

FACULTE DES SCIENCES DE LILLE

THESE DE TROISIEME CYCLE

Jean M A L E C H A

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA GAMETOGENESE
IN VIVO ET IN VITRO CHEZ HIRUDO MEDICINALIS L.
(HIRUDINEE GNATHOBDELLIFORME)

Présentée en Juin 1968
devant la Commission d'Examen

Jury d'examen

M. M. DURCHON

Président

M. F. SCHALLER

Examineurs

M. E. VIVIER

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	p. 1
<u>I^{ère} PARTIE - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE, DE LA LUMIERE ET DU JEUNE SUR LA GAMETOGENESE ET L'ACTIVITE NEUROSECRETICE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL</u>	2
I - Influence de la température, de la lumière et du jeûne sur la gamétogenèse.....	3
A - Organisation de l'appareil génital et gamétogenèse.....	3
1 - Rappel anatomique.....	3
2 - La spermatogenèse.....	3
3 - L'ovogenèse.....	5
B - Influence de la température d'élevage et de la lumière sur la spermatogenèse.....	6
1 - Influence d'une température constante de 6 - 7° C et de l'obscurité continue.....	6
2 - Influence d'une élévation de la température sur la spermatogenèse des sangsues maintenues préalablement à 6 - 7° C et à l'obscurité.....	7
a) Résultats obtenus avec les animaux soumis à l'éclairement naturel.....	7
b) Résultats obtenus avec les animaux soumis à l'obscurité continue.....	9
c) Animaux témoins maintenus, à l'obscurité et à 6 - 7° C.....	9
3 - Influence d'une température élevée sur la spermatogenèse	9
C - Influence de la température et de la lumière sur l'ovogenèse	12
1 - Sangsues élevées à une température constante de 6 - 7° C.....	12
2 - Influence d'une élévation de la température sur l'ovogenèse des sangsues maintenues à 6 - 7° C et à l'obscurité.....	12
D - Influence du jeûne sur la gamétogenèse.....	16
1 - Influence du jeûne sur la spermatogenèse.....	16
2 - Influence du jeûne sur l'ovogenèse.....	16
Conclusion.....	16

II - Influence de la température et de la lumière sur l'activité des cellules neurosécrétrices du système nerveux central et des ganglions segmentaires.....	17
A - Anatomie du système nerveux central et des ganglions segmentaires.....	17
1 - Anatomie des ganglions supra-oesophagiens.....	18
a) Techniques.....	18
b) Résultats.....	18
2 - Anatomie du ganglion sous-oesophagien.....	19
3 - Anatomie des ganglions segmentaires.....	20
B - Les différents types de cellules neurosécrétrices, leur localisation. Influence de la température et de la lumière sur leur activité.....	20
1 - Historique.....	20
2 - Techniques.....	22
3 - Résultats.....	23
a) Histologie des cellules neurosécrétrices des ganglions supra-oesophagiens.....	23
b) Influence de la température et de la lumière sur l'activité des cellules neurosécrétrices des ganglions supra-oesophagiens.....	25
c) Influence de la température et de la lumière sur l'activité des cellules neurosécrétrices du ganglion sous-oesophagien et des ganglions segmentaires.....	28
Discussion.....	29

<u>II^e PARTIE - ETUDE, EN CULTURE ORGANOTYPIQUE DU DETERMINISME ENDOCRINE DE LA MATURATION GENITALE.....</u>	33
I - Recherche du milieu de culture et techniques générales.....	34
1 - Recherche du milieu de culture.....	34
2 - Techniques générales de mise en culture.....	36
II - Résultats.....	36
A - Testicules cultivés isolément.....	36
1 - Techniques.....	36

2 - Cicatrisation de l'explant.....	36
a) Structure de l'explant.....	36
b) Observations macroscopiques.....	37
c) Etude histologique.....	38
d) Discussion.....	38
e) Conclusion.....	40
3 - Résultats des cultures de testicules isolés.....	40
a) Testicules de sangsues isolées jusqu'à la mise en culture à 6 - 7° C et à l'obscurité.....	40
b) Testicules de sangsues élevées à 6 - 7° C puis pendant sept jours à la température du labora- toire avant la mise en culture.....	42
c) Discussion.....	42
B - Testicules cultivés en association avec le système nerveux central, accompagné ou non des deux premiers ganglions seg- mentaires.....	46
1 - Techniques.....	46
2 - Résultats.....	47
3 - Discussion.....	47
4 - Conclusion.....	51
C - Ovaires cultivés isolément.....	51
1 - Techniques.....	51
2 - Résultats.....	51
CONCLUSION.....	53
BIBLIOGRAPHIE	
PLANCHES	

INTRODUCTION

Dans le cadre de l'endocrinologie sexuelle, les recherches expérimentales concernant l'Embranchement des Annélides ont montré, dans la Classe des Polychètes, une action inhibitrice du cerveau sur la gamétogenèse chez les Nérei-dae (DURCHON, 1951-1952) ou stimulatrice chez les Arénicolidae (HOWIE, 1959 à 1966). Une influence gonadotrope du cerveau sur la spermatogenèse est mise en évidence par HERLANT-MEEWIS (1959) et SAUSSEY (1963) chez les Lumbricidae (Oligochètes). La classe des Hirudinées a donné lieu jusqu'à présent à peu de recherches expérimentales ; on peut citer les travaux d'HAGADORN sur Theromyzon rude (Baird) (1962) (Hirudinée Rhynchobdelliforme) et Hirudo medicinalis (L.) (1966) (Hirudinée Gnathobdelliforme). Les expériences entreprises consistent en des ablations de cerveaux suivies ou non de greffes ou d'injections d'homogénats de cerveaux. Elles mettent en évidence une action stimulatrice du système nerveux central sur la gamétogenèse. Nous avons repris cette étude expérimentale chez Hirudo medicinalis (L.) afin de préciser cette action gonadotrope du cerveau en employant une autre technique : la culture organotypique. Dans ce but, pour avoir des animaux à différents stades de développement génital à toutes les époques de l'année, nous avons essayé de bloquer ou au contraire d'activer la maturation génitale en soumettant les sangsues à des températures variées.

Dans ce travail seront étudiées d'une part les modifications apportées au cycle génital et aux cellules neurosécrétrices du cerveau par les variations de température et d'autre part les résultats obtenus en culture organotypique en ce qui concerne le déterminisme endocrine de la maturation génitale.*

* Je tiens à remercier Madame L. MEUNIER pour l'aide technique efficace qu'elle m'a apportée au cours de ce travail.

I^e Partie

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE, DE LA LUMIERE ET DU
JEUNE SUR LA GAMETOGENESE ET L'ACTIVITE NEUROSECRETICE
DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

I - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE, DE LA LUMIERE ET DU JEUNE SUR LA GAMETOGENESE

A - Organisation de l'appareil génital et gamétogénèse

H. medicinalis est hermaphrodite protandre.

1 - Rappel anatomique

L'appareil génital mâle comprend généralement 9 paires de testicules sphériques, situées respectivement dans chaque somite à partir du XII^e. Les deux rangées de testicules sont drainées chacune par un canal déférent. Les canaux déférents droit et gauche sont sensiblement parallèles. Avant de s'unir sur la ligne médiane au niveau du X^e somite, ils présentent une région pelotonnée : l'épididyme et enfin une région renflée et musculuse : le canal éjaculateur. A l'atrium fait suite un long pénis exsertile dont la région proximale, cylindrique, comporte, autour d'un étroit canal bordé d'un épithélium unistratifié, une couche musculaire très riche en capillaires, formant un tissu érectile.

Dans l'épaisseur du fond de l'atrium se trouve un bouquet de cellules glandulaires débouchant isolément dans la cavité du pénis et nommées glandes de Cowper. De grosses cellules glandulaires, entourées de tissu conjonctif forment une sorte de cape autour de la partie globuleuse et postérieure de l'atrium ; cette glande appelée prostate se compose de cellules déversant leurs produits dans la lumière de l'atrium.

Les organes génitaux femelles sont concentrés à l'intérieur du XI^e somite. Ils sont formés de deux cordons ovariens renfermés chacun dans un ovisac sphérique d'où part un canal évacuateur qui se réunit bientôt à son homologue pour former un oviducte impair à parois épaisses. Cet oviducte, entouré d'une masse glandulaire ovoïde (glande albumineuse) dans laquelle on distingue des cellules séreuses, aboutit à un grand sac ovoïde à parois épaisses : le vagin, pourvu d'une puissante musculature.

2 - La spermatogénèse

L'étude de la structure du sac testiculaire a été faite par I.A. SCRIBAN et H. AUTRUM (Handbuch der Zoologie de W. Kukenthal et T. Krunbach) qui décrivent en outre quelques étapes de la spermatogénèse. L'étude complète de celle-ci a été réalisée par O. TUZET (Traité de Zoologie de P.P. GRASSE).

D'après SCRIBAN et AUTRUM, les cellules souches des spermatogonies s'isoleraient à un stade très précoce de la paroi testiculaire et seraient libérées dans le testicule. Les cellules provenant de la division d'une spermatogonie souche restent attachées les unes aux autres formant ainsi un groupe où tous les constituants sont au même stade (groupe isogénique). La division des spermatogonies, disposées en un massif de 32 éléments autour d'un reliquat cytoplasmique réduit (le cytophore), donne 64 spermatocytes I autour d'un cytophore beaucoup plus important. Les deux divisions de maturation donnent des spermatocytes II et des spermatides attachées à un cytophore qui a augmenté de taille et régularisé ses contours. On obtient finalement 256 spermatozoïdes qui restent fixés un certain temps au cytophore. Le testicule contient, outre les cellules germinales des phagocytes de taille variable dont les plus grands ont généralement deux noyaux.

Le cycle annuel a été étudié par I.R. HAGADORN (1966 b): Chez la plupart des animaux, les spermatozoïdes apparaissent en Mai, certains sont déjà présents en Mars ; ils disparaissent en Novembre. Nos propres observations confirment ces résultats. Dans son étude, HAGADORN, en se basant sur l'examen de frottis testiculaires au microscope à contraste de phase, distingue 4 stades dans la spermatogenèse.

- stade 1 : petits groupes d'environ 1 à 64 cellules
- stade 2 : groupes isogéniques plus importants avec environ 64-128 ou plus de cellules. Les cellules en développement sont grandes, rondes et ont un cytophore relativement important. Le cytophore, quand il est présent, n'est pas proéminent.

- stade 3 : grands groupes isogéniques : les cellules en développement sont petites, elliptiques et ont peu de cytoplasme. Le cytophore est proéminent. Les premiers signes de développement des flagelles sont évidents dans certains cas.

- stade 4 : grands groupes isogéniques avec cytophore proéminent ; les flagelles des spermatozoïdes sont entièrement développés.

Dans notre étude, la spermatogenèse a également été scindée en 4 stades (planche 1 et planche 2, fig. 1). Ces stades, déterminés d'après des coupes histologiques ont des limites plus précises mais se superposent assez bien aux stades décrits par HAGADORN.

- stade 1 : groupes isogéniques de spermatogonies autour d'un cytophore très réduit. En pratique, lorsque des comptages sont effectués, seuls sont retenus les groupes ayant au moins 4 cellules.

- stade 2 : le cytophore est très net, dense et les cellules génitales sont de grande taille. Nous avons dans certains cas subdivisé ce stade en :

- stade 2 a : spermatogonies de dernière génération

- stade 2 b : spermatocytes I en prophase de méiose.

- stade 3 : spermatocytes II et spermatides jusqu'au stade montrant l'ébauche du flagelle.

- stade 4 : spermatozoïdes ayant acquis leur structure définitive mais encore attachés au cytophore.

Au cours de cette spermatogénèse le cytophore présente une évolution caractéristique. Au stade 2, il est dense et de structure homogène. De forme arrondie au stade 2 a, il prend une forme généralement allongée (Planche 1) au stade 2 b, par suite d'une croissance rapide. Au stade 3, la densité du cytophore diminue surtout dans la partie centrale ; sa taille a fortement augmenté et sa section est presque circulaire. Lorsque les spermatozoïdes sont sur le point de se détacher du cytophore, ce dernier commence à dégénérer ; des vacuoles apparaissent (Planche 3, fig. 4).

3 - L'ovogenèse

Dans chaque ovisac se trouve un ovaire qui se présente sous l'aspect d'un cordon plein et pelotonné renflé aux extrémités. Il est constitué de deux parties symétriques par rapport au centre dans lesquelles l'évolution des cellules germinales est identique. A l'extrémité renflée se trouve une grosse cellule éosinophile qui envoie des ramifications entre les ovogonies (Planche 2, fig. 2) et dont le rôle est encore inconnu. Les ovogonies se divisent, donnant finalement des ovocytes I dont quelques uns s'isolent vers l'extérieur et subissent une croissance privilégiée (Planche 2, fig. 3). En se rapprochant de la partie médiane du cordon on trouve une zone de dégénérescence. Une coupe d'ovaire montre des sections des différentes zones d'évolution (Planche 2, fig. 4).

Pour effectuer une étude expérimentale de la gamétogenèse il est intéressant de disposer pendant toute l'année d'animaux ou en activité ou en repos génital. Les travaux de LEOPOLSEDER (1931) montrent qu'il est possible, chez l'Hirudinée Rhynchobdelliforme Glossiphonia, de retarder la ponte d'une quinzaine de jours par un abaissement de la température. Nous avons donc essayé d'élever H. medicinalis, à basse température de manière à empêcher l'évolution génitale ou au contraire de maintenir l'activité génitale en les plaçant à température élevée.

B - Influence de la température d'élevage et de la lumière sur la spermatogenèse

Matériel et techniques

Les animaux utilisés proviennent du commerce et leur état génital est contrôlé à la réception par examen de frottis testiculaires de quelques-uns d'entre-eux.

Pour chaque sangsue en expérimentation, un testicule fixé au Carnoy ou au Bouin-Hollande, est débité en coupes sériées de 6 ou 7 μ d'épaisseur. Le pourcentage des éléments des différents stades est déterminé en comptant tous les groupes isogéniques situés respectivement dans 30 champs microscopiques entièrement occupés par le contenu testiculaire et pris au hasard. Le comptage est effectué en employant l'objectif 5 et les oculaires 6 du microscope binoculaire Stiasnie. Un oculaire présentant un réticule de 100 cases est employé dans le cas où le contenu testiculaire est particulièrement dense.

1 - Influence d'une température constante de 6 - 7° C et de l'obscurité continue

a) Des sangsues placées en Décembre, c'est à dire à une époque de repos génital, à la température de 6 - 7° C ne montrent aucune évolution testiculaire et cela tant qu'on les maintient à cette température. Les testicules ne contiennent que des groupes isogéniques des stades 1 et 2 (les stades 2 b étant rares ou inexistantes)

b) Des animaux réceptionnés en fin Février et placés à 6 - 7° C montrent une évolution différente selon leur état sexuel.

. ceux en repos génital ne présentent aucun signe d'activation et se comportent comme les sangsues isolées en Décembre.

. ceux qui se trouvent en début d'activité (stades 2 b très nombreux) présentent une régression de leur contenu testiculaire. Les stades 2 b sont progressivement phagocytés et le testicule contient alors des cytophores nus (Planche 3, fig. 1). Cet état subsiste dans le contenu testiculaire quelques mois après le passage à 6 - 7° C.

c) Des sangsues, placées en Juillet à 6 - 7° C, c'est à dire à une époque où la proportion d'éléments des stades 3 et 4 est élevée, présentent une involution testiculaire. Ces animaux fixés en Septembre ne contiennent plus que des groupes isogéniques des stades 1 et 2.

Donc, des sangsues placées à une température constante de 6 - 7° C et à l'obscurité restent ou reviennent à un stade de repos génital ou sinon très proche. Il est cependant important de connaître les réactions de ces animaux lorsqu'ils sont replacés au bout de quelques mois à la température du laboratoire (18 à 20° C).

2 - Influence d'une élévation de la température sur la spermatogenèse de sangsues maintenues préalablement à 6 - 7° C et à l'obscurité

Vingt quatre H. medicinalis moyennes sont placées à une température constante de 6 - 7° C à la fin du mois de Février. En Mai, trois d'entre-elles sont fixées, 5 restent à 6 - 7° C et 16 sont placées à la température du laboratoire : 8 à l'éclairement naturel et 8 à l'obscurité totale. Pour chacun de ces deux derniers groupes, des fixations sont faites à intervalles réguliers : trois sangsues sont fixées le 7^e jour, trois le 14^e et deux le 21^e. Les cinq animaux maintenus à 6 - 7° C et à l'obscurité sont fixés 27 jours après le début de l'expérience.

Pour chaque animal la présence ou l'absence de sang dans le tube digestif est notée.

a) Résultats obtenus avec les animaux soumis à l'éclairement naturel (Tableau 1)

Les animaux témoins ne montrent que des groupes isogéniques des stades 1 et 2 (Planche 3, fig. 1) avec quelques cytophores nus résultant de la phagocytose des stades 2 b. Après 7 jours de maintien à

Tableau 1 : Influence d'une élévation de la température et de l'éclairage naturel sur la spermatogenèse d'animaux maintenus préalablement à 6 - 7° C et à l'obscurité.

Durée d'exposition à la température du laboratoire et à la lumière naturelle	Présence de sang dans le tube digestif	Nombre (ligne supérieure) et % des différents groupes isogéniques				Moyenne des pourcentages des différents groupes isogéniques			
		1	2	3	4	1	2	3	4
0 (Témoins)	-	714 97,68	17 2,32						
	+	349 78,43	96 21,57			85,6	14,4	0	0
	+	492 80,66	118 19,34						
7 jours	-	498 66,22	223 29,66	31 4,12					
	+	403 60,15	259 38,65	8 1,20		66,9	31,2	1,9	0
	-	338 74,45	115 25,33	1 0,22					
14 jours	-	174 31,81	69 12,61	277 50,64	27 4,94				
	-	170 31,02	41 7,48	289 52,74	48 8,76	35,6	12,1	47,4	4,9
	-	263 43,98	96 16,05	233 38,97	6 1				
21 jours	-	120 24,54	38 7,77	7 1,43	324 66,26				
	+	110 17,97	77 12,58	171 27,94	254 41,51	21,2	10,2	14,7	53,9

la température du laboratoire apparaissent des stades 3. Le nombre des stades 2 et essentiellement des 2 b s'est fortement accru (Planche 3, Fig.2).

