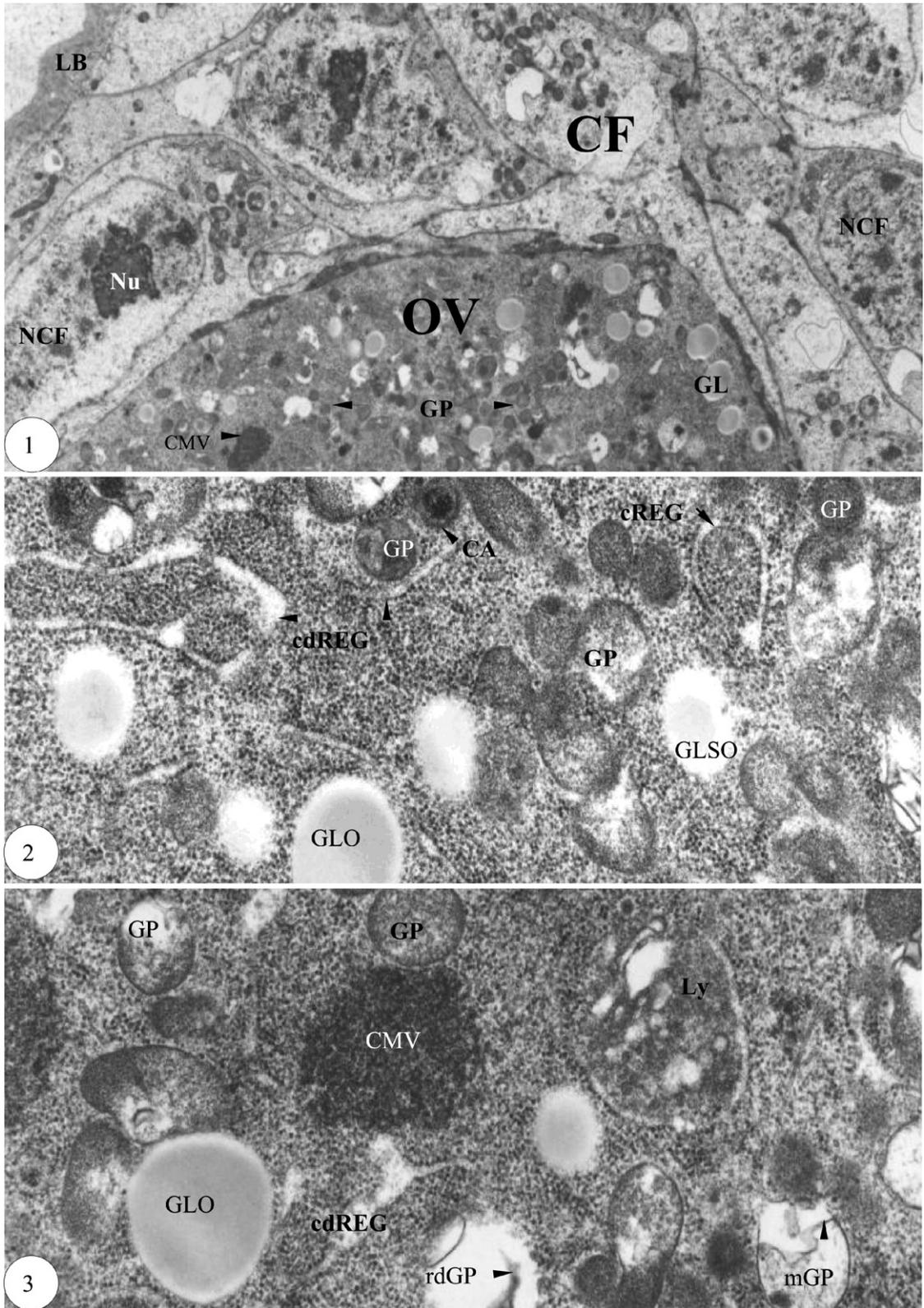
2.2. Élevage

Vingt-quatre heures après l'émergence, huit cagettes de 100 abeilles chacune sont maintenues en conditions constantes d'élevage : cagette de dimension 6 × 8 × 10 cm, température 32 ± 1 °C, humidité relative 75 ± 5%, nourriture permanente de *Candy* (miel + sucre glace + pollen) et de l'eau. L'élevage est effectué aux mois de mars et d'avril. Les mortalités naturelles pendant la durée d'élevage sont inférieures à 10%.

2.3. Microscopie optique et électronique

Les ouvrières sont anesthésiées au CO₂. Leurs ovaires sont fixés pendant 40 min à 4 °C avec 2% de glutaraldéhyde dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,3, additionné de 0,01% de chlorure de calcium. Ces pièces sont post-fixées avec 1% de tétr oxyde d'osmium dans le même tampon 0,1 M pendant 60 min, déshydratées progressivement dans l'éthanol de degré croissant et imprégnées dans l'Epon 812.

Pour les examens au microscope optique, les coupes sont colorées au bleu de toluidine. Les coupes ultra-fines sont colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb [16]. Ces coupes sont examinées à l'aide du microscope électronique Philips 201.



Figs. 1-3.

3. Résultats

3.1. Ovaire en début de la prévitellogenèse ou stades 1 et 2

Le premier follicule constitue le stade 1 dans la partie antérieure du vitellarium, dénommée zone de prévitellogenèse. Ce follicule est entouré d'une lame basale de 1 μm d'épaisseur. Les cellules folliculaires périovocytaires, bien pourvues en mitochondries, sont entassées au pôle apical de l'ovocyte, lequel est très riche en granules protéiques et globules lipidiques osmiophiles (Fig. 1). Dans l'ooplasm, les cylindres dilatés du réticulum endoplasmique granulaire cernent entièrement des plages de granules denses (Fig. 2) et décondensent des granules protéiques et des globules lipidiques, formant ainsi des corps multivésiculaires (Fig. 3). Les granules protéiques, limités par une membrane et décondensés, présentent parfois un corps dense résiduel d'aspect annulaire (Fig. 3). Le troisième follicule basal constitue le stade 2; sa grappe de trophocytes est deux fois plus longue que celle de l'ovocyte.