Après 14 jours, le nombre des stades 3 a augmenté et quelques groupes de spermatozoïdes apparaissent. Les stades 2 deviennent moins nombreux et ne représentent plus que 12,1% du contenu testiculaire (Planche 3, fig.3) proportion qui va peu varier au cours de la semaine suivante où l'on observe une maturation importante avec passage des stades 3 au stade 4. ^(planche 3, fig 4) La planche 4 donne un aperçu de l'évolution du contenu testiculaire. Cette évolution permet de connaître la vitesse de la spermatogenèse : en partant des spermatocytes I (stade 2 b) on obtient des spermatozoïdes en 14 jours environ.

b) Résultats obtenus avec les animaux soumis à l'obscurité continue

Comme le montrent le tableau 2 et la planche 5, l'évolution dans ce cas est la même mais la proportion de groupes isogéniques évoluant est moins importante.

c) Animaux témoins maintenus à l'obscurité et à 6 - 7° C

Ces animaux, comme le montre le tableau 3, ne présentent aucun signe d'évolution et le pourcentage des groupes des stades 1 et 2 est voisin de celui des témoins fixés au moment de la mise des individus à la température du laboratoire.

Ces résultats montrent donc que si la spermatogenèse peut être bloquée par le froid et l'obscurité, elle peut reprendre à tout moment de l'année lorsque les sangsues sont placées à la température du laboratoire, à la lumière ou à l'obscurité.

3) Influence d'une température élevée sur la spermatogenèse

Comme il a été dit précédemment, l'activité génitale mâle présente une période de repos s'étendant de Novembre à Mars. Est-il possible, dans ce cas, de maintenir l'activité génitale en élevant des H. medicinalis à la température du laboratoire ?

Des sangsues de taille moyenne, contenant du sang dans le tube digestif sont placées de Septembre à Février à la température du laboratoire et à l'éclairage naturel. Cinq animaux sont fixés tous les mois et leur

Tableau 2 : Etat du contenu testiculaire des animaux témoins maintenus à 6 - 7° C et à l'obscurité.

Présence de sang dans le tube digestif	Nombre (ligne supérieure) et % des différents groupes isogéniques				Moyenne des % des différents groupes isogéniques			
	1	2	3	4	1	2	3	4
-	795 94,42	47 5,58						
-	665 91,35	63 8,65						
+	999 86,57	155 13,43			88,4	11,6	0	0
-	480 87,76	67 12,24						
+	759 81,88	168 18,12						

contenu testiculaire examiné grâce à des coupes sériées.

Résultats : Tous les stades sont présents en Septembre et Octobre mais les stades 4 disparaissent en Novembre ce qui montre donc une évolution conforme au cycle annuel normal. Les stades 4 réapparaissent en Décembre, Janvier et Février. Le tableau 4 rend compte de la proportion des différents groupes isogéniques dans le contenu testiculaire des animaux fixés en Janvier.

Dans 4 cas sur 5 la proportion des stades 3 et 4 dépasse 50 %, ce qui correspond au maximum d'activité observé par HAGADORN chez ces sangsues en Août.

La spermatogenèse peut donc être continue pendant 11 mois de l'année si les animaux sont maintenus à une température voisine de 20° C. En Novembre la spermiogenèse a présenté une involution. Il est cependant probable qu'une température d'élevage plus élevée permettrait le maintien de l'activité génitale mâle.

C - Influence de la température d'élevage et de la lumière sur l'ovogenèse

1 - Sangsues élevées à une température constante de 6-7° C

Chez tous les animaux observés, l'ovogenèse est bloquée et l'arrêt des divisions goniales est total.

Dans ce cas, comme dans celui de la spermatogenèse nous avons étudié la réaction des ovaires lorsque les sangsues sont placées à la température du laboratoire.

2 - Influence d'une élévation de la température sur l'ovogenèse de sangsues maintenues ^{préalablement} à 6-7° C et à l'obscurité

Matériel et techniques : Les ovaires proviennent des sangsues sur lesquelles l'étude de la spermatogenèse a été faite précédemment. Ils sont fixés au Carnoy, débités à 6 ou 7 μ et colorés au glychémalun-éosine.

Résultats : Le seul fait important à noter est une reprise immédiate des mitoses goniales, que les sangsues subissent ou non l'éclairement naturel (tableaux 5 et 6).

Tableau 4 : Etat du contenu testiculaire des H. medicinalis élevées à la température du laboratoire et fixées en Janvier

Nombre (ligne supérieure) et % des différents groupes isogéniques				Moyenne des pourcentages des différents groupes isogéniques			
1	2	3	4	1	2	3	4
191	138	264	115				
26,98	19,49	37,29	16,24				
133	111	151	174				
23,37	19,51	26,54	30,58				
491	95	55	15	37,5	18	26	18,5
74,85	14,48	8,38	2,29				
276	173	228	207				
31,22	19,57	25,80	23,41				
267	144	269	170				
31,41	16,94	31,65	20				

Tableau 5 : Influence d'une élévation de la température et de l'éclair-
 rement naturel sur l'ovogenèse des animaux maintenus pré-
 alablement à 6 - 7° C et à l'obscurité.

Durée d'exposition à la température du laboratoire et à la lumière naturelle	Présence de sang dans le tube digestif	Nombre de mitoses ovogoniales dans les 2 ovaires
0 (Témoins)	-	0
	+	0
	+	0
7 jours	-	10
	+	122
	-	30
14 jours	-	75
	-	99
	-	60
21 jours	-	69
	+	187

Tableau 6 : Influence d'une élévation de température et de l'obscurité continue sur l'ovogenèse des animaux maintenus préalablement à 6 - 7° C et à l'obscurité.

Durée d'exposition à la température du laboratoire et à l'obscurité	Présence de sang dans le tube digestif	Nombre de mitoses ovogoniales dans les 2 ovaires
0 (Témoins)	-	0
7 jours	-	166
14 jours	-	48
21 jours	-	78
	+	192
	-	2
	+	57

D - Influence du jeûne sur la gamétogenèse

1 - Influence du jeûne sur la spermatogenèse

La comparaison des résultats consignés dans les tableaux 1 - 2 et 3 montre que, pour les sangsues élevées à 6 - 7° C et à l'obscurité, les stades 2 sont plus nombreux dans les testicules des animaux contenant du sang dans le tube digestif que dans ceux des animaux à jeûn. Lorsque les sangsues sont placées à la température du laboratoire, le nombre de groupes isogéniques qui passent aux stades 3 et 4 est plus important chez les animaux gorgés de sang.

Dans un cas, une sangsue à jeûn depuis plusieurs mois, placée à la température du laboratoire et à l'éclairement naturel, montre après trois semaines un contenu testiculaire composé de 97,4 % de stades 1 et de 2,6 % de stades 4. Donc dans ce cas, les stades 2 qui se trouvaient dans le testicule lorsqu'il a été placé à la température du laboratoire, ont tous évolué pour donner des spermatozoïdes, mais l'animal se montre incapable de reconstituer son stock de spermatocytes I.

Ces observations indiquent donc une influence certaine du jeûne sur la spermatogenèse, cette influence se faisant essentiellement sentir au stade 2.

2 - Influence du jeûne sur l'ovogenèse

L'étude des tableaux 5 et 6 montre que le nombre des mitoses goniales est généralement plus faible chez les sangsues à jeûn.

Conclusion

Cette étude montre donc que l'évolution de la gamétogenèse chez H. medicinalis est très sensible aux variations de température. Le repos génital peut être obtenu en maintenant les animaux à une température constante de 6 - 7° C et à l'obscurité. L'activité génitale peut être obtenue pendant onze mois de l'année en plaçant les sangsues à une température voisine de 20° C.

Dans le cas du passage des animaux de 6 - 7° C à la température du laboratoire pendant 14 et 21 jours, une baisse très nette de l'activité génitale mâle est constatée chez les sangsues élevées à l'obscurité continue par rapport à celles soumises à l'éclairement naturel (tableaux 1 et 2).

Cela se traduit par un faible passage des stades 1 au stade 2, qui se répercute sur le pourcentage des stades 3 et 4 contenus dans le testicule. Trois hypothèses peuvent être retenues pour expliquer cette différence :

- une action de l'éclairement
- des variations individuelles dont l'importance n'est pas à négliger ici, compte tenu du faible nombre d'individus en expérimentation.
- une action du jeûne qui a des conséquences identiques à celles décrites précédemment.

Cette dernière hypothèse ne peut cependant être prise en considération. La comparaison d'individus dans le même état de nutrition montre une différence nette en rapport avec l'éclairement. Ce fait ainsi que celui relatif à l'homogénéité de taille des sangsues en expérimentation, rendent l'hypothèse d'un effet modérateur de l'obscurité totale sur la spermiogenèse très plausible. Cependant l'hypothèse d'une différence due à des variations individuelles ne peut être totalement rejetée. Il faut en outre remarquer qu'après 7 jours, de maintien à la température du laboratoire, aucune différence n'est constatée entre les deux lots, ce qui suppose une prépondérance de la stimulation due à la température par rapport à celle de l'éclairement.

Le jeûne a une action non négligeable sur l'activité génitale, ralentissant notablement la spermiogenèse, ce qui nous a incité à n'utiliser pour nos expériences que des sangsues gorgées de sang.

II - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DE LA LUMIERE SUR L'ACTIVITE DES CELLULES NEUROSECRETICES, DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL ET DES GANGLIONS SEGMENTAIRES

Au cours des expériences précédemment décrites, concernant l'action de la température et de la lumière sur H. medicinalis l'évolution des cellules neurosécrétrices a été suivie. Une étude anatomique a été en outre nécessaire pour localiser les principaux neurones neurosécréteurs.

A - Anatomie du système nerveux central et des ganglions segmentaires

L'étude anatomique du collier péri-oesophagien d'H. medicinalis a été faite par LIVANOV (1904).

Dans le système nerveux central, des groupes de cellules séparés par des septas conjonctifs, forment des follicules neuroniques. Chez de

nombreuses Hirudinées Theromyzon rude (HAGADORN, 1958), Glossiphonia complanata (DAMAS, 1966) les follicules des ganglions supra-oesophagiens et sous-oesophagien sont coalescents ; l'ensemble dans ce cas est improprement appelé cerveau. Chez H. medicinalis il n'en est pas de même et ces deux parties parfaitement distinctes, sont réunies par des connectifs péri-oesophagiens dépourvus de neurones sur une longueur assez importante (Planches 6 et 7).

1 - Anatomie des ganglions supra-oesophagiens

LIVANOV note la présence de 20 groupes de cellules répartis symétriquement de part et d'autre du plan sagittal. Comme les ganglions cérébroïdes sont constitués de 2 neuromères, chacun d'eux étant composé primitivement de 6 follicules neuroniques, il apparaît donc que certains d'entre eux se sont secondairement divisés. La description de ces ganglions donnée par LIVANOV est schématiquement la suivante : 1 seul groupe neuronique accolé au plan sagittal, latéralement à ce follicule sur la partie ventrale du ganglion, 4 paires de groupes neuroniques se succédant jusqu'au connectif péri-oesophagien ; le dernier groupe étant situé dorsalement entre la 3^e et la 4^e paire.

Nos propres observations ne confirment cependant pas en totalité cette description et nous avons donc repris l'étude anatomique du système nerveux central.

a) Techniques

Pour cette étude, deux techniques sont employées :

- d'une part, les ganglions supra-oesophagiens sont reconstitués d'après des coupes sériées de 7 μ d'épaisseur et dessinées à la chambre claire sur du carton. L'épaisseur de ce dernier a été choisie de manière à respecter le rapport existant entre la surface des coupes et leur épaisseur.

- d'autre part, le système nerveux central, fixé au Bouin-Hollande sans acide acétique ou au formol salé à 10 % (90 ml d'une solution de Ringer pour Hirudinées + 10 ml de formol) sont colorés in toto au carmin chlorhydrique ou au bleu de méthylène, cette dernière coloration donnant les meilleurs résultats.

b) Résultats

Vingt groupes de neurones ont été observés, mais leur disposition n'est pas totalement conforme aux descriptions de LIVANOV.

Nous les numérotions arbitrairement de 1 à 10, à droite et à gauche du plan sagittal, en partant d'une part de la ligne médiane vers les connectifs pour chaque plan folliculaire et d'autre part du plan ventral au plan dorsal. Les planches 6 - 7 et 8 donnent la disposition des différents groupes de neurones. Les follicules 1 à 6 sont situés ventralement, mais il faut noter que la position du follicule 3 n'est pas fixe. Il peut se placer plus ou moins profondément entre les follicules 2 et 4 occupant à la limite une position ventrale. Les follicules 7 à 10, disposés en croix, occupent une position plus dorsale ; cette disposition peut être, dans certains cas, légèrement perturbée par le follicule 3 qui pénètre assez profondément entre le 7 et le 8, ce dernier pouvant dans ce cas venir au contact du 2. La symétrie par rapport au plan sagittal n'est pas toujours parfaitement respectée.

Comme le montre la planche 7, on ne trouve aucun neurone au dessus du neuropile dans la région médio-dorsale du cerveau.

Trois nerfs émergent ventralement du neuropile, deux dans la zone située entre les follicules 4, 5 et 6, le troisième sous le follicule 6.

2 - Anatomie du ganglion sous-oesophagien

Nos observations confirment celles de LIVANOV. Le ganglion sous-oesophagien est constitué par la fusion de 4 neuromères représentés par 24 follicules. Dorsalement il existe 7 paires de groupes de neurones (Planche 7) numérotés de part et d'autre du plan sagittal de 11 à 17 en partant de la région antérieure vers la région postérieure. Les follicules 13 et 15 sont quelquefois peu visibles dorsalement. Les follicules dorsaux occupent également les parois latérales du ganglion sous-oesophagien et viennent ventralement au contact de 5 paires de groupes neuroniques. Les follicules ventraux sont symétriques par rapport au plan sagittal où s'accolent les follicules 19 à 22 droits et gauches ; le 18 droit et le 18 gauche occupent une position latérale et antérieure.

Le 1^{er} neuromère sous-pharyngien serait constitué des follicules 11 - 18 et 19 (D et G), les trois suivants d'une paire de follicules ventraux et de deux paires de dorsaux.

Les nerfs émergent dans la zone de contact entre les follicules dorsaux et ventraux.

Nous avons constaté que dans certains cas, les follicules 22 D et G n'occupent pas une position symétrique et sont assez imparfaitement situés

l'un derrière l'autre, rappelant ainsi la disposition des follicules ventraux des ganglions segmentaires. Cette particularité n'autorise cependant pas la représentation des follicules ventraux du ganglion sous-oesophagien sur une ligne médiane et impaire comme l'a fait K.H. MANN (1962).

3 - Anatomie des ganglions segmentaires

Ils sont constitués de deux paires symétriques de follicules dorsaux et de 2 follicules ventraux médians et impairs (planches 4 et 5).

Les ganglions sont réunis par 3 connectifs, 2 très importants et symétriques, le troisième médian et de faible diamètre : le nerf de Faivre.

B - Les différents types de cellules neurosécrétrices, leur localisation. Influence de la température et de la lumière sur leur activité

1 - Historique

Chez H. medicinalis la présence de cellules neurosécrétrices a été signalée depuis longtemps (B. SCHARRER, 1937). Cependant les premiers travaux importants concernant la classe des Hirudinées ne datent que de 1958. HAGADORN signale en effet chez l'Hirudinée Rhynchobdelliforme Theromyzon rude (BAIRD) la présence de cellules neurosécrétrices de 2 types : cellules α colorables par la fuchsine paraldéhyde et β par l'orange G. Il décrit en outre un type cellulaire λ caractérisé par la forte affinité du noyau pour l'orange G, ce type n'a plus été signalé dans les publications ultérieures de l'auteur ; les cellules γ peuvent en effet être classées suivant leurs réactions cytoplasmiques parmi les cellules α ou les neurones ordinaires (Δ). Cet auteur dans le même travail signale ces types cellulaires chez Erpobdella punctata, Hirudo medicinalis (L.) et Placobdella papillifera. La même année (1958) 2 types de cellules neurosécrétrices, basophiles et acidophiles, sont signalés chez Hirudinaria granulosa (Sav.) par P.N. NAMBU DIRI et K.P. VIJAYAKRISNAM.

Depuis, un certain nombre d'auteurs ont signalé la présence de l'un ou des 2 types cellulaires chez d'autres Hirudinées. Ce sont K. CZECHOWICZ (1961-63) chez Herpobdella octoculata (L.), Herpobdella testacea f. nigricollis (Brandes), Glossiphonia complanata (L.), M. IONESCU VARO et A. GRIGORIU (1965) chez Trocheta bykowskii (Gedroyc), W. TUMPLING (1965) chez Theromyzon tessulatum (O.F. Müller), Glossiphonia complanata (L.), Herpobdella octoculata (L.)

et Piscicola geometra (L.) D. DAMAS (1966) chez Glossiphonia complanata (L.) et N.K. MISHRA (1967) chez Hirudinaria granulosa (Sav.).

I.R. HAGADORN (1966 a) décrit 4 types de cellules chez H. medicinalis et complète l'étude histochimique, entreprise par S. BIANCHI (1964 b)

- Cellules α 1 : riches en matériel fuchsinophile, se présentant en grandes flaques pouvant s'agréger. La sécrétion est une protéine contenant des quantités considérables de cystine, peu de tryptophane et peut être quelques parties glucidiques et lipidiques, (BIANCHI ne trouve pas de lipides).

- Cellules α 2 : cellules contenant des granules fuchsinophiles petits ou moyens. Le produit de sécrétion a la même composition chimique que celui des α 1. Ce fait permet à HAGADORN d'émettre l'hypothèse qu'il s'agit de 2 phases sécrétoires d'un même type cellulaire.

- Cellules β 1 : colorables par l'orange G. La sécrétion est une protéine avec un petit groupement glucidique.

- Cellules β 2 : colorables par le vert lumière. La sécrétion est une protéine avec un petit groupement glucidique et très riche en tryptophane ou autre dérivé tri-indolique.

En 1959, LEGENDRE signale que les cellules géantes des ganglions segmentaires,

qui élaboreraient des orthophénols voisins de l'adrénaline (PEREZ, 1942), contiennent également une enclave paranucléaire spongieuse fuchsinophile. Les études de S. BIANCHI, (1964 a) montrent que dans ces cellules dites de Retzius la substance chromaffine est fluorescente et non le produit fuchsinophile. Des études plus récentes de KERKUT C.A., SEDDEN G.B. et WALKER R.J. (1967) semblent indiquer que ces neurones sécrètent de la 5-hydroxy-tryptamine et non pas de l'adrénaline. BIANCHI (1967 a, b) signale en outre qu'il existe trois types de cellules fluorescentes chez H. medicinalis.

- cellules à fluorescence jaune, élaborant une tryptamine
- cellules à fluorescence verte, contenant peut-être une catécholamine (probablement de l'adrénaline)

- cellules à fluorescence jaune pâle : fluorescence due à l'interférence de plusieurs substances et probablement de tryptamine et de catécholamine. Pour cet auteur, les cellules à fluorescence jaune et

Jaune pâle peuvent être comparées aux cellules sécrétrices d'amine de l'oligochète Octolasion complanatum (BIANCHI, 1967 c) qui seraient probablement neurosécrétrices. Cependant une réserve doit être faite dans ce cas. En effet, les produits sécrétés sont des neurohumeurs et il a été décidé de ne pas appliquer le terme de neurosécrétrices aux cellules produisant ces corps.

2 - Techniques

Pour l'étude histologique, le système nerveux central ainsi que les premiers ganglions segmentaires sont prélevés avec une partie des tissus périphériques, fixés au Bouin Hollande sans acide acétique et débités en coupes sériées de 7 μ d'épaisseur. Nous avons employé la technique de coloration par la fuchsine paraldéhyde avec coloration de fond de HALMI, variante de CLARK.

Des essais de localisation in situ des cellules neurosécrétrices ont été réalisés. Des résultats intéressants ont été obtenus par G.S. DOGRA et B.K. TANDON (1964) chez Hirudinaria granulosa et nous avons utilisé une technique dérivée de celle de ces deux auteurs et préconisée par GABE (1967). Ce dernier conseille comme fixateur le Bouin Hollande sans acide acétique ; cependant nous préférons dans le cas d'H. medicinalis le formol salé à 10 %. En effet, ce fixateur permet avant toute coloration de repérer divers neurones sécréteurs : les cellules $\beta 2$ qui sont blanches sur le vivant le restent, les $\alpha 1$ sont opalescentes et les cellules chromaffines de Retzius prennent une teinte jaune pâle. Les temps de coloration ayant donné les meilleurs résultats (planche 9, fig. 1, 2) sont les suivants :

- oxydation par l'acide performique 5 mn
- coloration à la fuchsine paraldéhyde 1 h
- la différenciation est obtenue par l'alcool à 70° et l'éclaircissement des pièces par le benzoate de méthyle.

Pour la coloration in situ des cellules neurosécrétrices la technique de coloration par la fuchsine paraldéhyde pour coupes histologiques a été également utilisée après fixation au Bouin Hollande sans acide acétique. Cette technique peut donner de bons résultats (Planche 9, fig. 3) mais assez irréguliers.

3 - Résultats

Dans notre étude, nous nous sommes essentiellement intéressés aux cellules de type α et β 2. Le type β 1 est observé dans le système nerveux central, mais il est relativement rare ce qui confirme les observations d'HAGADORN (1966 a).

a) Histologie des cellules neurosécrétrices des ganglions supra-oesophagiens

- Cellules α

Si la distinction en cellules α 1 et α 2 est commode pour suivre une évolution annuelle par exemple, notre observation, s'étendant sur une période relativement courte, a nécessité une étude très minutieuse de l'évolution des divers neurones sécréteurs. Cela nous a conduit, par commodité, à subdiviser ces derniers en 4 groupes :

x Cellules fuchsinophiles du groupe 1 : il s'agit de 2 paires de cellules de grande taille, 18 à 40 μ de large sur 35 à 45 μ de longueur, entièrement occupées par un produit de sécrétion fuchsinophile bleu sombre : ce sont donc des neurones de type α 1 typiques. Les cellules du groupe 1 occupent une position latérale dans les ganglions supra-oesophagiens (Planche 9, fig. 1) et se situent généralement dans le follicule 8 ; cependant il n'est pas rare de voir une cellule dans le follicule 8, l'autre dans le follicule 3. Le noyau, sphérique, occupe une position excentrique proche du cône axonal et possède 1 ou 2 nucléoles généralement périphériques (Planche 9, fig. 4). L'élimination de la sécrétion se fait par voie axonale et peut être suivie dans la commissure dorsale jusqu'au voisinage du plan sagittal ; ensuite sa destinée nous est inconnue.

x Cellules fuchsinophiles du groupe 2 : elles sont de petite taille, les plus grandes ayant 16 μ de large sur 24 μ de long et prennent assez souvent une forme plus ou moins triangulaire (Planche 9, fig. 5). Le noyau, central, atteint un diamètre de 8 μ et possède un nucléole. Le matériel fuchsinophile est toujours périnucléaire et généralement en flaques. Ces neurones dont le nombre varie entre 20 et 26 sont presque tous situés dans les follicules 8 et 3.

x Cellules fuchsinophiles du groupe 3 : elles sont de grande taille, pouvant atteindre 35 μ de large sur 45 μ de long, généralement au

nombre de ^{paires} 5 réparties dans les follicules 3 et 8. La particularité de ces cellules est d'avoir une sécrétion qui se colore en bleu violacé après traitement par le Clark. Elles se différencient ainsi très nettement des autres cellules fuchsinophiles. Leur cytoplasme est finement granuleux et elles peuvent donc être rangées dans les neurones de type α 2, (Planche 10, fig. 1). Le noyau, à gros nucléole, se trouve généralement en position excentrique dans le cône axonal.

x Cellules fuchsinophiles du groupe 4 : dans ce groupe, assez hétérogène, nous avons réuni toutes les cellules fuchsinophiles autres que celles appartenant aux groupes un, deux et trois. Leur aspect est variable et certaines ont retenu notre attention.

. quelques cellules (4 à 6) de petite taille ($15 \mu \times 25 \mu$) possèdent un cytoplasme et un axone rempli de matériel fuchsinophile mais ont une structure spongieuse très nette (Planche 10, fig. 3). Une zone plus riche en sécrétion s'observe généralement au pôle opposé à l'axone. Une paire de ces cellules est caractéristique des follicules 2. L'élimination de la sécrétion se fait par voie axonale.

. Un nombre plus important de cellules présente une structure nettement vésiculaire. Les vésicules situées à la périphérie de la cellule et plus ou moins fusionnées entre-elles, contiennent une trame importante de matériel fuchsinophile (Planche 10, fig. 2). Leur taille est variable ; les plus grandes ($35 \mu \times 45 \mu$) se situent dans le follicule 8.

. La plupart des cellules du groupe 4 sont des neurones présentant un nombre important de granules fuchsinophiles non coalescents et situés généralement dans la zone périnucléaire.

Il faut remarquer que de nombreux neurones ordinaires contiennent des granules fuchsinophiles (fait déjà signalé par HAGADORN chez Theromyzon rude en 1958) et que tous les stades de passage existent entre les cellules α 2 et ces neurones ordinaires. Cela explique peut être la proportion énorme de cellules neurosécrétrices observées par certains auteurs chez les sangsues : au moins 50 % des neurones chez Trocheta bykowskii (M. IONESCU-VARO et A. GRI-GORIU, 1965) et 90 % chez Glossiphonia complanata (D. DAMAS, 1966).

- Cellules de type β 2

Nous nous sommes essentiellement intéressés à 4 paires de cellules β 2 situées généralement dans le follicule 9. Elles sont de grande taille ($30 \mu \times 40 \mu$) avec un noyau excentrique situé dans le cône axonal. Ces neurones sont colorés uniformément en vert ou en vert brunâtre. Les axones contiennent toujours de la sécrétion et peuvent être suivis sur une courte distance dans le neuropile (Planche 10, fig. 4).

b) Influence de la température et de la lumière sur l'activité des cellules neurosécrétrices des ganglions supra-oesophagiens

- La commissure dorsale : un fait très frappant est l'abondance de matériel fuchsinophile dans la commissure dorsale d'H. medicinalis quand cet animal est maintenu à une température constante de $6 - 7^\circ \text{C}$ et à l'obscurité (Planche 11, fig. 1). Cette accumulation de sécrétion régresse quand les sangsues sont replacées à la température du laboratoire (Planche 11, fig. 2).

Chez les sangsues élevées à la température du laboratoire de Septembre à Février, la commissure est riche en matériel fuchsinophile mais moins que chez les animaux élevés à basse température. Il faut rappeler ici, que la commissure dorsale est dépourvue de cellules dans sa partie médio-dorsale et que les axones, remplis de granules fuchsinophiles et particulièrement nombreux dans cette zone, ne sont séparés du sang que par une épaisseur réduite de neurilème. Le système nerveux d'H. medicinalis se trouve en effet dans un sinus sanguin et d'autre part un important vaisseau ayant la forme générale d'un U très ouvert, dirigé vers l'avant, passe près de la commissure dorsale. Cela pourrait former un organe neuro-hémal très primitif, tel qu'il est défini par KNOWLES et CARLISLE (1956). HAGADORN (1958) fait la même observation chez Theromyzon rude.

- Cellules de type α :

x Groupe 1

. Variations observées dans ces cellules chez des sangsues élevées d'abord à $6 - 7^\circ \text{C}$ et à l'obscurité puis à la température du laboratoire : les sangsues isolées en Février à $6 - 7^\circ \text{C}$ et à l'obscurité présentent généralement des neurones du groupe 1 avec un cône axonal et un axone fortement vacuolisés (Planche 12, fig. 1). L'élimination de la

sécrétion n'est cependant pas interrompue, comme en témoigne la présence de granules fuchsinophiles très nombreux dans l'axone. Chez les sangsues replacées à la température du laboratoire on observe dans ces cellules un léger accroissement du matériel fuchsinophile qui se traduit par une diminution du nombre et du diamètre des vacuoles.

. Influence sur ces cellules du maintien des sangsues à la température du laboratoire de Septembre à Janvier : Seuls ont été observés les cerveaux des sangsues fixées en Septembre et en Janvier, c'est à dire d'une part des animaux en fin d'activité reproductrice, d'autre part des animaux ayant repris cette activité. Dans les 2 cas, ces neurones sont remplis de sécrétion et ne présentent aucune vacuolisation (Planche 9, fig. 4).

Ces cellules montrent donc une activité sécrétrice et excrétrice constante. Cette observation est à rapprocher de celle d'HAGADORN (1958) qui signale dans les follicules 4 et 5 de Theromyzon rude des cellules fuchsinophiles "géantes" (35 à 45 μ de longueur) remplies de sécrétion et ne présentant pas de cycle bien net.

x Groupe 2

Dans les cellules fuchsinophiles du groupe 2 des animaux élevés à 6 - 7° C et à l'obscurité depuis Février et fixés en Mai et Juin, la sécrétion est peu dense et limitée généralement à un croissant périnucléaire se trouvant à l'opposé de l'axone (Planche 11, fig. 3). Chez les sangsues replacées à la température du laboratoire, à l'éclairement naturel ou à l'obscurité totale, on enregistre dès la première semaine un accroissement du matériel fuchsinophile, se marquant d'abord par une plus forte densité et ensuite par une augmentation sensible de ce matériel qui entoure alors complètement le noyau (Planche 11, fig. 4). Ces cellules passent donc d'un stade $\times 2$ à un stade proche de l' $\times 1$ mais il n'y a pas de sécrétion dans l'axone.

En Septembre, ces neurones contiennent un matériel fuchsinophile abondant ; cependant on y distingue de nombreuses petites vésicules incolores (Planche 9, fig. 5). Chez les sangsues maintenues à la température du laboratoire de Septembre jusqu'à la fixation en Janvier, ces cellules présentent une zone périnucléaire fuchsinophile plus dense avec disparition presque

complète des vésicules incolores. Ce sont dans ce cas des neurones de type $\alpha 1$. Les axones ne contiennent que rarement un peu de sécrétion.

x Groupe 3

Ces cellules chez les sangsues isolées en Février à 6 - 7° C et à l'obscurité et fixées en Mai et Juin sont riches en sécrétion. Les granules fuchsinophiles se concentrent généralement en 2 anneaux, l'un périnucléaire, l'autre sous la membrane cellulaire. Ces anneaux sont confondus dans la zone périnucléaire dirigée vers l'axone (Planche 12, fig. 2). Lorsque ces animaux sont replacés à la température du laboratoire, le matériel fuchsinophile s'accroît et la disposition en anneau tend à s'estomper. Il faut cependant remarquer que chez les deux sujets, fixés après avoir été soumis trois semaines à la température du laboratoire et à l'éclairement naturel, les cellules du groupe 3 contiennent de nombreuses vacuoles périphériques.

En septembre, ces cellules sont très pauvres en sécrétion qui s'observe essentiellement dans la zone périnucléaire (Planche 10, fig. 1). Chez les sangsues maintenues à la température du laboratoire, la quantité de matériel contenue dans le péricaryone a nettement augmenté.

x Groupe 4

Les cellules vésiculeuses montrent un accroissement de leur matériel fuchsinophile parallèle à celui des cellules du groupe 2, mais moins important. Un fait est cependant à signaler : c'est le fléchissement enregistré dans le nombre de neurones de ce groupe recensés chez les animaux fixés après avoir été replacés depuis huit jours à la température du laboratoire. Leur taux revient ensuite au même niveau que chez les sangsues maintenues à 6 - 7° C et à l'obscurité.

- Cellules $\beta 2$

Chez les sangsues élevées à 6 - 7° C et à l'obscurité depuis Février et fixées en Mai et Juin, le cytoplasme des cellules $\beta 2$ est fortement vacuolisé à la périphérie et dans l'axone (Planche 12, fig. 4). Le passage à la température du laboratoire, entraîne un léger accroissement de la sécrétion se traduisant par une diminution de la vacuolisation.

Ces cellules, chez les animaux fixés en Septembre et ceux maintenus à la température du laboratoire et fixés en Janvier, ont un contenu très riche en sécrétion (Planche 10, fig. 4).

c) Influence de la température et de la lumière sur l'activité des cellules neurosécrétrices du ganglion sous-oesophagien et des ganglions segmentaires

- Cellules du type α 2

Le ganglion sous-oesophagien contient de nombreuses cellules du type α 2 mais les neurones fortement colorés par la fuchsine paraldéhyde sont rares. Nous nous sommes intéressés à trois paires d'entre eux.

- une située dans les follicules 19 (Planche 9, fig. 2)
- une autre en position latéro-ventrale dans le neuromère postérieur du ganglion sous-oesophagien.

- la dernière dans les follicules 13 (Planche 9, fig. 3)

x Cellules fuchsinophiles des follicules 19

Elles sont généralement piriformes, de taille moyenne (25 à 30 μ de large sur 30 μ à 35 μ de long) et leur axone contient des granules fuchsinophiles (Planche 12, fig. 3). Leur sécrétion est généralement concentrée sous la membrane cellulaire. Ces 2 cellules, bien qu'étant constamment actives, subissent peu de modifications en rapport avec la température. Elles sont cependant assez pauvres en sécrétion chez les animaux élevés à la température du laboratoire et fixés en Septembre et Janvier.

x Cellules fuchsinophiles du neuromère postérieur

Il s'agit d'un couple de neurones ayant une structure vésiculaire (Planche 13, fig. 1). Légèrement plus petites que les précédentes, elles sont identiques à une paire de cellules situées en position latéro-ventrale et postérieure dans les ganglions segmentaires.

Leur activité sécrétoire augmente quand les sangsues passent de 6 - 7° C à la température du laboratoire (Planche 13, fig. 2) ou lorsqu'elles sont élevées à la température du laboratoire et fixées en Janvier. Cependant elles gardent toujours leur aspect vésiculaire. L'élimination de la sécrétion se fait par voie axonale.

x Cellules fuchsinophiles des follicules 13

De plus grande taille que celles des folli-

~~dans tout le cytoplasme et l'axone.~~

x Cellules de Retzius

Nous confirmons dans ce cas les observations de LEGENDRE mais la figure qu'il en donne semble cependant exceptionnelle. Le plus souvent le matériel fuchsinophile se trouve dans un croissant cytoplasmique plus clair situé au pôle cellulaire opposé à l'axone. Ces cellules qui sécrètent ou de l'adrénaline (PEREZ, 1942) ou de la 5-hydroxy-tryptamine (KERKUT, SEDDEN et WALKER, 1967) présentent donc une dualité de fonction (LEGENDRE, 1959 ; BIANCHI, 1964 a).

- Cellules β 2

Nous avons remarqué, chez les sangsues élevées à la température du laboratoire et fixées en Janvier, un accroissement important du matériel colorable par le vert lumière dans les neurones de type β 2 du ganglion sous-oesophagien.

DISCUSSION

Cette étude montre :

a) chez les sangsues élevées à 6 - 7° C puis à la température du laboratoire

- une diminution du produit de neurosécrétion de la commissure dorsale où se situe peut être une zone neuro-hémale

- une activité accrue des cellules neurosécrétrices et notamment des neurones fuchsinophiles du groupe 2

- corrélativement une reprise de la spermiogenèse et des divisions ovogoniales

b) chez les sangsues élevées à la température du laboratoire de Septembre à Janvier :

- un accroissement de l'activité des cellules neurosécrétrices chez les animaux fixés en Janvier par rapport à ceux fixés au mois de Septembre précédent

- une activité spermiogénétique intense chez les animaux fixés en Janvier, ceux fixés en Septembre étant en fin d'activité reproductrice.

La reprise de la spermiogenèse semble donc s'accompagner d'un accroissement de l'activité des cellules fuchsinophiles. Or, nous savons que le système nerveux central exerce une action stimulatrice sur la spermiogenèse (HAGADORN, 1966 b, c ; MALECHA, 1967). Nous pouvons donc admettre dans ce cas l'hypothèse émise par HAGADORN relative à l'action stimulatrice des neurones fuchsinophiles. Cependant, dans le cas où les sangsues sont d'abord élevées à 6 - 7° C puis à la température du laboratoire, il semble que la reprise d'activité est due à la brusque élimination du produit de sécrétion accumulé dans la commissure dorsale. En effet, les cellules dont la reprise d'activité est la plus marquée (groupe 2) n'ont pas de sécrétion dans l'axone. Au niveau de la commissure dorsale l'élimination du produit de neurosécrétion se ferait au travers du neurilème. L'étude réalisée par HAGADORN, BERN et NISHIOKA chez Theromyzon rude, au microscope électronique, ne décèle aucun passage effectif dans la zone neuro-hémale, la membrane axonale étant conservée. Cependant une diminution de densité des granules dans cette zone est constatée, diminution de densité s'expliquant peut-être par un passage de substance dans le sang. COGGESHALL et FAWCETT (1963) montrent qu'un passage actif est possible à travers le neurilème au niveau de la chaîne nerveuse ventrale d'H. medicinalis. Il se fait dans ce cas du sinus sanguin vers le système nerveux. Cette accumulation de la neurosécrétion dans le neuropile n'est pas propre aux Hirudinées. Elle a été également observée chez les Polychètes par N. DHAINAUT-COURTOIS chez N. diversicolor (1964) et N. pelagica (1966a) à la base du cône fibreux intracérébral et dans la région infra-capsulaire, formation qui constitue pour BOBIN et DURCHON (1953) la voie d'élimination des hormones sécrétées par le cerveau. Chez les Oligochètes la sécrétion serait éliminée par passage dans les capillaires sanguins nombreux dans le cerveau (HERLANT-MEEWIS, 1955).