3.2. Ovaire en fin de la prévitellogenèse, ou stade 3

Au niveau du septième follicule basal, la longueur de la grappe de trophocytes est supérieure, ou approximativement égale, à celle de l'ovocyte. La lame basale demeure un peu moins épaisse et les cellules folliculaires sont assez profondes. Dans le cortex de l'ovocyte, les noyaux accessoires sont relativement nombreux (Fig. 4). Les tubules engendrent à l'une de leur extrémité un corps multivésiculaire, qui se résout en un lysosome (Fig. 5). Dans une zone de l'ooplasm, les tubules de 0,1 à 0,13 μm de largeur et de 1,3 μm de longueur sont nombreux. Les lysosomes pourraient signifier l'ébauche du futur granule vitellin (Fig. 6).

3.3. Ovaire en début de la vitellogenèse, ou stade 4

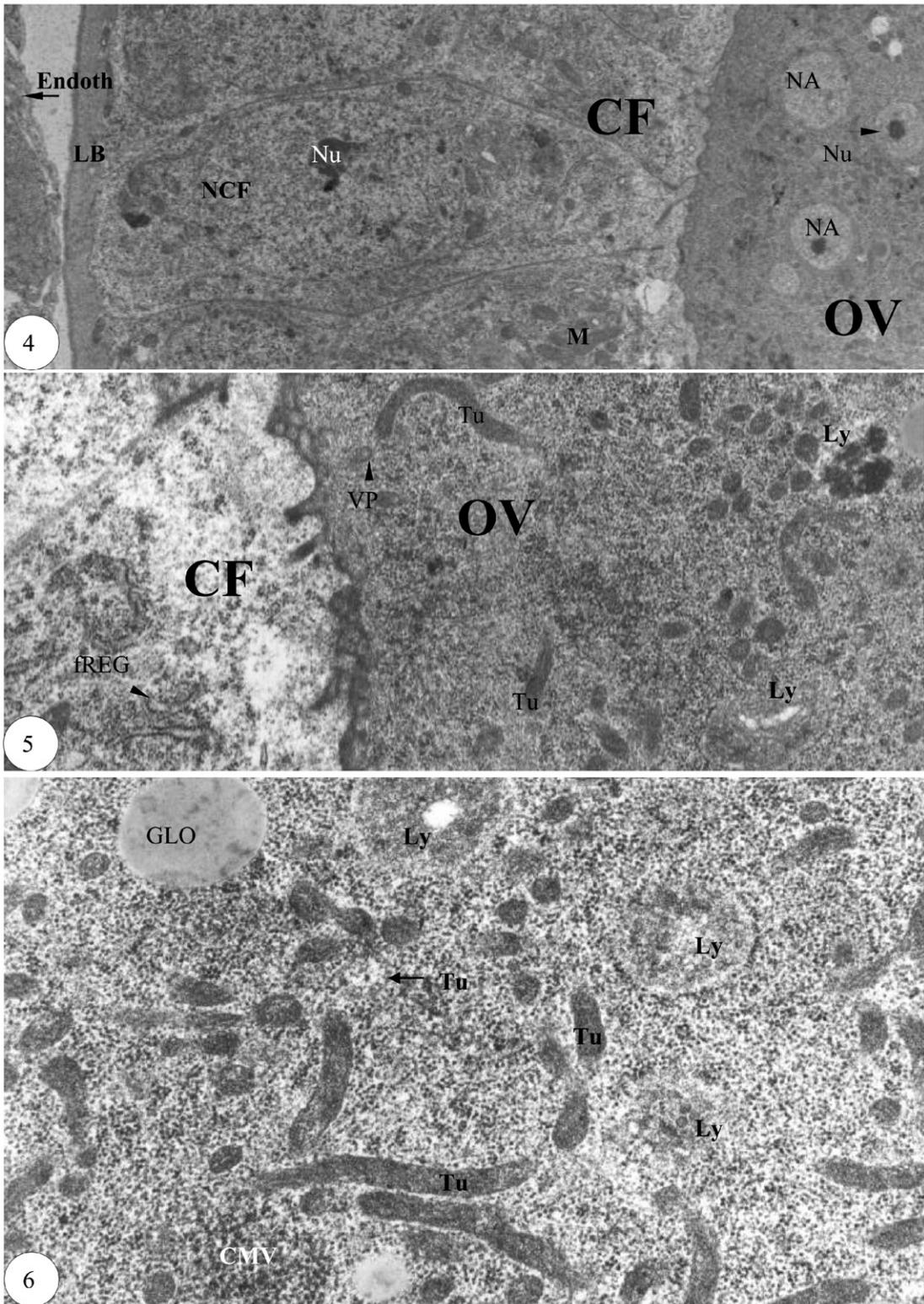
La longueur de l'ovocyte devient supérieure à celle de la grappe de trophocytes. L'apparition dans l'ooplasm de granules vitellins de 1 à 2 μm de diamètre caractérise le début de la vitellogenèse. De nombreux tubules de forme annulaire sont contigus aux granules vitellins. L'espace intercellulaire entre l'ovocyte et les cellules folliculaires périovocytaires devient important. Un matériel dense hémolympatique se dépose sur la face externe de la membrane plasmique de l'ovocyte (1), puis se forme un puits recouvert (2), qui engendre une vésicule de pinocytose liée à la face interne de la membrane plasmique (3); cette vésicule se détache (4) et s'intègre dans le jeune granule vitellin (5) (Fig. 7). Le pôle apical des cellules folliculaires est enrichi de mitochondries et renforcé de quelques dictyosomes de l'appareil de Golgi et de fragments de cylindres de REG. Le diamètre des ponts intercellulaires est de 0,3 μm en moyenne. Le noyau, pourvu de nucléoles, est volumineux. Le glycogène est important (Fig. 8).