Un problème se pose, c'est celui de l'origine de la sécrétion observée dans la commissure dorsale d'H. medicinalis. Les seuls neurones fuchsinophiles ayant une activité excrétrice importante sont ceux du groupe 1 et quelques cellules spongieuses du groupe 4. Ces cellules ne présentent cependant pas une activité cyclique bien nette en rapport avec l'activité génitale. Par contre une telle activité cyclique est observée pour les cellules du groupe 2 au cours des expériences précédemment décrites et au cours du cycle annuel. Nous avons constaté en effet, qu'au printemps ce sont ces

neurones qui présentent la reprise d'activité la plus nette. Les cellules du groupe 3 montrent un accroissement de leur matériel fuchsinophile corrélativement à une reprise de l'activité génitale. Dans ce cas, comme dans le précédent aucune élimination axonale nette n'a été observée. Donc, d'après ces observations, seuls les neurones du groupe 1 et quelques uns du groupe 4, sembleraient fournir le matériel fuchsinophile accumulé dans la commissure dorsale et seraient ainsi de véritables cellules neurosécrétrices. Cependant, cette étude se basant sur la coloration à la fuchsine paraldéhyde qui n'est pas absolument spécifique de la neurosécrétion et n'englobant qu'une période courte de la vie d'H. medicinalis demanderait une confirmation par une étude au microscope électronique. Il faut rappeler ici qu'une telle étude faite par COGGESHALL et FAWCETT sur les ganglions segmentaires d'H. medicinalis n'a pas confirmé les résultats obtenus par HAGADORN, BERN et NISHIOKA chez Theromyzon rude. Les cellules neurosécrétrices d'H. medicinalis contiennent des granules d'au moins deux catégories différentes et dont le diamètre varie de 1400 à 2200 Å pouvant quelquefois atteindre 6000 Å. En outre, ces granules sont toujours enveloppés d'une membrane.

Les 6 cellules fuchsinophiles du ganglion sous-oesophagien présentent une élimination axonale nette mais leur activité ne nous semble pas en relation directe avec la spermatogenèse. Chez les Hirudinées, plusieurs espèces montrent une relation entre l'activité des cellules fuchsinophiles et la reproduction. Une telle relation avec la spermiogenèse s'observe chez Theromyzon rude (HAGADORN, 1962). De même un rapport avec la reproduction est observé par CZECHOWICZ (1963) chez Herpobdella octoculata, Herpobdella testacea et Glossiphonia complanata. Par contre TUMPLING (1965) n'observe pas de cycle dans les cellules neurosécrétrices de Theromyzon tessulatum, Glossiphonia complanata, Herpobdella octoculata et Piscicola geometra. DAMAS chez Glossiphonia complanata pense que les variations qu'elle observe sont en relation avec l'ovogenèse.

Aucune conclusion ne peut être apportée au sujet de la signification physiologique des cellules 3. HAGADORN (1962) chez Theromyzon rude pense qu'une relation peut être établie entre leur activité et l'ovogenèse.

HAGADORN chez Theromyzon rude affirme que les 2 catégories cellulaires 1 et 2 représentent deux étapes d'un même cycle sécrétoire. En effet

une augmentation de l'un des groupes se traduit par une diminution de l'autre. D'autre part, un seul type de granules est observé au microscope électronique dans ces neurones. Il tire les mêmes conclusions de l'étude histochimique réalisée chez H. medicinalis où ces 2 types ont la même composition. Nos observations confirment en partie ces résultats ; en effet seules les cellules du groupe 2 montrent nettement un passage d'un stade à l'autre.

H. medicinalis présente, comme nous l'avons constaté une grande sensibilité aux variations de température. Ce comportement est jusqu'à présent le seul constaté chez les Hirudinées. Theromyzon rude ne présente aucune modification des cellules neurosécrétrices lorsqu'elle est placée à -10° C ou élevée à la température du laboratoire (HAGADORN, 1958). De même aucune action de la température n'est observée par ZECHOWICZ (1963) et TUMPLING (1965).

HAGADORN (1962) observe une action de l'exposition à la lumière continue chez Theromyzon rude : les cellules neurosécrétrices s'engorgent et la reproduction est perturbée, par contre l'obscurité totale n'a aucune action. Chez H. medicinalis la spermiogenèse reprend dès que la température devient favorable, mais elle est peut être perturbée à l'obscurité continue. Cependant aucune différence nette n'est constatée au niveau des cellules neurosécrétrices des animaux placés à l'éclairement naturel et de ceux maintenus à l'obscurité continue. TUMPLING n'observe aucune action de la lumière sur la neurosécrétion des espèces qu'il étudie. Dans les autres classes d'Annélides, une action de la lumière est probable sur les cellules neurosécrétrices. Chez les Polychètes, HAUVEN^SCHILD (1955-61) montre une action nette de la photopériode sur l'épitoque et la gamétogenèse, N. DHAINAUT-COURTOIS (1965) trouve un organe photorécepteur dans le cerveau de Nereis pelagica et pense que la lumière intervient dans l'activité des cellules neurosécrétrices (1966b). M. CADARIU (1966) constate chez l'Oligochète Octolasma lacteum une hypersécrétion des cellules à la lumière.

Chez H. medicinalis nos observations n'ont montré aucune différence entre l'activité des cellules neurosécrétrices des animaux dont l'intestin est rempli de sang et de ceux dont l'intestin est vide, ce qui confirme les observations de TUMPLING chez d'autres espèces.

II^e partie

ETUDE, EN CULTURE ORGANOTYPIQUE, DU
DETERMINISME ENDOCRINE DE LA
MATURATION GENITALE.

Dans ce travail, nous avons abordé l'étude de l'endocrinologie sexuelle de H. medicinalis par la méthode des cultures organotypiques, mise au point par Et. WOLFF et K. HAFEN (1952) chez les Vertébrés. Cette technique a déjà donné de bons résultats chez les Polychètes (M. DURCHON et F. SCHALLER, 1963) et les Oligochètes (DURCHON et SCHALLER, 1964 ; BERJON, ANDRE et MEUNIER, 1965 et MARCEL, 1967).

Nous envisagerons successivement :

- la recherche du milieu de culture et les techniques générales
- les résultats obtenus

I - RECHERCHE DU MILIEU DE CULTURE ET TECHNIQUES GENERALES

1 - Recherche du milieu de culture

Parmi les nombreux milieux testés, l'un d'eux dérivé de celui mis au point par SENDEL (1960) pour la culture de blastème de planaire nous a donné des résultats intéressants.

Sa composition est la suivante (MALECHA, 1965)

- Solution de Ringer (AMMON et KWIATKOWSKI, 1934)
glycogénée à 2 ‰ 4 gouttes
- Embryon de Poulet de 11 jours (Difco) dilué à
50 ‰ dans la solution physiologique glycogénée
à 2 ‰. 3 gouttes
- Spécilline G 100 U.I.
- Streptomycine 0,009 mg
- Gélose à 1 ‰ dans la solution glycogénée à 2 ‰. 5 gouttes

Les résultats obtenus sur ce milieu sont les suivants :

- Cultures de fragments de tégument avec muscles sous-jacents : la cicatrisation survient dans les 3 jours qui suivent la mise en culture et les explants sont maintenus en survie pendant plus de 2 mois.

- Cultures de l'ensemble oviducte - glande albumineuse-vagin : l'épithélium de l'oviducte présente une bonne survie pendant 13 jours et celui du vagin pendant 27 jours.

- Culture de l'ensemble atrium génital mâle - glande prostatique - pénis : l'épithélium de l'atrium et du pénis conserve sa structure normale après 13 jours de culture, il en est de même pour les cellules de la glande prostatique.

- Gonades : la structure ovarienne est conservée après 20 jours de culture. La survie des testicules est faible.

Ce milieu ne permet pas une survie suffisante des gonades et leur évolution. D'autre part, il n'a pas permis la culture du système nerveux. Nous avons donc recherché un milieu de culture mieux adapté aux études de l'endocrinologie sexuelle d'H. medicinalis

Le milieu qui remplit les conditions exigées est dérivé de celui employé par DURCHON et SCHALLER (1963) pour la culture d'Annélides Polychètes. Nous avons utilisé une solution de Ringer glucosée à 2 ‰, mise au point par NICHOLLS et KUFFIER (1964-65) pour des recherches électrophysiologiques chez H. medicinalis.

La composition de ce milieu est la suivante :

- Solution de Ringer pour H. medicinalis glucosée à 2 ‰ comprenant
 - . Na Cl 115 m M/l
 - . K Cl 4 m M/l
 - . Ca Cl₂ 1,8 m M/l 3 gouttes
- Albumine d'oeuf à 50 ‰ dans la solution de Ringer glucosée à 2 ‰ 3 gouttes
- Sérum de cheval (Difco) 1 goutte
- Embryon de poulet (Difco) à 50 ‰ dans la solution de Ringer glucosée 1 goutte
- Spécilline G 100 U.I.
- Streptomycine 0,009 mg
- Gélose à 1 ‰ dans la solution de Ringer glucosée 7 gouttes
- le pH est amené à 7,5 et contrôlé grâce à du rouge de phénol ajouté à la solution physiologique, à raison de 1 ‰ d'une solution à 0,05 ‰

L'emploi du rouge de phénol nous a permis, au cours des différents tests de milieux, d'avoir un pH constant. Comme nous le verrons ultérieurement, les explants sont de grande taille et provoquent une acidification très rapide du milieu. La présence de l'indicateur coloré nous permet de faire des

repiquages au moment opportun.

Le milieu de DURCHON et SCHALLER s'adapte donc très bien aux cultures organotypiques d'Invertébrés comme le montre en outre son utilisation pour les recherches endocrinologiques chez les Mollusques Gastéropodes (CHOQUET, 1964) et Céphalopodes (DURCHON et RICHARD, 1967).

2 - Techniques générales de mise en culture

Les donneurs sont isolés quelques jours avant la mise en culture en eau déchlorée, stérile, additionnée de Spécilline G (500 UI/ml) et de Streptomycine (0,050 mg/ml). La dissection se fait dans la solution de Ringer glucosée, additionnée de Spécilline G (500 UI/ml) et de streptomycine (0,050 mg/ml). Les différentes opérations (préparation des milieux, prélèvement des explants) sont effectuées en salle stérile. Les cultures sont conservées à l'obscurité et à la température constante de 20° C.

Nous avons explanté in vitro :

- des testicules seuls
- des testicules associés au système nerveux central accompagné ou non des deux premiers ganglions segmentaires
- des ovaires seuls

II - RESULTATS

A- Testicules cultivés isolément

1 - Techniques

Les testicules prélevés sans les tissus périphériques survivent très mal. Nous les avons donc explantés avec un fragment de la paroi du corps ce qui entraîne, comme nous le verrons, une cicatrisation rapide. L'explant est débarrassé de toutes les parties du tube digestif qui peuvent encore y adhérer, et déposé face interne contre le milieu de culture.

L'étude histologique est faite après fixation au Bouin Hollande ou au Carnoy et coloration au glychémalum-éosine ou à l'hématoxyline de Regaud.

2 - Cicatrisation de l'explant

a) L'explant comprend, en partant de l'extérieur vers l'intérieur (Planche 16, fig. 1):

- l'épiderme constitué d'une seule couche de cellules

épithéliales aux membranes plus ou moins distinctes, au cytoplasme finement granuleux et possédant un noyau riche en chromatine et pourvu d'un nucléole. Ces cellules sont recouvertes à l'extérieur d'une cuticule ayant l'aspect d'une membrane anhiste. Cette cuticule présente sur toute sa surface de petits orifices correspondant à de nombreuses glandes cutanées.

- le derme formé de tissu fibreux entre l'épiderme et les muscles. Il est essentiellement composé d'une substance riche en mucopolysaccharides acides et de fibrocytes. Les cellules pigmentaires sont présentes dans cette zone.

- la musculature, très puissante, comprend :

- . une couche externe de muscles circulaires
- . une couche interne de muscles longitudinaux
- . et entre les deux une couche de muscles obliques.

Il existe également des muscles dorso-ventraux.

- le mésenchyme : composé essentiellement de fibres conjonctives bipolaires : cellules présentant des prolongements fibrillaires. On y rencontre également des cellules graisseuses et pigmentaires.

- de nombreuses sections de capillaires sanguins bordés de cellules botryoïdes remplies de granulations brunes.

- le testicule

b) Observations macroscopiques :

Dans les 24 heures qui suivent la mise en culture, l'épiderme se replie sur la face interne de l'explant qui s'arrondit. Au bout de deux à trois jours, apparaît une membrane translucide entourant tous les tissus mis à nu. Autour de l'épiderme en place, on observe parfois une dispersion des cellules pigmentaires qui ont tendance à s'isoler vers l'extérieur et il est possible d'en voir quelques uns dans la membrane de cicatrisation. Dans la plupart des cas, l'extension des chromatophores est très réduite (200 à 300 μ de l'épiderme en place).

Pendant toute la durée de la culture, les contractions musculaires et la sécrétion des glandes tégumentaires persistent. Cette étude macroscopique met en évidence, d'une part la cicatrisation rapide de l'explant et d'autre part sa survie fonctionnelle.

c) Etude histologique

L'évolution de la cicatrisation a été suivie sur des explants fixés à intervalles réguliers. Après 24 heures de culture, apparaît autour de l'explant, une membrane cicatricielle raccordée à l'épiderme en place ; elle ne recouvre à ce stade qu'une partie variable des tissus mis à nu. Elle est généralement formée de plusieurs couches de cellules fusiformes de 1,5 à 2 μ de large sur 15 à 30 μ de long et possédant un noyau ovoïde de 1,5 à 2 μ de large sur 4,5 à 6,5 μ de long avec peu de chromatine. Leur cytoplasme contient souvent des granules pigmentaires (Planche 14, fig. 2). Simultanément, apparaissent sur l'explant d'autres zones où l'épaisseur de ces cellules est importante et d'où part la cicatrisation (Planche 14, fig. 3). Généralement, l'enveloppement de l'explant par ces petites cellules fusiformes est terminé au bout de trois jours de culture. En outre, les noyaux de l'épiderme en place près des tissus à nu migrent en surface dès le premier jour de culture (Planche 14, fig. 1). Ces cellules épidermiques semblent glisser au-dessus de celles précédemment décrites. Lorsque la culture se poursuit au delà d'une semaine, l'explant se trouve enveloppé par une seule couche de cellules fortement éosinophiles. Les cellules qui la composent sont de grande taille et plus denses près de l'épiderme en place où elles sont de forme plus ou moins quadrangulaire (Planche 14, fig. 4). Celles qui sont plus éloignées sont fusiformes : $\left\{ \begin{array}{l} 15 \text{ à } 30 \mu \text{ de long sur } 4,5 \text{ à } 6,5 \mu \text{ de large} \\ \text{noyau : } 5 \text{ à } 9 \mu \text{ de long sur } 2,5 \text{ à } 5 \mu \text{ de large} \end{array} \right.$

Après 7 jours de culture, cette couche monocellulaire éosinophile enveloppe totalement l'explant et les mitoses, absentes au début, deviennent de plus en plus abondantes (Planche 14, fig. 4 ; Planche 16, fig. 1).

d) Discussion

Au cours de cette étude, plusieurs problèmes se sont posés :

- l'origine des cellules de cicatrisation
- l'origine des cellules pigmentaires
- le rôle de la membrane de cicatrisation dans la survie du testiculé

- Origine des cellules de cicatrisation

L'étude histologique montre l'apparition de deux types cellulaires, d'une part des cellules fusiformes qui produisent un premier recouvrement des tissus à nu, puis des cellules plus grandes, éosinophiles, qui

donnent la membrane de cicatrisation définitive.

Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer la formation de cette membrane de cicatrisation définitive

- d'une part, elle serait formée en majeure partie par la différenciation des petites cellules fusiformes qui apparaissent même en l'absence des téguments superficiels (Planche 14, fig. 2 et 3). Dans ce cas, les cellules épidermiques participent à la formation de la membrane de cicatrisation près de l'épithélium en place.

- d'autre part, elle se ferait en deux temps : d'abord enveloppement par les petites cellules fusiformes puis recouvrement de ces dernières par une couche de cellules venant de l'épiderme en place et se multipliant par mitoses.

Ce deuxième mode de formation nous semble le plus vraisemblable. Des études d'incorporation de thymidine tritiée n'ont apporté aucune indication susceptible de résoudre ce problème. SCRIBAN et AUTRUM étudiant la cicatrisation des plaies chez H. medicinalis signalent qu'elle se fait par migration de cellules épithéliales venant de la périphérie, ce qui est conforme à la deuxième hypothèse. Ils n'observent jamais de mitoses. Sur les autres milieux testés, aucune mitose n'a été enregistrée. Comme les auteurs précédents, nous n'avons jamais observé de différenciation des cellules de cicatrisation en cellules glandulaires.

- Origine des cellules pigmentaires

Au cours de la cicatrisation, il se produit un remaniement des téguments en place. Certaines cellules pigmentaires doivent être entraînées par les cellules épidermiques (Planche 14, fig. 1). Cette progression doit être uniquement passive, ce qui explique leur faible extension.

- Rôle de la membrane de cicatrisation dans la survie du testicule

En l'absence de la membrane de cicatrisation la survie du testicule est médiocre. Comme il est très sensible aux variations de la pression osmotique, il est possible que cette membrane de cicatrisation joue un rôle non négligeable dans la régulation de celle-ci en isolant le testicule du milieu de culture.

e) Conclusion

Cette étude met en évidence :

- une cicatrisation rapide de l'explant, qui se fait probablement à partir de l'épiderme en place
- une apparition tardive de mitoses dans ce processus.

Il faut en outre signaler l'importance de cette cicatrisation pour la survie de l'explant.

3 - Résultats des cultures de testicules isolés

L'étude a porté sur des testicules de sangsues maintenues depuis fin Février à 6 - 7° C et à l'obscurité, et placées ou non quelques jours à la température du laboratoire avant la mise en culture. Sur les 18 testicules d'un animal, quelques-uns sont fixés comme témoins le jour de la mise en culture, les autres sont explantés in vitro et fixés à intervalles réguliers.

Le critère macroscopique le plus sûr d'une bonne survie est le maintien des mouvements de cyclose du contenu testiculaire, dûs probablement aux cellules ciliées tapissant la paroi interne des sacs testiculaires.

a) Testicules de sangsues isolées jusqu'à la mise en culture à 6 - 7° C et à l'obscurité

Au moment de l'explantation le contenu testiculaire est uniquement composé des stades 1 et 2 (Planche 16, fig. 2 et Planche 17, fig. 1). Le tableau 7 et la planche 15 rendent compte de l'évolution de tels testicules provenant d'une même sangsue et cultivés in vitro pendant 7, 14 et 21 jours.

Nous constatons, après 7 jours de culture, une légère augmentation du nombre des stades 2 et notamment des 2 b. Ensuite, ce dernier stade est phagocyté activement et disparaît. Les stades 3 apparaissent au bout de la première semaine de culture et leur nombre augmente ensuite. Quelques uns d'entre eux donnent des spermatozoïdes au cours de la troisième semaine de survie in vitro. Dans les derniers testicules fixés ne coexistent que des spermatogonies, des spermatides et des spermatozoïdes (Planche 16, fig. 3). Les spermatogonies continuent à se diviser et la densité du contenu testiculaire diminue nettement (Planche 16, fig. 3) en ce qui concerne les éléments

Tableau 7 : Evolution in vitro du contenu des testicules d'une sangsue élevée jusqu'à la mise en culture à 6 - 7° C et à l'obscurité.

Durée de culture	Nombre (ligne supérieure) et % des différents groupes isogéniques				Moyenne des pourcentages des différents groupes isogéniques			
	1	2	3	4	1	2	3	4
0 (Témoins)	:1107	: 261	:	:	:	:	:	:
	: 80,92	: 19,08	:	:	:	:	:	:
	:1111	: 219	:	:	:	:	:	:
	: 83,53	: 16,47	:	:	: 82,9	: 17,1	:	:
:1070	: 201	:	:	:	:	:	:	
: 84,18	: 15,82	:	:	:	:	:	:	
7 jours	:1157	: 386	:	:	:	:	:	:
	: 74,98	: 25,02	:	:	:	:	:	:
	:1162	: 365	: 1	:	:	:	:	:
	: 76,05	: 23,89	: 0,06	:	: 75,5	: 24,4	: 0,03	:
14 jours	: 791	: 58	: 10	:	:	:	:	:
	: 92,09	: 6,75	: 1,16	:	:	:	:	:
	: 889	: 69	: 7	:	:	:	:	:
	: 92,13	: 7,15	: 0,72	:	: 92	: 6,6	: 1,4	:
:1426	: 99	: 38	:	:	:	:	:	
: 91,71	: 5,95	: 2,34	:	:	:	:	:	
21 jours	: 649	: 31	: 8	: 0	:	:	:	:
	: 94,33	: 4,50	: 1,17	: 0	:	:	:	:
	: 307	: 9	: 53	: 9	:	:	:	:
	: 81,22	: 2,38	: 14,02	: 2,38	: 84,4	: 3,4	: 11,1	: 1,1
: 227	: 5	: 43	: 3	:	:	:	:	
: 81,66	: 1,79	: 15,47	: 1,08	:	:	:	:	
: 571	: 34	: 98	: 6	:	:	:	:	
: 80,54	: 4,79	: 13,82	: 0,85	:	:	:	:	

génitaux. Les phagocytes sont par contre très nombreux.

Cependant, l'évolution est légèrement différente selon que les testicules, au moment de la mise en culture, contiennent peu ou beaucoup de stades 2 b. Dans le cas où la richesse en stades 2 b est grande (Planche 17, fig. 1) l'évolution est plus rapide et le nombre de groupes achevant leur maturation est plus important (tableau 8 et planche 17, fig. 2) que dans le cas contraire (tableau 9).

Il faut remarquer qu'en partant d'un contenu testiculaire commun au moment de la mise en culture, l'évolution des explants est très différente (Tableaux 7, 8 et 9). On peut invoquer pour expliquer cela des différences de réactions individuelles aux conditions de survie in vitro.

b) Testicules de sangsues élevées à 6 - 7° C puis pendant 7 jours à la température du laboratoire avant la mise en culture

Comme le montrent le tableau 10 et la planche 18, les stades 3 qui se trouvaient dans le testicule au moment de la mise en culture achèvent leur maturation. Un nombre assez important de groupes isogéniques des stades 2 b évoluent en stades 3 dès la première semaine de survie in vitro. Par la suite les gamétocytes mâles en prophase de méiose disparaissent totalement dans trois cas sur quatre ; ceux qui restent sont généralement pycnotiques et en voie de phagocytose. Le pourcentage des stades 2 a diminue légèrement. Ici, comme précédemment, les stades 3 qui donnent des spermatozoïdes ne sont pas remplacés.

Un résultat identique a été obtenu avec les testicules de deux autres sangsues dans les mêmes conditions.

c) Discussion

Les expériences d'ablation de cerveau pratiquées par HAGADORN (1966 b, c) donnent les résultats suivants :

- augmentation du nombre des "amibocytes" à l'intérieur des testicules
- diminution du nombre total des groupes isogéniques. Elle est particulièrement nette pour les stades 3 et 4.

Nos propres observations sur des cultures de testicules en milieu an hormonal montrent :

- une augmentation des phagocytes mais il ne nous semble pas

Tableau 8 : Etat du contenu des testicules d'une sangsue élevée à 6 - 7° C et à l'obscurité jusqu'à la mise en culture après 14 jours de culture in vitro. Lors de l'explantation les testicules contiennent de nombreux stades 2 b.

Durée de culture	Nombre (ligne supérieure) et pourcentage des différents groupes isogéniques				Moyenne des pourcentages des différents groupes isogéniques					
	1	2 a	2 b	3	4	1	2 a	2 b	3	4
0 (Témoin)	532	54	92			78,5	7,9	13,6		
	73,5									
14 jours	936	87	2	30	1					
	88,63	8,24	0,19	2,84	0,10					
	1036	59	4	45	34					
	88,46	4,80	0,33	3,66	2,77					
						71,7	3,7	0,9	16,7	7,0
	457	12	0	107	98					
	67,80	1,78	0	15,88	14,54					
	154	0	11	164	39					
	41,85	0	3	44,56	10,59					

Tableau 9 : Etat du contenu des testicules d'une sangsue élevée jusqu'à la mise en culture à 6 - 7° C et à l'obscurité, après 14 jours de culture in vitro. Lors de l'explantation les testicules contiennent peu de stades 2 b.

Durée de culture	Nombre (ligne supérieure) et pourcentage des différents groupes isogéniques					Moyenne des pourcentages des différents groupes isogéniques				
	1	2 a	2 b	3	4	1	2 a	2 b	3	4
0 (Témoins)	525	56	1							
	90,21	9,62	0,17							
	777	76	3							
	90,77	8,88	0,35							
						90,5	9,2	0,3		
14 jours	908	91	3							
	90,62	9,08	0,30							
	814	85	2							
	90,34	9,44	0,22							
14 jours	945	43	15	135						
	83,04	3,78	1,32	11,86						
	779	31	1	4						
	95,58	3,81	0,12	0,49						
						91,5	3,7	0,8	4,0	
14 jours	1158	50	19	48						
	90,82	3,92	1,49	3,77						
	941	30	2	0						
	96,71	3,08	0,21	0						

Tableau 10 : Evolution *in vitro* du contenu des testicules d'une sangsue élevée d'abord à 6 - 7° C et à l'obscurité puis pendant les 7 jours précédant la mise en culture à la température du laboratoire et à l'éclairement naturel.

Durée de culture	Nombre (ligne supérieure) et pourcentage des différents groupes isogéniques					Moyenne des pourcentages des différents groupes isogéniques				
	1	2a	2 b	3	4	1	2 a	2 b	3	4
0 (Témoin)	563 55	46 4,5	226 22,1	188 18,4		55	4,5	22,1	18,4	
7 jours	720 60,45	42 3,53	28 2,35	401 33,67						
	557 57,42	36 3,71	28 2,89	349 35,98		57,3	4,4	2,7	35,6	
	678 61,64	59 5,36	27 2,45	336 30,55						
	561 49,60	59 5,22	34 3,00	477 42,18						
14 jours	537 47,60	28 2,48	0 0	56 4,97	507 44,95					
	752 48,83	43 2,79	0 0	85 5,52	660 42,86	50,3	2,8	0,1	6,1	40,7
	477 47,80	28 2,80	5 0,50	49 4,91	439 43,99					
	725 56,77	41 3,21	0 0	114 8,93	397 31,09					
21 jours	798 62,30	28 2,18	9 0,70	0 0	446 34,82					
	612 51,26	0 0	0 0	8 0,67	574 48,07	56,7	1,5	0,1	0,9	40,8
	692 52,50	17 1,29	0 0	0 0	609 46,21					
	456 60,56	19 2,52	0 0	21 2,79	257 34,13					

certain, qu'en culture, elle soit due à une infiltration au travers de l'enveloppe testiculaire comme le pense HAGADORN. Il apparaît plutôt que cette augmentation n'est qu'apparente et due à la forte diminution du nombre des divers groupes isogéniques (Planche 16, fig. 3) qui est nettement sensible après 14 jours de culture (tableau 7).

En outre, nous constatons qu'en milieu an hormonal

- dans les testicules en repos génital, un certain nombre de groupes de stade 2 subissent la méiose et évoluent vers le stade 4
- les groupes isogéniques de stade 3 terminent leur maturation, qu'ils proviennent d'un testicule en repos ou en début d'activité génitale.
- au cours de la deuxième semaine de culture, les stades 2 b sont activement phagocytés
- quelques groupes de spermatogonies continuent à se diviser

Ces résultats mettent nettement en évidence une activation qui survient aux premiers jours d'explantation in vitro, et se traduit par le passage du cap de la méiose par un certain nombre de groupes isogéniques à partir du stade 2 et même probablement du stade 1. Cette activation cesse ensuite, les groupes ayant subi la méiose continuent à évoluer et les spermatogonies peuvent encore se diviser mais se montrent incapables de dépasser le stade 2 b.

Nous notons donc l'absence d'un facteur nécessaire au déroulement normal de la spermatogenèse. Les expériences d'HAGADORN (1966 b, c) montrent que l'injection d'homogénats de cerveaux chez les animaux opérés, pallie à l'ablation du système nerveux central.

Pour vérifier ces résultats, nous avons associé en culture in vitro, des testicules avec la masse nerveuse péri-oesophagienne, accompagnée ou non des deux premiers ganglions segmentaires.

B - Testicules cultivés en association avec le système nerveux central, accompagné ou non des deux premiers ganglions segmentaires

1 - Techniques

Les testicules d'une même sangsue sont partagés en trois lots, le premier est fixé comme témoin au moment de la mise en culture, le deuxième est explanté isolément in vitro, le troisième est associé à une masse nerveuse. Ils sont prélevés comme il a été décrit précédemment. Le système

nerveux central est explanté avec une partie du pharynx et les téguments dorsaux. Sa culture est relativement difficile, d'une part à cause de sa grande sensibilité aux conditions de culture, d'autre part, à cause des infections bactériennes inhérentes à la présence du pharynx. Nous avons pallié au premier problème par des repiquages quotidiens, mais le second n'est pas encore totalement résolu. En effet, à l'intérieur du pharynx, se développe un foyer d'infection apportant continuellement des bactéries qui, combattues au début par les antibiotiques du milieu de culture, provoquent à la longue une infection généralisée (vers le 6^e jour de culture). La désinfection du pharynx ou son excision se heurtent au problème de la survie de l'explant.

2 - Résultats

Deux types d'association ont été pratiqués :

- association avec le système nerveux central accompagné des 2 premiers ganglions segmentaires (tableau 11, planche 15)
- association avec uniquement le système nerveux central (tableau 12).

Dans les deux cas, les résultats sont identiques (Planche 16, fig. 4 et Planche 17, fig. 3). L'évolution de la spermatogenèse est normale. L'étude histologique met en évidence une maturation très rapide du contenu testiculaire avec présence de tous les stades et notamment des 2 b en grande proportion. La densité des éléments génitaux est normale ainsi que celle des phagocytes.

3 - Discussion

Ces résultats confirment ceux obtenus in vivo par HAGADORN (1966 b, c) et montrent que l'action seule du système nerveux central est nécessaire pour obtenir une spermatogenèse normale. HAGADORN (1966) déduit des résultats obtenus après injection d'homogénats de cerveaux que ces derniers exercent une influence gonadotrope de nature hormonale. Nos propres expériences confirment cette hypothèse en montrant que l'action du système nerveux central persiste en l'absence d'une continuité nerveuse entre ce dernier et le testicule.

L'hormone pourrait être émise par les cellules fuchsinophiles comme le pense HAGADORN, en effet, comme nous l'avons vu précédemment certaines d'entre elles sont activées lorsque la spermiogenèse reprend.

Tableau 11 : Etat du contenu des testicules associés à une masse nerveuse péri-oesophagienne et aux deux premiers ganglions segmentaires après 21 jours de culture. L'état du contenu des testicules de la même sangsue, cultivés isolément, est figuré sur le tableau 7.

Durée de culture	Nombre (ligne supérieure) et % des différents groupes isogéniques				Moyenne des pourcentages des différents groupes isogéniques			
	1	2	3	4	1	2	3	4
0 (Témoins)					82,9	17,1		
21 jours (testicules cultivés isolément)					84,4	3,4	11,1	1,1
21 jours (Testicules associés à la masse nerveuse péri-oesophagienne et aux 2 premiers ganglions segmentaires)	181 18,49	190 19,40	399 40,76	209 21,35	22,2	19	36,6	22,2

Tableau 12 : Etat du contenu des testicules associés à une masse nerveuse péri-oesophagienne après 14 jours de culture.

L'état du contenu des testicules de la même sangsue, cultivés isolément, est figuré sur le tableau 8

Durée de culture	Nombre (ligne supérieure) et pourcentage des différents groupes isogéniques					Moyenne des pourcentages des différents groupes isogéniques				
	1	2 a	2 b	3	4	1	2 a	2 b	3	4
0 (Témoin)						78,5	7,9	13,6		
14 jours (Testicules cultivés isolément)						71,7	3,7	0,9	16,7	7,0
14 jours (Testicules associés à la masse nerveuse péri-oesophagienne)	283 31,62	29 3,24	146 16,31	376 42,01	61 6,82	28,6	3,8	24,2	38,1	5,3
	268 25,55	46 4,38	336 32,03	358 34,13	41 3,91					

Nous pouvons constater que le cerveau est actif, bien qu'il provienne d'un animal en repos génital. Son activation doit être due au passage de 6 - 7° C à 20° C. Sa structure est conservée comme le montre l'étude histologique (Planche 19, fig.1-2), mais une survie de l'ordre de trois semaines semble être un maximum. Cette activité in vitro du système nerveux central est très intéressante car chez Theromyzon rude, HAGADORN (1962) ne constate aucune action des cerveaux qu'il implante à des sujets décérébrés, malgré une bonne survie confirmée par l'examen histologique. Par contre, l'injection d'homogénats de cerveau à des H. medicinalis décérébrées a un effet gonadotrope (HAGADORN, 1962 b, c). GERSCH et RICHTER (1961) étudiant l'adaptation chromatique chez Piscicola geometra, montrent qu'une greffe de collier périoesophagien à un animal qui en a été privé, est sans effet sur l'expansion des chromatophores, alors que l'injection d'extraits donne des résultats positifs.

Un problème se pose qui est de déterminer à quel stade de la spermatogenèse l'hormone cérébrale est nécessaire. Nous constatons que :

- chez les animaux maintenus à 6 - 7° C le stade le plus évolué observé, correspond à un début de prophase de méiose (stade 2 b)
- les testicules cultivés isolément montrent, au cours de la deuxième semaine de survie in vitro, une pycnose suivie d'une phagocytose active des stades 2 b, ce qui entraîne leur disparition presque totale.
- en milieu an hormonal, les spermatogonies peuvent se diviser et les spermatoocytes II et les spermatides terminent leur maturation. Ces observations nous permettent de supposer que l'action stimulatrice de l'hormone cérébrale est nécessaire pour que la mitose réductionnelle puisse s'effectuer normalement.

Un fait est cependant en contradiction avec cette hypothèse : dans le cas des testicules en phase de repos mis en culture isolément certains groupes isogéniques évoluent vers le stade spermatozoïde et subissent donc la méiose. Le même phénomène a été observé in vivo chez Theromyzon rude par HAGADORN (1962). Cet auteur pense qu'il s'agit là de groupes "activés" qui achèveraient leur maturation. Dans le cas présent, l'hypothèse d'une maturation déclenchée par le passage de 6 - 7° C à 20° C au moment de l'explantation n'est pas à exclure.

Des résultats assez proches ont été obtenus par HAGADORN chez

Theromyzon rude (1962) qui montre qu'en l'absence de cerveau la spermatogenèse est incapable d'atteindre le stade 4, stade précédant la spermiogenèse. Chez les Oligochètes, l'action stimulatrice sur la spermatogenèse de l'hormone cérébrale s'exerce au moment de la méiose chez Eisenia foetida (HERLIANT-MEEWIS, 1959) ou sur les mitoses en général chez Allolobophora icterica (SAUSSEY, 1963-66). Chez les Polychètes, HOWIE (1963-66) montre chez Arenicola marina une action gonadotrope du cerveau qui semble s'exercer à tous les niveaux, au cours de la spermatogenèse.

4 - Conclusion

Cette étude de la spermatogenèse nous a permis de vérifier in vitro les résultats obtenus in vivo chez H. medicinalis par HAGADORN (1966 b, c). Quelques précisions ont cependant pu être apportées :

- les testicules explantés isolément in vitro subissent une activation qui entraîne la maturation de quelques groupes isogéniques
- la maturation des spermatocytes II, des spermatides et la division des spermatogonies peuvent être obtenues en milieu an hormonal
- l'action de l'hormone gonadotrope s'exerce probablement au cours de la mitose réductionnelle.