3.4. Ovaire en fin de la vitellogenèse ou stade 5

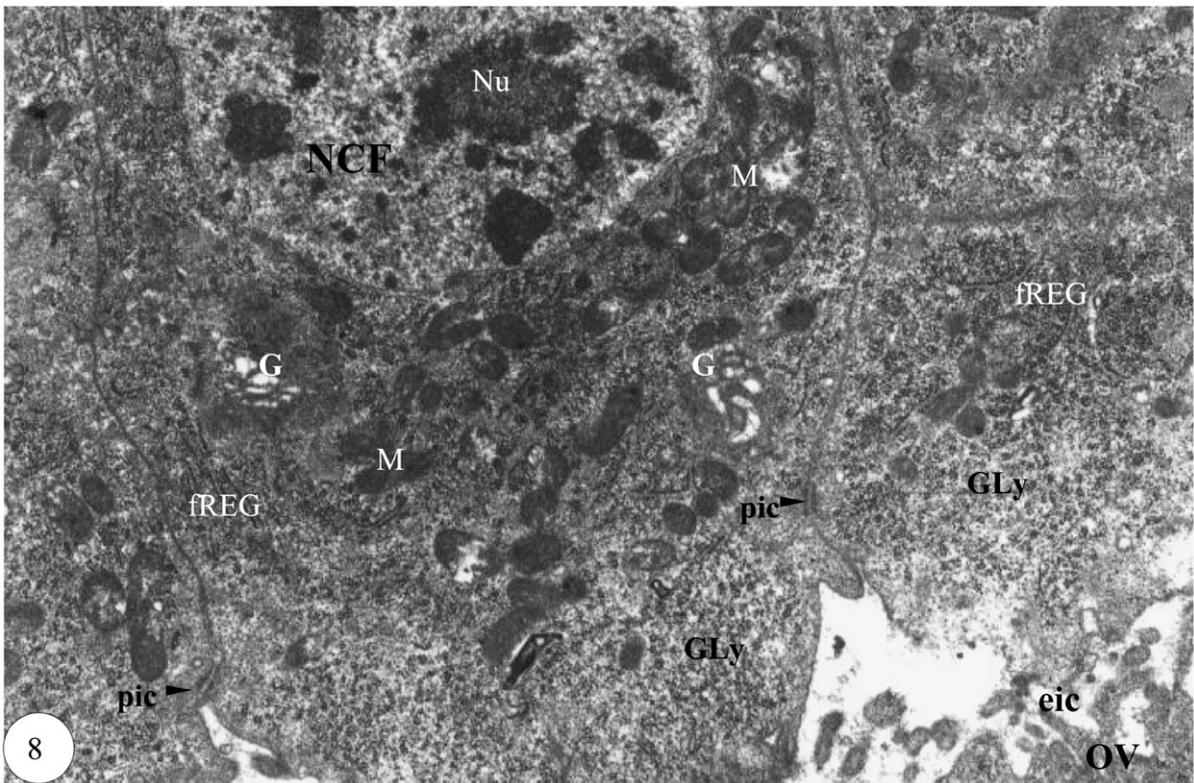
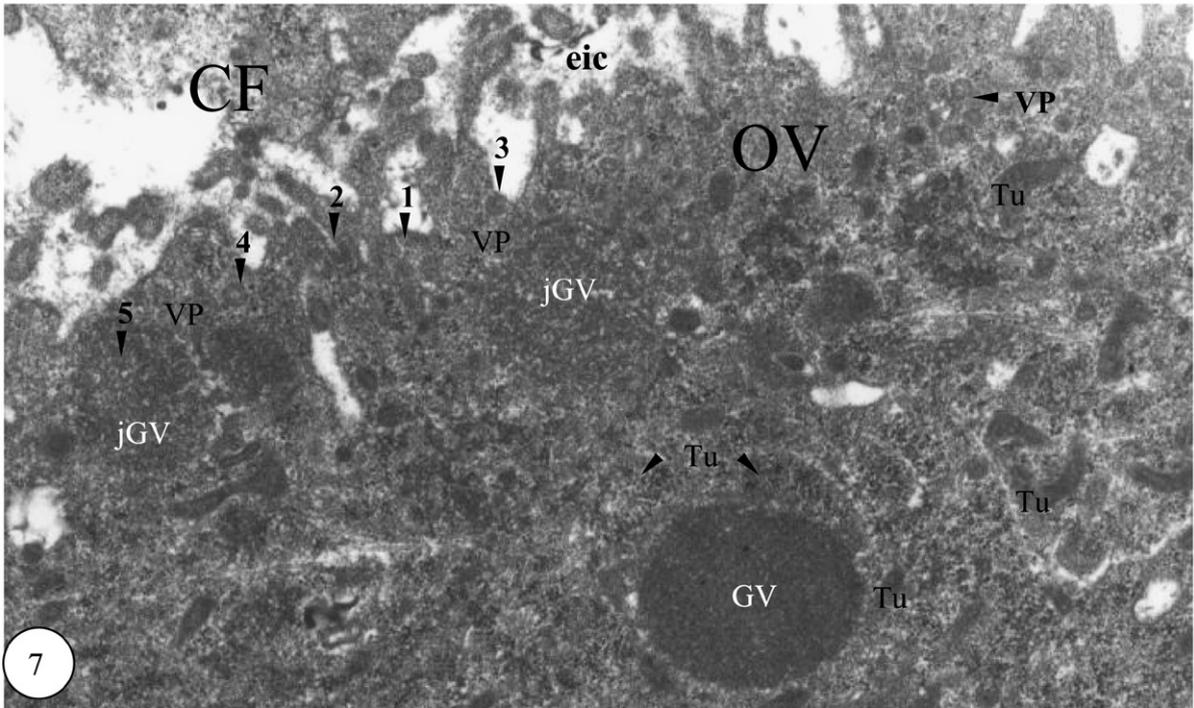
La saturation de l'ooplasm par les granules vitellins de 1 à 8 μm de diamètre et l'apparition de la membrane vitelline caractérisent essentiellement la fin de la vitellogenèse; les globules lipidiques sont semi-osmiophiles (Fig. 9). Dans certaines zones de l'ooplasm, les granules vitellins et les noyaux accessoires, en régression de volume, sont contigus aux vésicules de sécrétion de 0,03 à 0,08 μm de diamètre. Ces vésicules, synonymes de lysosomes, semblent attaquer ce matériel ooplasmique; les globules lipidiques sont totalement non osmiophiles, donc pourvus uniquement de lipides saturés (Fig. 10).