C - Ovaires cultivés isolément

1 - Techniques

Les ovaires sont prélevés de la même manière que les testicules. Sur les deux ovaires d'une sangsue, l'un est fixé comme témoin le jour de la mise en culture, l'autre explanté in vitro.

2 - Résultats

Le meilleur critère macroscopique d'une bonne survie de l'explant consiste en mouvements du cordon ovarien dans l'ovisac.

L'étude histologique montre que la structure histologique est conservée après 21 jours de culture.

Les ovaires ^{sont} prélevés sur des sangsues maintenues jusqu'à la mise en culture à 6 - 7° C et à l'obscurité. Dans ce cas, les ovaires témoins ne contiennent jamais d'ovogonies en mitose. Cultivés isolément ces ovaires présentent généralement, dès la première semaine de culture, des mitoses goniales (Planche 17, fig. 4).

Ce résultat montre donc, qu'en milieu an hormonal, les divisions goniales peuvent se faire comme c'était le cas d'ailleurs pour les gaméto-cytes mâles.

Les études d'HAGADORN (1962) sur Theromyzon rude montrent que l'hormone cérébrale est nécessaire à l'évolution normale de l'ovogenèse. Dans le cas présent, une action identique est probable mais n'a pas encore été démontrée expérimentalement.

CONCLUSION

Cette étude a mis en évidence une action très nette de la température sur la gamétogenèse d'H. medicinalis, ce qui permet l'obtention d'animaux à différents stades d'évolution génitale à toute époque de l'année, facilitant ainsi l'étude de l'endocrinologie sexuelle chez cette espèce. Corrélativement à la reprise ou au maintien de la spermiogenèse, l'évolution des cellules fuchsinophiles et de quelques neurones du type β_2 , du système nerveux central, a été suivie et leur localisation précisée. Un organe neuro-hémal de type primitif a été observé au niveau de la commissure dorsale. La reprise de la spermiogenèse, chez des sangsues élevées d'abord à 6 - 7° C et à l'obscurité puis à la température du laboratoire à la lumière naturelle ou à l'obscurité continue, est accompagnée d'une diminution du matériel fuchsinophile de la commissure dorsale et d'un accroissement d'activité des cellules α , surtout de celles du groupe 2. La spermiogenèse continue a pour effet le maintien ou l'accroissement de l'activité des cellules fuchsinophiles du système nerveux central. Ces faits sont en faveur de l'hypothèse, émise par HAGADORN (1966 b, c), qui considère les péricaryones comme le lieu d'élaboration de l'hormone gonadotrope.

La mise au point d'un milieu de culture nous a permis de préciser et de vérifier les résultats obtenus in vivo par HAGADORN (1966 b, c) chez H. medicinalis. Le système nerveux central exerce une action stimulatrice sur la spermatogenèse, probablement au cours de la mitose réductionnelle. Par contre cette influence n'est nécessaire ni à la poursuite de l'évolution, lorsque le stade spermatocyte II est atteint, ni au maintien des mitoses goniales mâles et femelles. Cependant en milieu an hormonal les testicules présentent les premiers jours de culture in vitro une activation qui pourrait être due au passage de 6 - 7° C à 20° C au moment de l'explantation. La cicatrisation des explants dont l'étude a été abordée est probablement due à une migration de cellules épidermiques et son rôle dans la survie des organes semble important.

BIBLIOGRAPHIE

- AMMON (R.) et KWIATKOWSKI (H.), 1934 - Die Bildung von Acetylcholin in Serum und embryonalextrakt.
Pflüger Archiv., t. 234, p. 269-272.
- BERJON (J.J.), ANDRE (F.) et MEUNIER (J.M.), 1965 - Culture organotypique sur milieux artificiels de la région endocrine du cerveau du lombricien Eisenia foetida (Sav.)
C.R. Soc. Biol., t. 159, n° 1, p. 139-141.
- BIANCHI (S.), 1964 a - Neurosecrezione e sostanze fenoliche nei gangli degli Anellidi. I. Ricerche sugli Irudinei (Hirudo medicinalis).
Att. Soc. Peloritana Sc. fis. mat. nat., vol. 10, p. 287-300.
- BIANCHI (S.), 1964 b - Istochimica del neurosecreto delle cellule nervose di Hirudo medicinalis.
Att. Soc. Peloritana Sc. fis. mat. nat., vol. 10, p. 319-325.
- BIANCHI (S.), 1967 a - On the different types of fluorescent neurons in the leech (Hirudo medicinalis).
Att. Soc. Peloritana Sc. fis. mat. nat., vol. 13, p. 39-47.
- BIANCHI (S.), 1967 b - Sulla secrezione monoaminica dei gangli nervosi di Hirudo medicinalis.
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., vol. 43, p. 1-2.
- BIANCHI (S.), 1967 c - The amine secreting neurons in the central nervous system of the earthworm Octolasion complanatum and their possible neurosecretory role.
Gen. and Comp. Endocrinol., t. 9, p. 343-348.

- BOBIN (G.) et DURCHON (M.), 1953 - Sur le cerveau d'une Annélide en voie de transformation hétéronéréidienne (Perinereis cultrifera Grube) et sur le déroulement d'un phénomène neurosécréteur.
Arch. Anat. micr. Morph. exp., t. 42, p. 112-126.
- CADARIU (M.), 1966 - Influenta unor factori experimentali asupra neurosecretiei la Lumbricide.
Stud. Univ. Babes-Bolyai Sci. Biol., t. 11, p. 87-97.
- CHOQUET (M.), 1964 - Culture organotypique de gonades de Patella vulgata L. (Mollusque Gastéropode Prosobranchie).
C.R. Acad. Sc., t. 258, p. 1089-1091.
- CLARK (R.B.), 1955 - The posterior lobes of the brain in Nephtys and the mucous glands of the prostomium.
Quart. J. micr. Sci., t. 96, p. 545-565.
- CZECHOWICZ (K.), 1961 - Studies on the distribution of nucleic acid in the neurosecretory cells of the central nervous system in some leeches.
Zool. Poloniae, t. 2, p. 91-100.
- CZECHOWICZ (K.), 1963 - Neurosecretion in leeches and the annual cycle of its changes.
Zool. Poloniae, t. 13, p. 163-184.
- COGGESHALL (R.E.) et FAWCETT (D.W.), 1963 - The fine structure of the central nervous system of the leech, Hirudo medicinalis.
J. Neurophysiol., t. 27, p. 229-289.
- DAMAS (D.), 1966 - Phénomène neurosécrétoire en rapport avec la reproduction de Glossiphonia complanata (L.) (Hirudinée, Rhynchobdelle).
Bull. Soc. Zool. France, t. 91, p. 613-621.

- DHAINAUT-COURTOIS (N.), 1964 - Données histologiques sur les phénomènes neuro-sécrétoires chez les Néréidiens.
Congrès de l'A.F.A.S., Mém. Soc. Sc. Nat. et Math. de Cherbourg,
t. 51, p. 123-128.
- DHAINAUT-COURTOIS (N.), 1965 - Sur la présence d'un organe photorécepteur dans le cerveau de Nereis pelagica L. (Annélide Polychète).
C.R. Acad. Sc., t. 261, p. 1085-1088.
- DHAINAUT-COURTOIS (N.), 1966 a - Le complexe cérébro-vasculaire de Nereis pelagica L. (Annélide Polychète). Données histologiques et ultrastructurales.
C.R. Acad. Sc., t. 262, p. 2048-2051.
- DHAINAUT-COURTOIS (N.), 1966 b - Etude histologique des cellules nerveuses du cerveau de Nereis pelagica L. (Annélide Polychète).
C.R. Acad. Sc., t. 263, p. 1596-1599.
- DOGRA (G.S.) et TANDON (B.K.), 1964 - Adaptation of certain histological techniques for in situ demonstration of the neuro-endocrine system of insects and other animals.
Quart. J. micr. Sci., vol. 105, p. 455-466.
- DURCHON (M.), 1951 - L'ablation du prostomium provoque chez les Néréidiens la maturation précoce des produits génitaux mâles.
C.R. Acad. Sc., t. 232, p. 442-443.
- DURCHON (M.), 1952 - Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les Annélides Polychètes : l'épitoque et la stolonisation.
Ann. Sc. nat. Zool. et Biol. animale, t. 14, p. 119-206.
- DURCHON (M.), 1964 - Résultats de cultures organotypiques chez les Annélides et les Mollusques Gastéropodes.
Bull. Soc. Zool. France, t. 89, p. 45-47.

- DURCHON (M.) et RICHARD (A.), 1967 - Etude en culture organotypique, du rôle endocrine de la glande optique dans la maturation ovarienne chez Sepia officinalis L. (Mollusque Céphalopode).
C.R. Acad. Sc., t. 264, p. 1497-1500.
- DURCHON (M.) et SCHALLER (F.), 1963 - Application de la méthode de culture organotypique aux recherches endocrinologiques chez les Annélides Polychètes.
C.R. Acad. Sc., t. 256, p. 5615-5617.
- GERSCH (M.) et RICHTER (K.), 1961 - Experimentelle Untersuchungen des physiologischen Farbwechsels von Piscicola geometra (Hirudinae).
Zool. Jb. Physiol., t. 69, p. 273-284.
- HAGADORN (I.R.), 1958 - Neurosecretion and the brain of the rhynchobdellid leech, Theromyzon rude (Baird).
J. Morph., t. 102, p. 55-90.
- HAGADORN (I.R.), 1962 - Neurosecretory phenomena in the leech, Theromyzon rude.
Mém. Soc. Endoc., t. 12, p. 313-321.
- HAGADORN (I.R.), 1962 - Functional correlates of neurosecretion in the rhynchobdellid leech, Theromyzon rude.
Gen. and Comp. Endoc., t. 2, p. 516-540.
- HAGADORN (I.R.), 1966 a - The histochemistry of the neurosecretory system in Hirudo medicinalis.
Gen. and Comp. Endoc., t. 6, p. 288-294.
- HAGADORN (I.R.), 1966 b - Neurosecretion in the Hirudinea and Its Possible Role in Reproduction.
Am. Zoologist., t. 6, p. 251-261.

- HAGADORN (I.R.), 1966 c - Hormonal control of spermatogenesis in Hirudo medicinalis.
IV^e Symposium International sur la Neurosecretion - Strasbourg,
p. 219-228, Springer-Verlag, New-York, paru 1967.
- HAGADORN (I.R.), BERN (H.A.) et NISHIOKA (R.S.), 1963 - The fine structure of the supraoesophageal ganglion of the rhynchobdellid leech, Theromyzon rude, with special reference to neurosecretion.
Z. Zellforsch., t. 58, p. 714-758.
- HALMI (N.S.), 1952 - Differentiation of two types of basophils in the adeno-hypophysis of the rat and mouse.
Stain. Technol., t. 27, p. 61-64.
- HAUENCHILD (C.), 1955 - Photoperiodizität als Ursache des von der Mondphase abhängigen Metamorphose Rhythmus bei dem Polychaeten Platynereis dumerilii.
Z. Naturforsch., t. 10, p. 658-662.
- HAUENCHILD (C.), 1956 - Neue experimentelle Untersuchungen zum Problem der Lunarperiodizität. Photoperiodizität als Ursache des lunaren Schwärmrhythmus bei dem Polychaeten Platynereis dumerilii.
Naturwiss., t. 16, p. 361-363.
- HAUENCHILD (C.), 1959 - Zyklische Veränderungen an den inkretorischen Drüsenzellen im Prostomium des Polychaeten Platynereis dumerilii als Grundlage der Schwärmperiodizität.
Z. Naturforsch., t. 14, p. 81-87.
- HAUENCHILD (C.), 1960 - Lunar periodicity.
Cold Spring Symposia, Quant. Biol., t. 25, p. 491-497.
- HERLANT-MEEWIS (H.), 1955 - Neurosécrétion chez les Oligochètes.
Acad. Roy. de Belgique, Bull. Cl. des Sc., t. 41, p. 500-508.

- HERLANT-MEEWIS (H.), 1959 - Phénomènes neurosécrétoires et sexualité chez Eisenia foetida.
C.R. Acad. Sc., t. 248, p. 1405-1407.
- HOWIE (D.I.D.), 1959 - The spawning of Arenicola marina L. I. The breeding season.
J. Mar. Biol. Ass. U.K., t. 38, p. 395-406.
- HOWIE (D.I.D.), 1961 - The spawning of Arenicola marina L. II. Spawning under experimental conditions.
J. Mar. Biol. Ass. U.K., t. 41, p. 127-144.
- HOWIE (D.I.D.), 1961 - The spawning of Arenicola marina L. III. Maturation and shedding of the ova.
J. Mar. Biol. Ass. U.K., t. 41, p. 771-783.
- HOWIE (D.I.D.), 1961 - Spawning mechanism in the mâle lugworm.
Nature, t. 192, p. 1100-1101.
- HOWIE (D.I.D.), 1962 - Neurosecretion in relation to spawning and maturation of the gametes in Arenicola marina L.
Gen. and Comp. Endoc., t. 2, p. 624.
- HOWIE (D.I.D.), 1963 - Experimental evidence for the humoral stimulation of ripening of the gametes and spawning in the Polychaete Arenicola marina L.
Gen. and Comp. Endoc., t. 3, p. 660-668.
- HOWIE (D.I.D.), 1966 - Further Data relating to the maturation hormone and its site of secretion in Arenicola marina Linnaeus.
Gen. and Comp. Endoc., t. 6, p. 347-361.
- HOWIE (D.I.D.) et Mc CLENAGHAN (C.M.), 1965 - Evidence for a feedback mechanism influencing spermatogonial division in the lugworm (Arenicola marina L.).
Gen. and Comp. Endoc., t. 5, p. 40-44.

- IONESCU VARO (M.) et GRIGORIU (A.), 1965 - La neurosécrétion chez Trocheta bukowskii Gedroyé (Glossiphoniidae).
Trav. Mus. Hist. Nat. "Grigore Antipa", t. 5, p. 99-105.
- KERKUT (G.A.), SEDDEN (G.B.) et WALKER (R.J.), 1967 - Cellular localization of monoamines by fluorescence microscopy in Hirudo medicinalis and Lumbricus terrestris.
Comp. Biochem. Physiol., G.B., t. 3, p. 687-690.
- KNOWLES (F.G.W.) et CARLISLE (D.B.), 1956 - Endocrine control in the Crustacea
Biol. Rev., t. 31, p. 396-473.
- LEGENDRE (R.), 1959 - Sur la présence de cellules neurosécrétrices dans les ganglions sous-oesophagiens de la sangsue médicinale (Hirudo medicinalis L.), suivie de quelques considérations sur la neurosécrétion.
Bull. Biol. France et Belgique, t. 93, p. 462-471.
- LEOPOLSEDER (F.), 1931 - Entwicklung des Eies von Clepsine nach Entfernung des Vegetativen Polplasmas.
Z. Wiss. Zool., t. 139, p. 201-248.
- LIVANOV (N.), 1904 - Untersuchungen zur Morphologie der Hirudineen. II. Das Nervensystem des Körperendes und seine Metamerie.
Zool. Jb. (Anat.), t. 20, p. 153-226.
- MALECHA (J.), 1965 - Culture organotypique d'Hirudinées.
C.R. Soc. Biol., t. 159, p. 1674-1675.
- MALECHA (J.), 1967 - Etude en culture organotypique de l'influence endocrine de la masse nerveuse péripharyngienne sur la maturation testiculaire chez Hirudo medicinalis L.
C.R. Acad. Sc., t. 265, p. 1806-1808.

- MARCEL (R.), 1966 - Rôle inducteur du cerveau au cours de la régénération du pharynx chez Eisenia foetida Sav. (Annélide Oligochète).
C.R. Acad. Sc., t. 262, p. 2470-2472.
- MISHRA (N.K.), 1967 - Neurosecretory Cells in the Ventral Nerve Cord of Leech (Hirudinaria granulosa).
Experientia, t. 23, p. 1055-1059.
- NAMBUDIRI (P.N.) et VIJAYAKRISHNAM (K.P.), 1958 - Neurosecretory cells of the brain of the leech Hirudinaria granulosa Sav.
Curr. Sc., t. 27, p. 350-351.
- NICHOLLS (J.G.) et KUFFLER (S.W.), 1964 - Extracellular space as a pathway for exchange between blood and neurons in the central nervous system of the leech : Ionic composition of glial cells and neurons.
J. Neurophysiol., t. 27, p. 645-671.
- NICHOLLS (J.G.) et KUFFLER (S.W.), 1965 - Na and K content of glial cells and neurons determined by flame photometry in the central nervous system of the leech.
J. Neurophysiol., t. 28, p. 519-525.
- PEREZ (H.V.Z.), 1942 - On the chromaffin cells of the nerve ganglia of Hirudo medicinalis L.
J. Comp. Neurol., t. 76, p. 367-401.
- SAUSSEY (M.), 1963 - Effets de la décérébration et de l'amputation caudale sur la spermatogenèse d'Allolobophora icterica Sav. (Oligochète Lumbricidae).
C.R. Acad. Sc., t. 257, p. 511-513.
- SAUSSEY (M.), 1966 - Contribution à l'étude des phénomènes de diapause et de régénération caudale chez Allolobophora icterica Sav. (Oligochète Lombricien).
Thèse Caen, Mém. Soc. Linn. de Normandie, Nouv. Sér., Sect. Zool., t. 3, p. 11-158.

- SCHARRER (B.), 1937 - Über secretorisch tätige Nervenzellen bei wirbellosen Tieren.
Naturwiss., t. 25, p. 131-138.
- SENGEL (C.), 1960 - Culture in vitro de blastème de régénération de planaires.
J. Embr. Exp. Morph., t. 8, p. 468-476.
- TUMPLING (W.), 1965 - Untersuchungen über Neurosekretion bei Hirudineen.
Z. Wissensch. Zool., t. 171, p. 1-43.
- WOLFF (Et.) et HAFFEN (K.), 1952 - Sur une méthode de cultures d'organes embryonnaires in vitro.
Texas Repts. Biol. and Med., t. 10, p. 463-472.

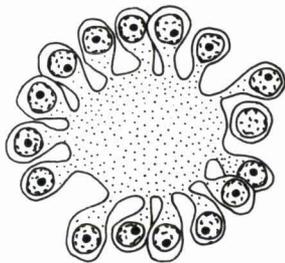
OUVRAGES GENERAUX

- DURCHON (M.), 1967 - L'endocrinologie des Vers et des Mollusques.
Masson et Cie, Paris.
- GABE (M.), 1967 - Neurosécrétion.
Gauthier-Villars. PARIS.
- GRASSE (P.P.), 1959 - Traité de Zoologie, t.V., fasc. 1, Masson et Cie, Paris.
- MANN (K.H.), 1962 - Leeches (Hirudinea).
Pergamon Press, Oxford.
- SCRIBAN (I.A.) et AUTRUM (H.), 1934 - Ordnung der Clitellata Hirudinea = Egel.
Dans Handbuch der Zoologie de KUKENTHAL (W.) et KRUMBACH (T.), t. 2,
fasc. 2, p. 119-352.

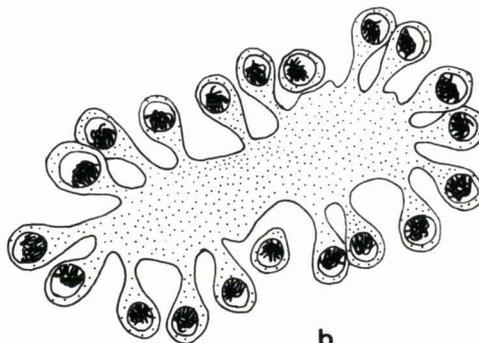
PLANCHES



stade 1



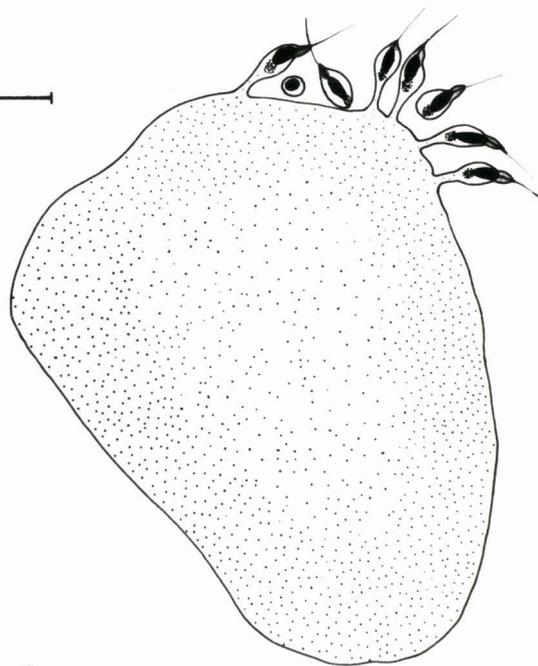
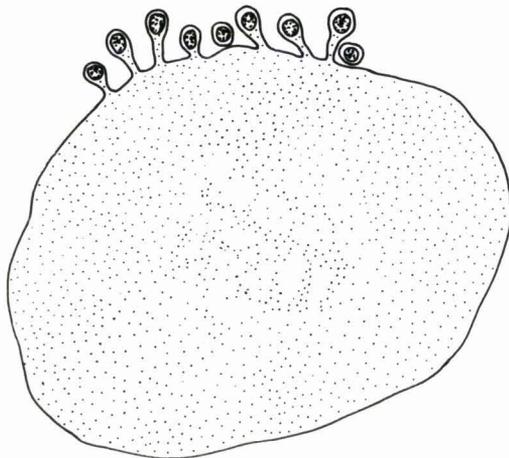
a



b

stade 2

20 P



stade 3

Planche 1 - Spermatogenèse - Stades 1 à 3

Pour le stade 3, les cellules génitales n'ont été représentées que sur une partie du cytophore

Planche 2

Fig. 1 : Coupe de testicule en spermiogenèse

1 : groupe isogènique du stade 1

2a : groupe isogènique du stade 2a

2b : groupe isogènique du stade 2b

3 : groupe isogènique du stade 3

4 : groupe isogènique du stade 4

(Fixation au Bouin-Hollande - coloration à l'hématoxyline de Regaud - épaisseur de la coupe 6 μ - G x 370).

Fig. 2 : Coupe passant par les 2 extrémités d'un ovaire

cg : cellule géante

m : mitose goniale

og : ovogonies

(Fixation au Carnoy - coloration au glychémalum_éosine - épaisseur de la coupe : 7 μ - G x 370)

Fig. 3 : Fraction de cordon ovarien (montage in toto)

co : cordon ovarien

oc : ovocyte en croissance

(Fixation au Carnoy - coloration au Carmin chlorhydrique - G x 150)

Fig. 4 : Coupe d'un ovisac

zd : zone de dégénérescence

zoc : zone à ovocytes

zog : zone à ovogonies

(Fixation au Carnoy - coloration au glychémalum_éosine - épaisseur de la coupe : 7 μ - G x 150).

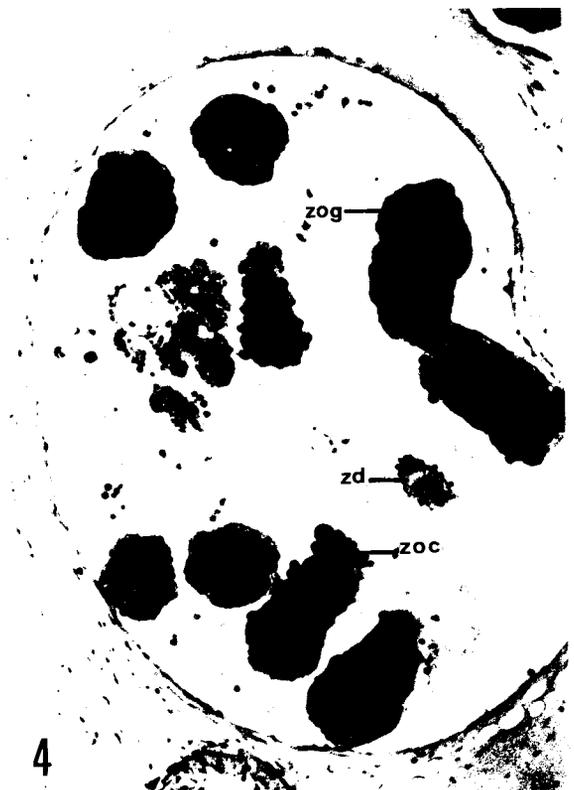
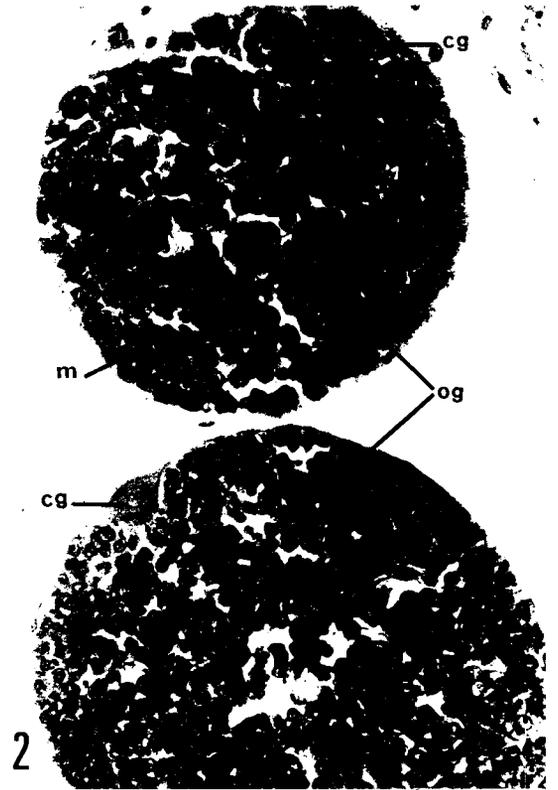
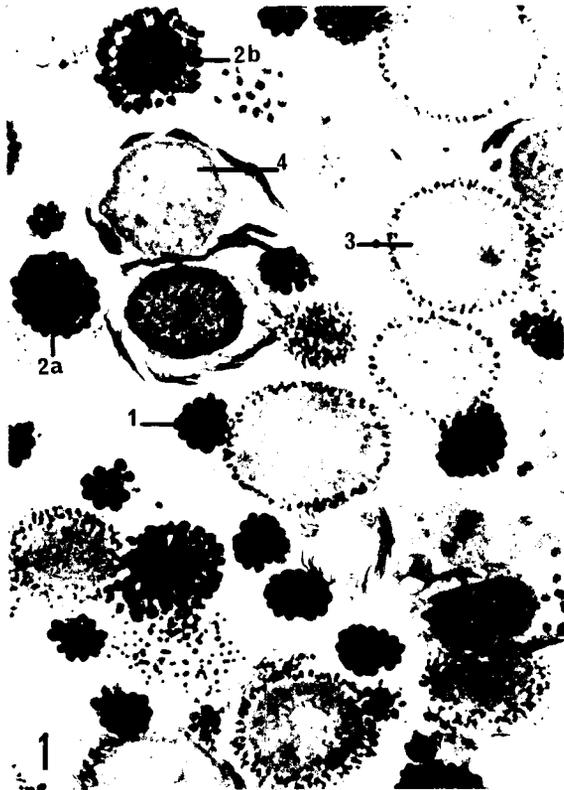


Planche 3

Fig. 1 : Coupe d'un testicule fixé en Mai (H. medicinalis élevée à 6 - 7° C et à l'obscurité).

cy : cytophore après phagocytose des spermatocytes I

Fig. 2 : Coupe de testicule d'H. medicinalis élevée d'abord à 6 - 7° C et à l'obscurité puis pendant 7 jours à la température du laboratoire et à l'éclairement naturel.

Fig. 3 : Coupe de testicule d'H. medicinalis élevée d'abord à 6 - 7° C et à l'obscurité puis pendant 14 jours à la température du laboratoire et à l'éclairement naturel.

Fig. 4 : Coupe de testicule d'H. medicinalis élevée d'abord à 6 - 7° C et à l'obscurité puis pendant 21 jours à la température du laboratoire et à l'éclairement naturel.

(Épaisseur des coupes : 7 μ - Fixation au Carnoy - Coloration au glycémalun-éosine - G x 370).

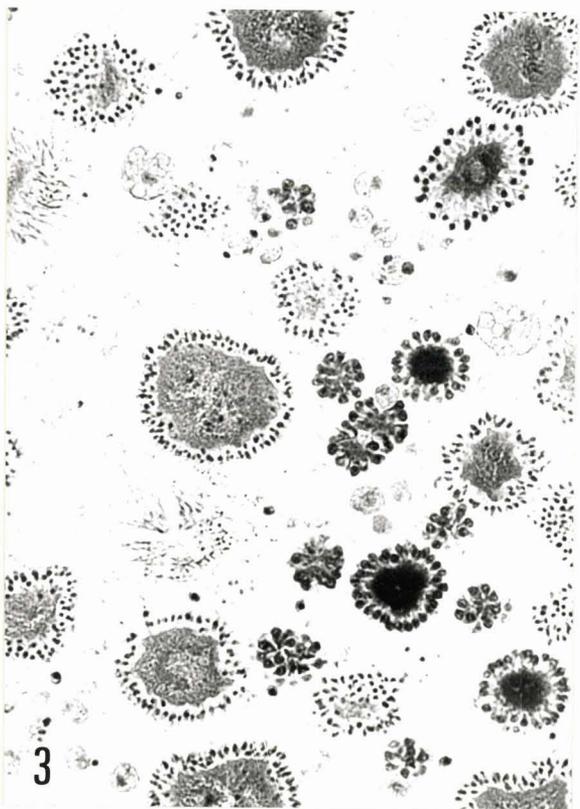
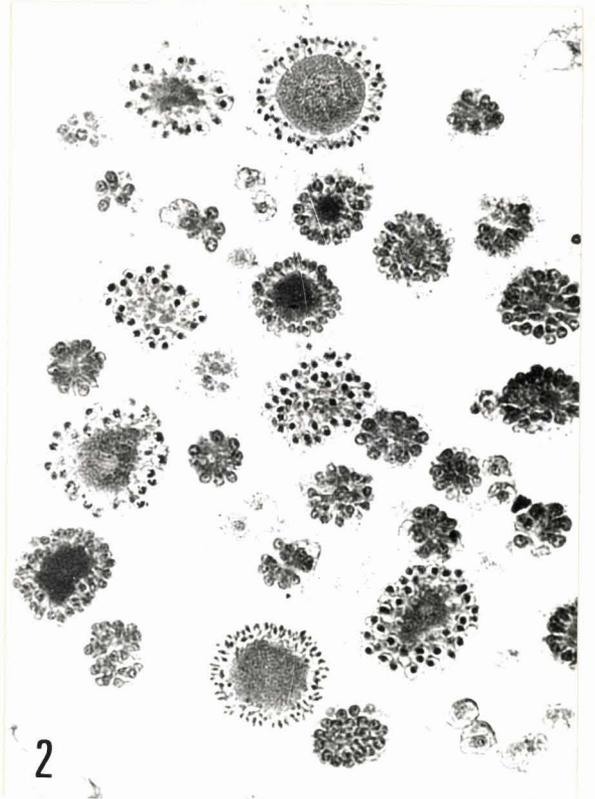
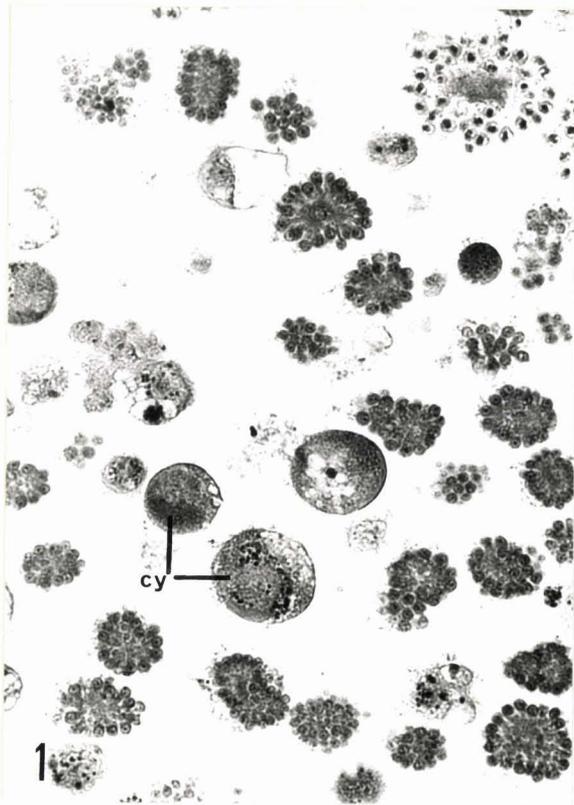


Planche 4

Evolution du contenu testiculaire d'H. medicinalis placées à la température du laboratoire et subissant l'éclairement naturel.

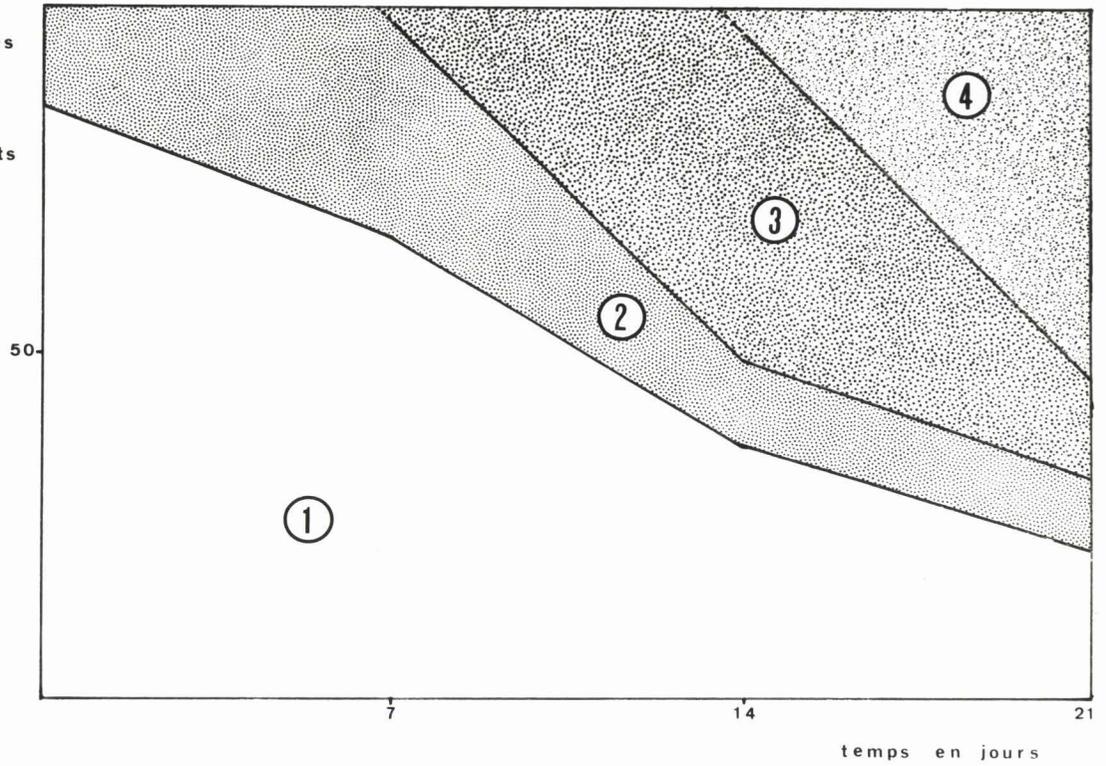
(Les chiffres cerclés de noir correspondent aux différents stades. Les lignes discontinues sont tracées arbitrairement).