La lame basale est réduite au dixième de son épaisseur initiale. Les cellules folliculaires sont en pleine activité. Leur nucléoplasme est riche en matériel d'aspect ribosomique. De nombreuses vésicules lysosomiques sont contiguës à la membrane nucléaire externe et aux

Figs. 1–3. Début de la prévitellogenèse. (1) Zone du pôle apical ovocytaire enveloppée de cellules folliculaires ($\times 6000$). (2) Encerclement de plages de granules par le réticulum endoplasmique granulaire ($\times 30\,000$). (3) Contiguïté du réticulum endoplasmique granulaire avec les inclusions paraplasmiques ($\times 30\,000$). Légende : **AmpREG**, ampoule du réticulum endoplasmique granulaire; **CA**, corps annulaire; **CMy**, corps myélinique; **cREG**, cylindre du réticulum endoplasmique granulaire; **cdREG**, cylindre dilaté du réticulum endoplasmique granulaire; **CF**, cellule folliculaire; **CMV**, corps multivésiculaire; **etc**, espace intercellulaire; **EndoCH**, endochorion; **Endoth**, endothélium; **ExoCH**, exochorion; **fREG**, fragment du réticulum endoplasmique granulaire; **G**, appareil de Golgi; **gd**, granule dense; **GL**, globule lipidique; **GLNO**, globule lipidique non osmiophile; **GLO**, globule lipidique osmiophile; **GLSO**, globule lipidique semi osmiophile; **GLy**, glycogène; **GP**, granule protéique; **GV**, granule vitellin; **jGV**, jeune granule vitellin; **LB**, lame basale; **Ly**, lysosome; **M**, mitochondrie; **MCi**, membrane circonvolutionnée; **mf**, microfilament; **mGP**, membrane du granule protéique; **mv**, membrane vitelline; **MVO**, microvillosité ovocytaire; **NA**, noyau accessoire; **NCF**, noyau de la cellule folliculaire; **Nu**, nucléole; **OV**, ovocyte; **pic**, pont intercellulaire; **REG**, réticulum endoplasmique granulaire; **rdGP**, résidu dense du granule protéique; **rGLy**, rosette de glycogène; **Tu**, tubule; **VEndo**, vésicule d'endocytose; **VL**, vésicule lysosomique; **VP**, vésicule de pinocytose; **VS**, vésicule de sécrétion.



Figs. 4–6. Fin de la prévitellogenèse. (4) Cortex de l’ovocyte entouré de cellules folliculaires périovocytaires ($\times 6000$). (5) Détail du cortex de l’ovocyte et d’une cellule folliculaire périovocyttaire ($\times 20\,000$). (6) Détail des tubules d’une zone ovocyttaire ($\times 30\,000$). Légende : cf. Figs. 1–3.



Figs. 7, 8. Début de la vitellogenèse. (7) Formation des granules vitellins dans le cortex ovocytaire ($\times 20\,000$). (8) Partie apicale de quelques cellules folliculaires périovocytaires ($\times 14\,000$). Légende : cf. Figs. 1–3.

cylindres du réticulum endoplasmique granulaire. Les vésicules de sécrétion sont accompagnées par des fragments de REG jusqu'à la membrane plasmique. Les extrémités des travées parallèles du REG et les mitochondries sont transformées en lysosomes (Fig. 11).

Deux types de lysosomes peuvent être générés : les corps myéliniques et les grosses vésicules lysosomiques d'aspect clair contenant des microfilaments (Fig. 12).

Dans le pôle apical des cellules folliculaires, les granules denses sont de plus petite taille. Attaqués par des vésicules lysosomiques, ces granules engendrent des microvésicules de sécrétion de 160 à 330 Å de diamètre, lesquelles sont contiguës à la membrane plasmique du côté de l'ovocyte. L'espace intercellulaire entre les cellules folliculaire et l'ovocyte est très important. Dans le cortex de l'ovocyte, les vésicules de pinocytoses sont nombreuses, et le glycogène est présent. Ceci peut constituer la réserve glycoprotéique de l'ovocyte et le matériel de synthèse des enveloppes vitellines (Fig. 13). Les labyrinthes microvillositaires de l'ovocyte sont occupés par des vésicules d'endocytose contenant des grains de glycogène. Dans le cortex de l'ovocyte apparaissent des rosettes de glycogène et des vésicules de pinocytose d'aspect clair ou dense, de 0,07 à 0,13 µm de diamètre (Fig. 14).

3.5. Maturation de l'ovocyte ou stade 6

La fin de la maturation de l'ovocyte est marquée par la dissolution des granules vitellins et l'apparition de tubules (Fig. 15). Les granules qui persistent encore ont un diamètre de 0,1 à 0,4 µm. La réserve vitelline apparaît enfin, sous forme de fragments de microfilaments et de granules glycoprotéiques. La microvillosité réduite de l'ovocyte s'enfonce dans la membrane vitelline, très fine. Le chorion de 0,76 µm d'épaisseur est composé d'un endochorion et d'un exochorion (Fig. 16). Les cellules folliculaires en dégénérescence présentent des membranes plasmiques très circonvolutionnées, des cylindres de réticulum endoplasmique granulaire fortement dilatés et de nombreux lysosomes (Fig. 17).

4. Discussion

Pendant la maturation des ouvrières orphelines, période de prévitellogenèse, la croissance folliculaire demeure constante. C'est ainsi que l'ovaire est qualifié de stade I [1], de degré zéro ou rudimentaire [13] et presque inactif [3]. Le stade II est défini comme un niveau de développement de degré 1 [13] et de classe 2, puisque les ovocytes ont la forme de haricots et apparaissent entourés d'une couche claire [1,3]. Durant

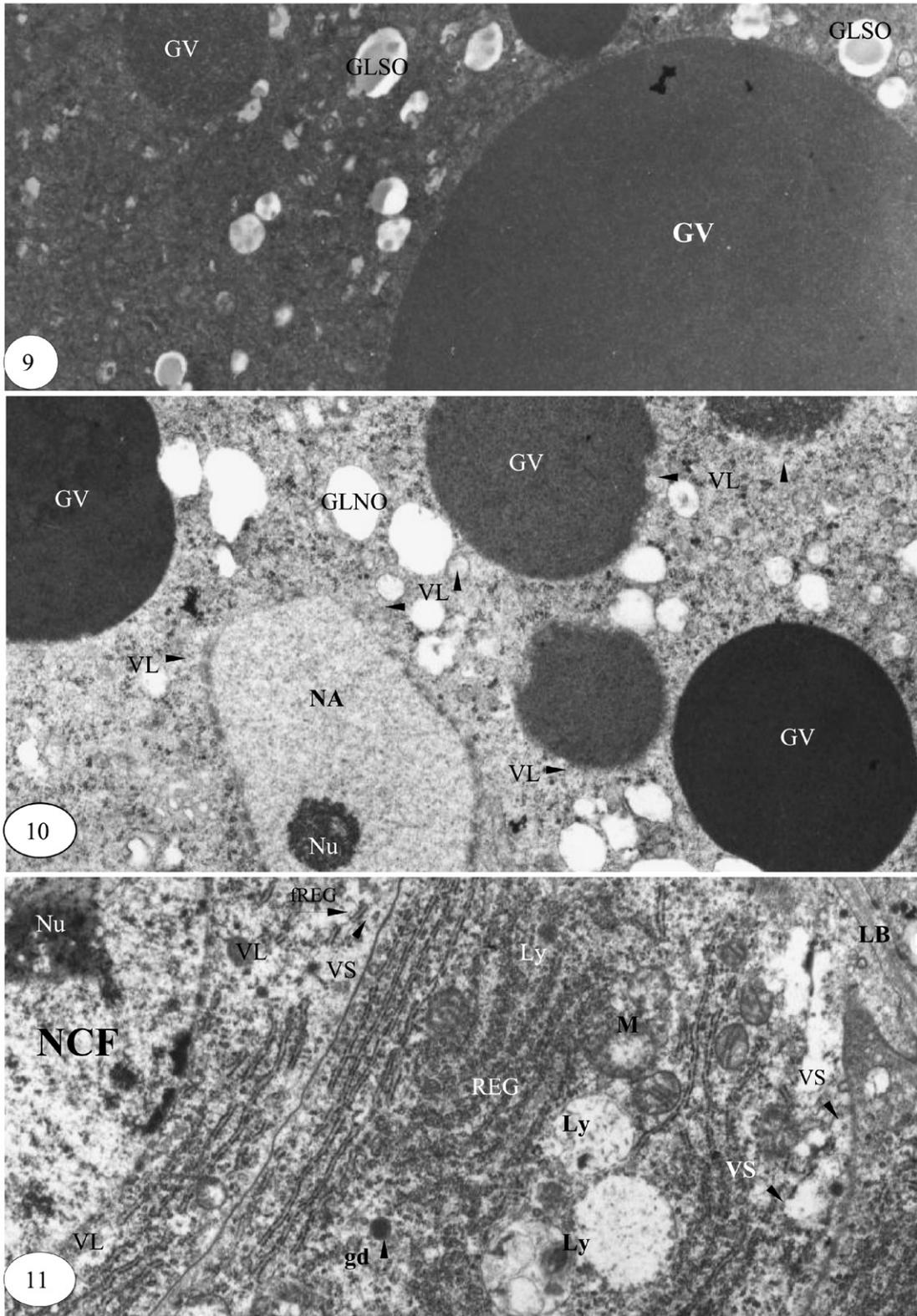
cette phase, les inclusions paraplasmiques figurées de l'ovocyte peuvent avoir une origine trophocytaire. En effet, chez *Apis*, les trophocytes produisent l'acide ribonucléique (ARN), les ribosomes, les mitochondries, les gouttelettes lipidiques et les vésicules, qui migrent vers l'ovocyte à travers les canaux circulaires [17]. Chez les insectes holométaboles (drosophile, hyménoptères), ce processus de migration se poursuit même pendant la vitellogenèse, avec le maintien des noyaux au centre des cellules nourricières par les éléments cytosquelettiques (filaments d'actine ou microtubules) [18]. Dans l'ovaire télotrophique, la migration des organites semble se produire principalement pendant la phase prévitellogénétique chez *Sialis mitsuhashii* [19].

Le stade III est qualifié d'ovaire appartenant à la classe 3, puisque les œufs ont la forme d'une saucisse [1] et sont plus allongés [3]. Les ovocytes, étant distincts, sont considérés de degré II [7].

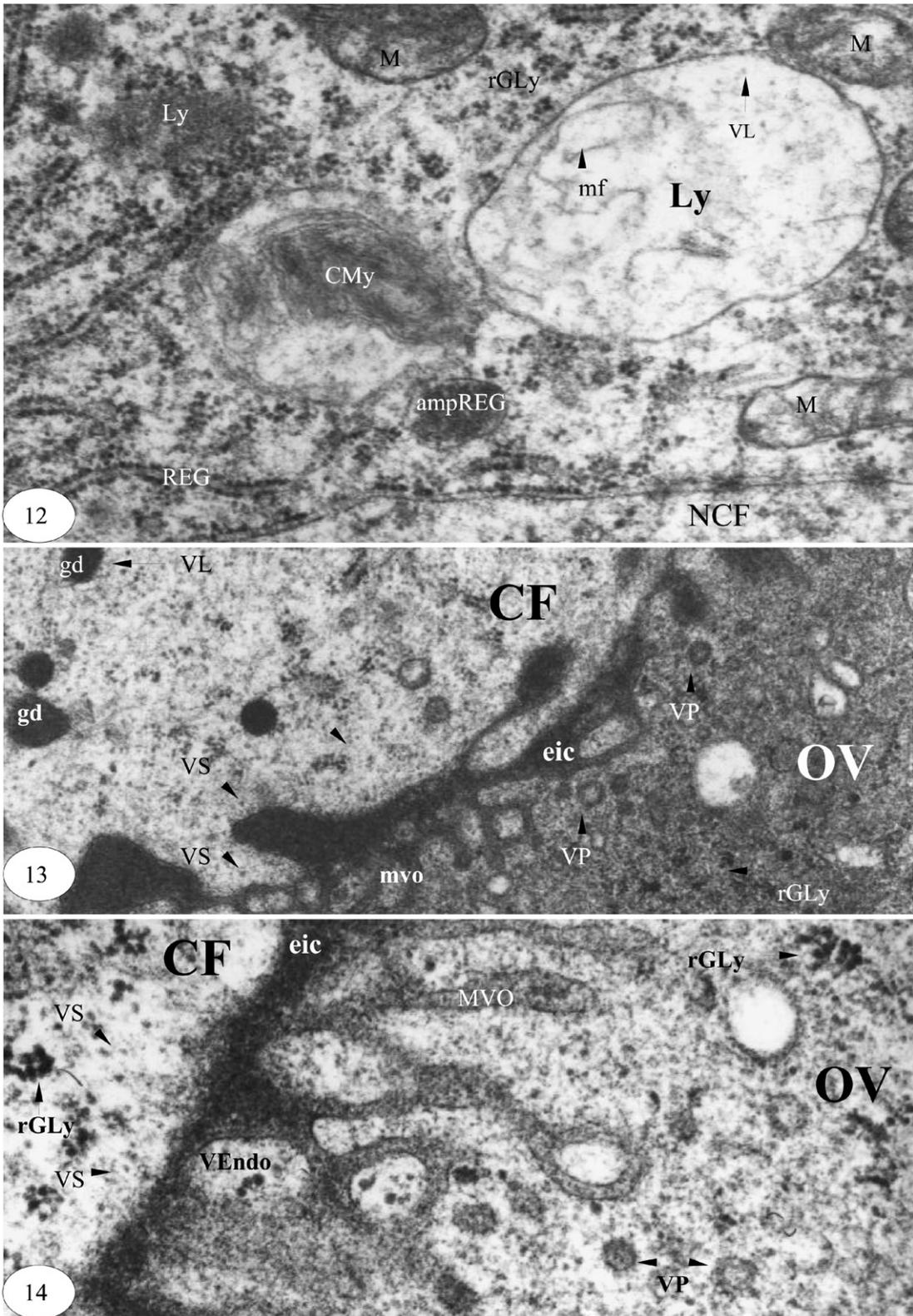
Vers la fin de la première semaine de l'âge adulte des ouvrières, la précision du stade III est si délicate, qu'une phase critique s'implique entre la maturation et le développement de l'abeille. Ainsi, l'apparition des tubules dans le cortex ovocytaire semble préciser la fin de la prévitellogenèse. Ces tubules interviennent dans la formation des granules vitellins. Ainsi, chez le Grillon, *Gryllus capitatus*, les polysaccharides hémolympatiques, sans doute liés à des protéines, pénètrent dans le cytoplasme de l'ovocyte à travers les vésicules de pinocytose qui déversent leur contenu dans des tubules. Ces tubules servent de voie de cheminement au matériel polysaccharidique qu'ils transfèrent aux granules vitellins en formation [20]. La présence de deux types de vésicules de pinocytose de différente taille semble conférer une spécialisation dans l'incorporation de matériaux hémolympatiques. La présence d'un résidu de matériel dense dans les granules protéiques révèle l'utilisation des réserves par le réticulum endoplasmique granulaire.

La réduction de la taille des granules protéiques et l'apparition de nombreux lysosomes peuvent être les indicateurs d'un engagement dans la vitellogenèse. Le processus vitellogénétique peut être initié quand la longueur de l'ovocyte atteint 30% de sa longueur finale [21]. Les trophocytes, très pauvres en réticulum endoplasmique et en appareil de Golgi, ne peuvent s'impliquer activement dans la synthèse vitelline [22,23].

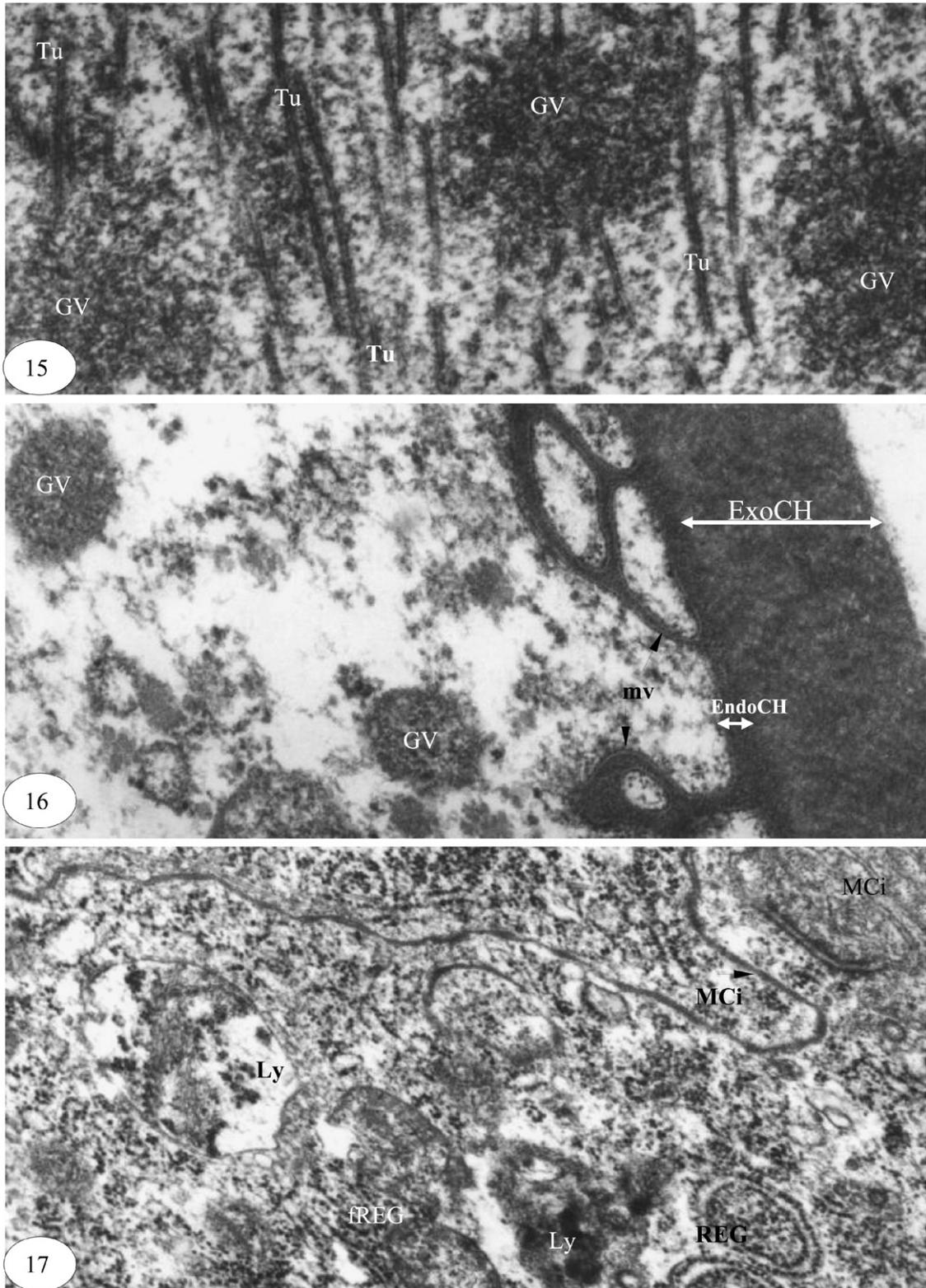
Durant la vitellogenèse, la dissolution des réserves lipoprotéiques, au début de cette phase, peut servir à la synthèse vitelline propre de l'ovocyte. Ainsi, chez la fourmi ouvrière *Formica ants*, l'accroissement des particules vitellines de l'ooplasme s'accomplit avec de nombreuses granules protéiques et gouttelettes lipidiques [23]. Le volume de l'ovocyte s'accroît rapi-



Figs. 9–11. Fin de la vitellogenèse. (9) Granules vitellins mûrs de taille maximale ($\times 14\,000$). (10) Granules vitellins et noyau accessoire en régression de taille ($\times 14\,000$). (11) Cellule folliculaire en phase de production de matériel de sécrétion ($\times 14\,000$).



Figs. 12–14. Fin de la vitellogenèse. (12) Lyse mitochondriale et lysosomes ($\times 40\,000$). (13) Sécritions d'une cellule folliculaire et pinocytose ovocytaire ($\times 30\,000$). (14) Sécrition d'une cellule folliculaire et endocytose et pinocytose ovocytaire ($\times 60\,000$). Légende : cf. Figs. 1–3.



Figs. 15–17. Maturation ovocytaire. (15) Dissolution des granules vitellins ($\times 30\,000$). (16) Ovocyte mûr chorionné ($\times 60\,000$). (17) Dégénérescence d'une cellule folliculaire ($\times 30\,000$). Légende : cf. Figs. 1–3.

dement par le transport de protéines vitellines hétérosynthétiques de l'hémolymphe par capture pinocytosique [2]. Les digitations et les vésicules de pinocytose témoignent donc de l'activité extracellulaire de l'ovocyte. La fusion des vésicules de pinocytose produit des granules vitellins à aspect perforé. Leur tissage se réalise peut être sous l'action d'une enzyme spécifique. Les noyaux accessoires ayant atteint leur taille maximale, ils semblent fournir eux aussi des petites quantités d'ARN. Ainsi, le matériel qui paraît franchir leurs pores nucléolaires serait produit par le nucléole.

À la fin de la vitellogenèse, les trophocytes évacuent leur contenu dans l'ovocyte [15]. Les ovaires ayant atteint le stade V sont placés dans la classe 5 [1]. Les granules vitellins et les noyaux accessoires en régression de taille sont solubilisés par les vésicules lysosomiques qui seraient parvenues de l'injection terminale des trophocytes. Il résulte de cette solubilisation une structure granuleuse très fine et l'apparition du glycogène. Les vésicules de sécrétion dans le pôle apical des cellules folliculaires contiennent de la vitellogénine, qui est incorporée par l'ovocyte [24]. La migration de ces vésicules exige des interactions entre les microfilaments et les microtubules [25].

La couleur noire des granules denses, des granules vitellins et du matériel hémolympatique est due au traitement des coupes histologiques par le nitrate de plomb. Ce matériel se fixe sur les structures de nature glycoprotéique. S'agissant de lipides saturés, les globules lipidiques non osmophiles ne sont pas denses aux électrons. Le dépôt des granules denses en une fine ligne dans le cortex ovocytaire peut constituer d'abord la membrane vitelline, et éventuellement le chorion.

Au moment de la maturation de l'ovocyte, la vésicule germinative, les noyaux accessoires et les granules vitellins, envahis par les vésicules lysosomiques, disparaissent. Pendant cette dernière phase du cycle reproducteur de l'abeille ouvrière, l'inhibition ovarienne chez les autres abeilles peut s'expliquer par la présence d'un certain nombre d'ouvrières ayant développé leurs ovaires de façon optimale. Étant donné le caractère fortement social de l'abeille, la décision collégiale est susceptible d'avoir une influence profonde sur le succès reproducteur de la colonie [26]. Ainsi, la présence de dopamine dans la nourriture provoque une activation des ovaires, d'où son rôle dans le statut reproducteur des abeilles ouvrières mellifiques orphelines [27]. C'est probablement la catégorie des ouvrières pondueuses qui peut avoir une influence d'inhibition sur le développement ovarien des autres ouvrières. La régression de la taille ovarienne est observée chez *Apis cerana* en présence des ouvrières pondueuses [28], lesquelles inhibent le développement

ovarien chez les autres ouvrières [12,28–32]. Chez *Apis mellifica capensis*, le taux de 28% d'abeilles aboutissant au stade 5 diminue après 13 jours d'orphelinage [33]. Ainsi, la population de pseudo-clone d'ouvrières pondueuses de cette race peut atteindre $11 \pm 13\%$ ovaires entièrement actifs [34]. L'inhibition ovarienne est due à l'augmentation de la quantité de 2-heptanone produite par les glandes mandibulaires de l'ouvrière de 3 μg par tête à 13 jours à 11,4 μg par tête à 20 jours [35]. Ainsi, les têtes des ouvrières pondueuses de l'abeille mellifique du cap *Apis mellifica capensis* contiennent de l'acide *trans*-9-oxo-décénoïque [36]. Durant les quatre premiers jours de la vie imaginaire [37], la phéromone de la glande mandibulaire est dominée par la substance royale, l'acide 9-oxo-2-(*E*)-décénoïque [38], qui persiste pendant quelques jours chez cette race d'abeille [37]. On observe une corrélation significative entre la quantité de la substance royale des glandes mandibulaires (9-oda) produite et l'activité ovarienne [39].

Remerciements

Nous tenons à remercier vivement M. G. Arnold et M^{me} C. Masson, chercheurs à l'Inra de Paris, pour les dons des échantillons d'abeilles, *Apis mellifera mellifera*.

Références

- [1] G. Hess, Über den Einfluss der weisshelligkeit und des Fruchtbarkeits vitamins E auf die ovarien der Bienenarbeiterin, Schweiz. Bienen-Ztg 2 (1942) 33–110.
- [2] W. Engels, Extraoocytoöcytäre komponenten des Eiwachstums bei *Apis mellifera*: 1. Trophocytäre RNS-Zufuhr, Insectes Soc. 15 (1968) 271–288.
- [3] H.H.W. Velthuis, Ovarian development in *Apis mellifera* worker bees, Entomol. Exp. Appl. 13 (1970) 377–394.
- [4] H.H.W. Velthuis, L.J. Clement, R.A. Morse, F.M. Laigo, The ovaries of *Apis dorsata* from the Philippines, J. Apic. Res. 10 (2) (1971) 63–66.
- [5] C.G. Butler, E.M. Fairey, The role of the queen in preventing oogenesis in worker honey bees, J. Apic. Res. 2 (1) (1963) 14–18.
- [6] Y. Le Conte, G. Arnold, J. Trouiller, C. Masson, B. Chappe, G. Ourisson, Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honeybees by simple aliphatic esters, Science (Am. Assoc. Adv. Sci.) 245 (1989) 638–639.
- [7] J. Trouiller, G. Arnold, Y. Le Conte, C. Masson, Temporal pheromonal and kairomonal secretion in the brood of honeybees, Naturwissenschaften 78 (1991) 368–370.
- [8] G. Arnold, Y. Le Conte, J. Trouiller, H. Hervet, B. Chappe, C. Masson, Inhibition of worker honey bee ovaries development by a mixture of fatty acid esters from larvae, C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. III 317 (1994) 511–515.
- [9] A. Mohammedi, A. Paris, D. Crauser, Y. Le Conte, Effects of aliphatic esters on ovary development of queenless bees (*Apis mellifera* L.), Naturwissenschaften 85 (1998) 455–458.

- [10] T. Pankiw, M.L. Winston, G.E. Robinson, Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers, *J. Insect Physiol.* 44 (1998) 685–692.
- [11] Y. Le Conte, A. Mohammedi, G.E. Robinson, Primer effects of a brood pheromone on honey bee behavioural development, *Proc. R. Soc. Lond., Ser. B* 268 (2001) 163–168.
- [12] A.R. Kasturibai, R.C. Chandrashekar, Ovary development and egg laying in *Apis cerana indica* workers, *J. Apic. Res.* 14 (3/4) (1975) 149–152.
- [13] S.F. Sakagami, Y. Akahira, Comparison of ovarian size and number of ovarioles between the workers of Japanese and European honeybees studies on the Japanese honeybee, *Apis indica cerana*, *Fabr. Kontyû* 26 (1958) 103–109.
- [14] C. Verheijen-Voogd, How worker bees perceive the presence of their queen, *Vergl. Physiol.* 41 (1959) 527–582.
- [15] J. Joseph-Torres, Astereological analysis of developing egg chambers in the honeybee queen, *Apis mellifera*, *Cell Tissue Res.* 208 (1980) 29–33.
- [16] E.S. Reynolds, The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy, *J. Cell Biol.* 17 (1963) 208–211.
- [17] P.S. Ramamurty, Unusual intertrophocytic position of follicle cells in the nurse chamber of the honeybee queen ovary *Apis mellifica*, *Apidologie* 8 (2) (1977) 205–216.
- [18] M. Zelazowska, S.M. Biliski, Ultrastructure and function of nurse cells in phthirapterans. Possible function of ramified nurse cell nuclei in the cytoplasm transfer, *Arthropod Struct. Dev.* 30 (2) (2001) 135–143.
- [19] M. Matsuzaki, H. Ando, Ovarian structures of the adult alderfly, *Sialis mitsuhashii* Okamoto (Megaloptera, Sialidae), *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 6 (1) (1977) 17–29.
- [20] C. Favard-Sénéro, Capture de polysaccharides par micropinocytose dans l'ovocyte du Grillon en vitellogenèse, *J. Microsc.* 8 (1969) 401–414.
- [21] R. Fleig, H.O. Gutzeit, W. Engels, Structural organisation of ovarian follicle cells in the cotton bug, *Dysdercus intermedus* and the honeybee *Apis mellifera*, *Cell Tissue Res.* 265 (1991) 297–305.
- [22] W. Engels, Das Zeithiche und räumliche Muster der Dottereinlagerung in die oocyt von *Apis mellifera*, *Z. Zellforsch.* 142 (1973) 409–430.
- [23] J.J. Billen, Ultrastructure of the worker ovarioles in *formica ants* (Hymenoptera, Formicidae), *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 14 (1) (1985) 21–32.
- [24] R. Fleig, Role of the follicle cells for yolk uptake in ovarian follicles of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 24 (3) (1995) 427–433.
- [25] Q.Y. Sun, H. Schatten, Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization, *Reproduction* 131 (2006) 193–205.
- [26] D.R. Tarpy, D.C. Gilley, Group decision making during queen production in colonies of highly eusocial bees, *Apidologie* 35 (2004) 207–216.
- [27] T.C.D. Dombroski, Z.L.P. Simões, M.M.G. Bitondi, Dietary dopamine causes ovary activation in queenless *Apis mellifera* workers, *Apidologie* 34 (2003) 281–289.
- [28] S.F. Sakagami, Arbeits Teilung in einen weisellosen Bienen Volkchen, *Z. Bienenforsch.* 4 (1959) 186–193.
- [29] H. Dreischer, Untersuchungen über die Arbeitstätigkeit und Drüsenentwicklung alter bestimmter Bienen im weisellosen, *Volk. Zool. J. Physiol.* 66 (1956) 429–472.
- [30] H.H. Velthuis, F.J. Verheijen, A.J. Gottenbos, Laying worker honeybee similarities to the queen, *Nature* 207 (5003) (1965) 1314.
- [31] H.H.W. Velthuis, Queen substances from the abdomen of the honeybee queen, *Z. Vergl. Physiol.* 70 (1970) 210–222.
- [32] S.C. Jay, E.V. Nelson, The effects of laying worker honeybees *Apis mellifera* and their brood on the ovary development of other worker honeybees, *Can. J. Zool.* 51 (1973) 629–632.
- [33] E. Anderson, The ovary of *Periplaneta Americana*, in: *Abstr. 2nd Annual Meeting of the American Society for Cell Biology*, San Francisco, CA, vol. 2, 1962.
- [34] S. Martin, T. Wössler, P. Kryger, Usurpation of African *Apis mellifera scutellata* colonies by parasitic *Apis mellifera capensis* workers, *Apidologie* 33 (2002) 215–232.
- [35] R.M. Crewe, H. Hastings, Production of pheromones by workers of *Apis mellifera adansonii*, *J. Apic. Res.* 15 (1976) 149–154.
- [36] F. Ruttner, N. Koeninger, H.J. Veith, Queen substance bei eierlegenden Arbeiterinnen der Honigbienen (*Apis mellifera* L.), *Naturwissenschaften* 63 (1976) 434.
- [37] U.E. Simon, R.F.A. Moritz, R.M. Crewe, The ontogenetic pattern of mandibular gland components in queenless worker bees (*Apis mellifera capensis* Esch.), *J. Insect Physiol.* 47 (2001) 735–738.
- [38] R.F.A. Moritz, U.F. Simon, R.M. Crewe, Pheromonal contest between honeybee workers, *Naturwissenschaften* 87 (2000) 395–397.
- [39] U.E. Simon, R.F.A. Moritz, R.M. Crewe, Reproductive dominance among honeybee workers in experimental groups of *Apis mellifera capensis*, *Apidologie* 36 (2005) 413–419.