Planche 5

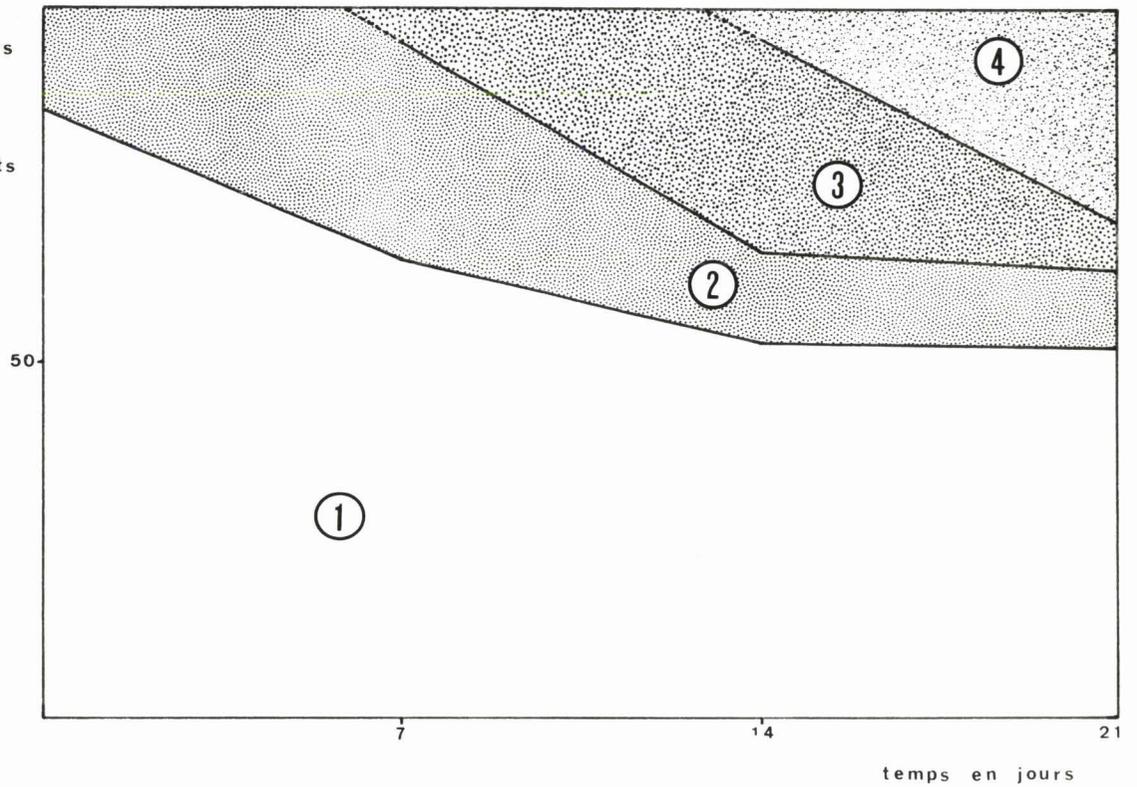
Evolution du contenu testiculaire d'H. medicinalis placées à la température du laboratoire et à l'obscurité continue.

(Les chiffres cerclés de noir correspondent aux différents stades. Les lignes discontinues sont tracées arbitrairement).

% des groupes
isogéniques
des différents
stades



% des groupes
isogéniques
des différents
stades



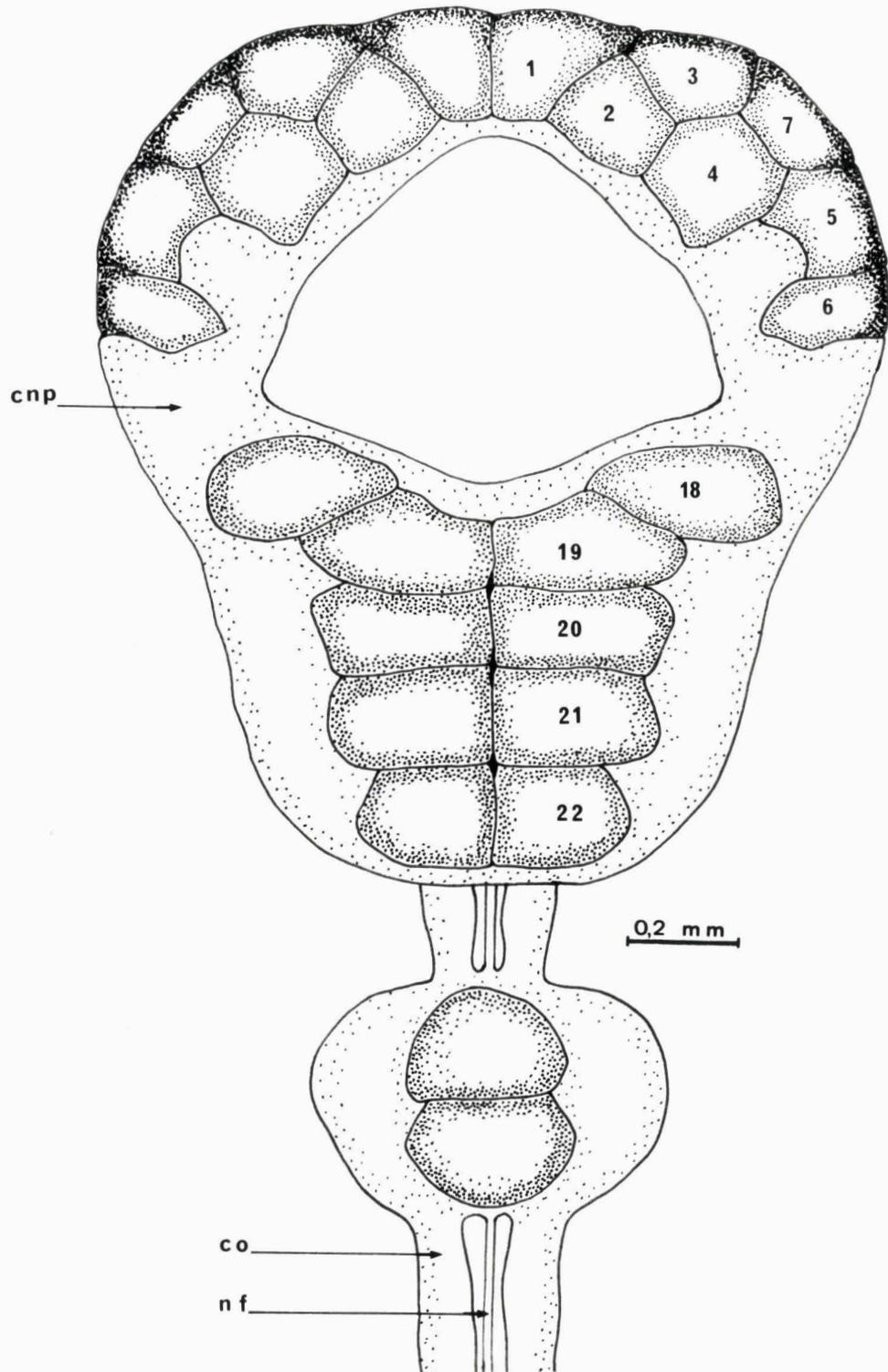


Planche 6

Collier péri-oesophagien et premier ganglion segmentaire en vue ventrale.

cnp : connectif péri-oesophagien

co : connectif interganglionnaire

nf : nerf de Faivre

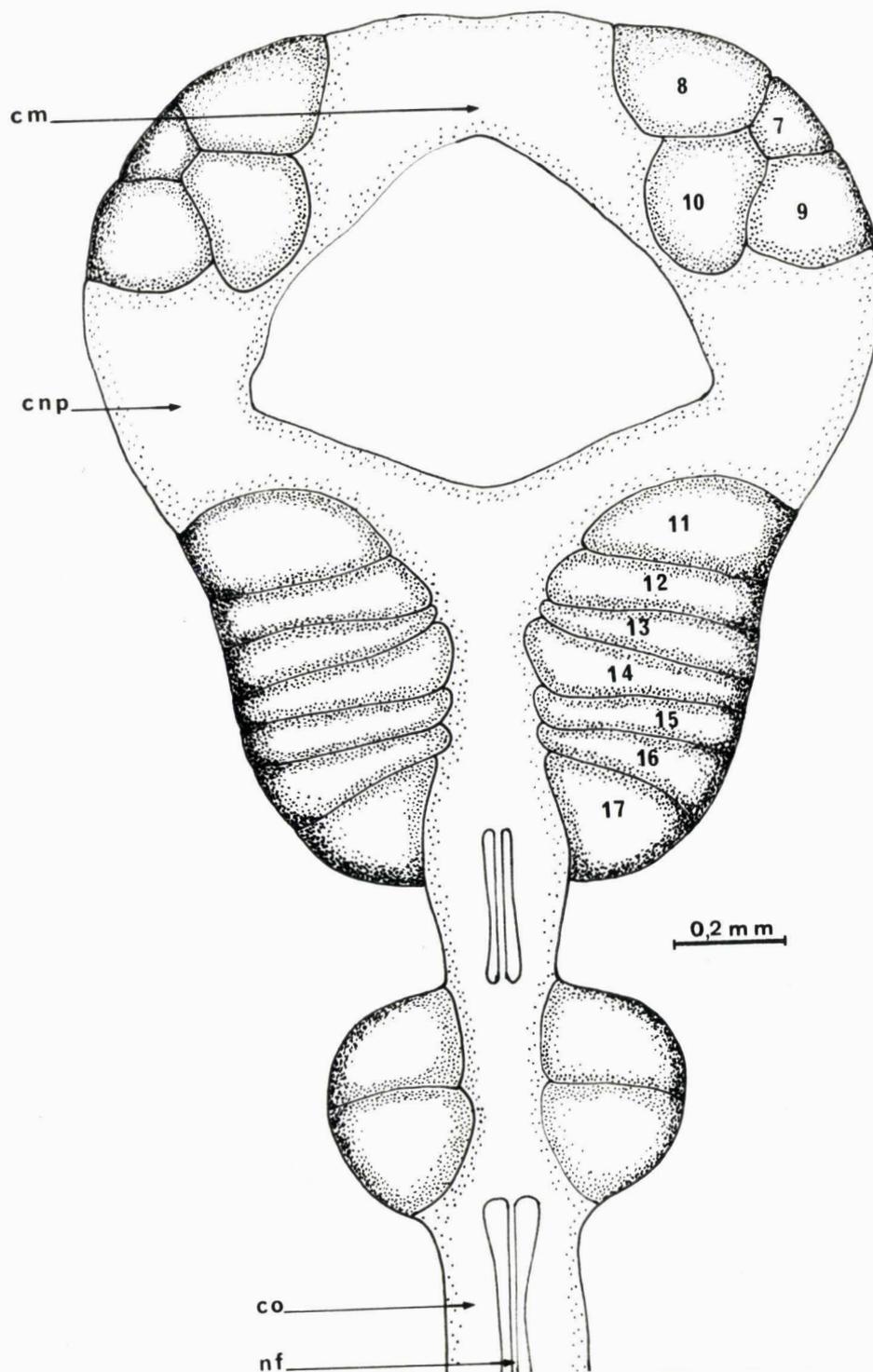


Planche 7

Collier péri-oesophagien et premier ganglion segmentaire en vue dorsale.

cm : commissure dorsale

cnp : connectif péri-oesophagien

co : connectif interganglionnaire

nf : nerf de Faivre

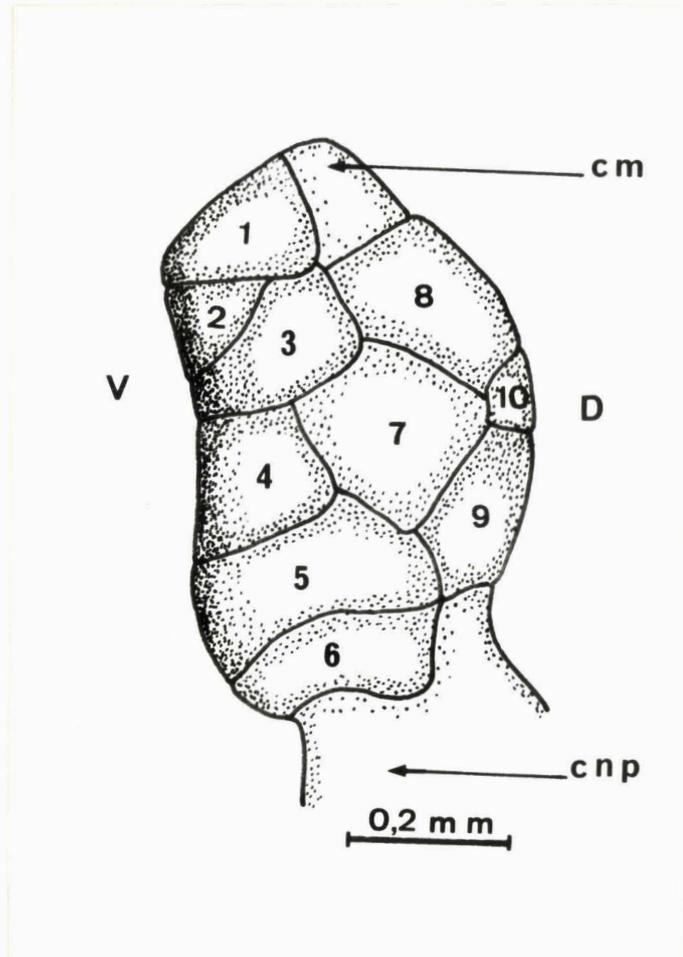


Planche 8

Vue latérale gauche d'un ganglion cérébroïde.

cm : commissure dorsale

cnp : connectif péri-oesophagien

D : face dorsale

V : face ventrale

Planche 9

Fig. 1 : Cellules neurosécrétrices α 1 (groupe 1) du follicule 8
(Coloration à la fuchsine paraldéhyde in situ. G x 150).

Fig. 2 : Cellules neurosécrétrices α des follicules 19 droit et gauche
(Coloration à la fuchsine paraldéhyde in situ. G x 150).

Fig. 3 : Cellule neurosécrétrice α du follicule 13.
(Coloration à la fuchsine paraldéhyde in situ. G x 150).

Fig. 4 : Cellule neurosécrétrice α 1 (groupe 1) du follicule 8.
Sangsue fixée en Septembre (G x 580).

Fig. 5 : Cellules neurosécrétrices α du groupe 2. Sangsue fixée en
Septembre. (G x 1500).

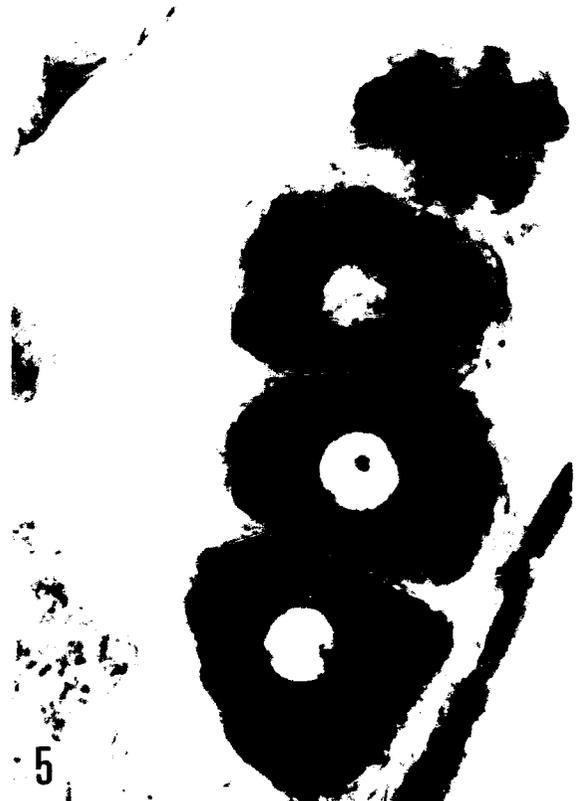
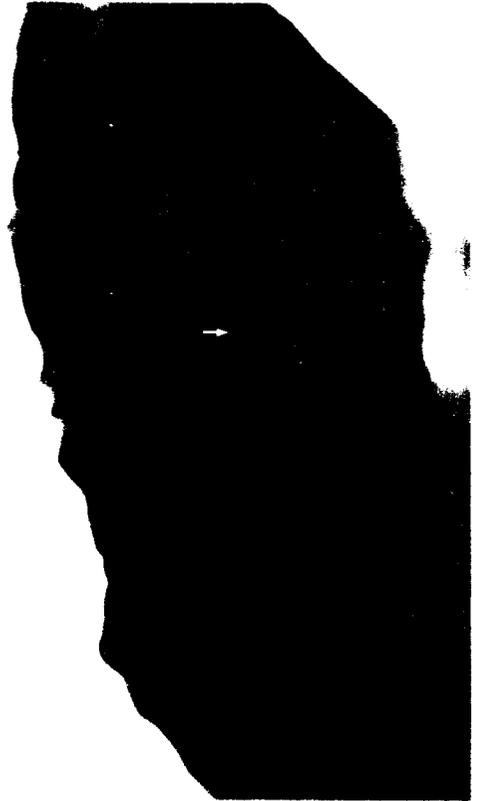


Planche 10

Fig. 1 : Cellules fuchsinophiles du groupe 3 d'un animal fixé en Septembre. (G x 1500).

Fig. 2 : Cellules fuchsinophiles du groupe 4 provenant d'un animal élevé d'abord à 6 - 7° C et à l'obscurité puis pendant 15 jours à la température du laboratoire. (G x 1500).

Fig. 3 : Cellule fuchsinophile du groupe 4 d'un animal fixé en Septembre. (G x 1500).

Fig. 4 : Cellule B_2 d'un animal fixé en Septembre. (G x 1500).

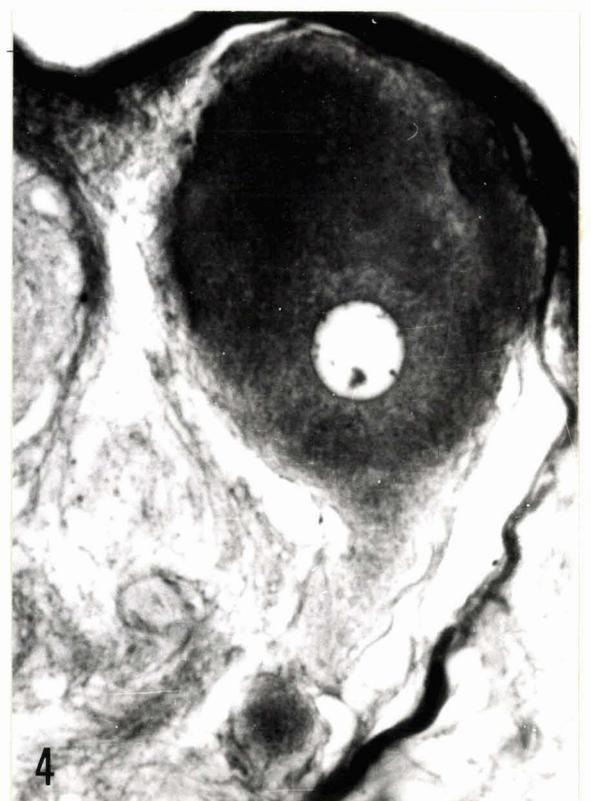
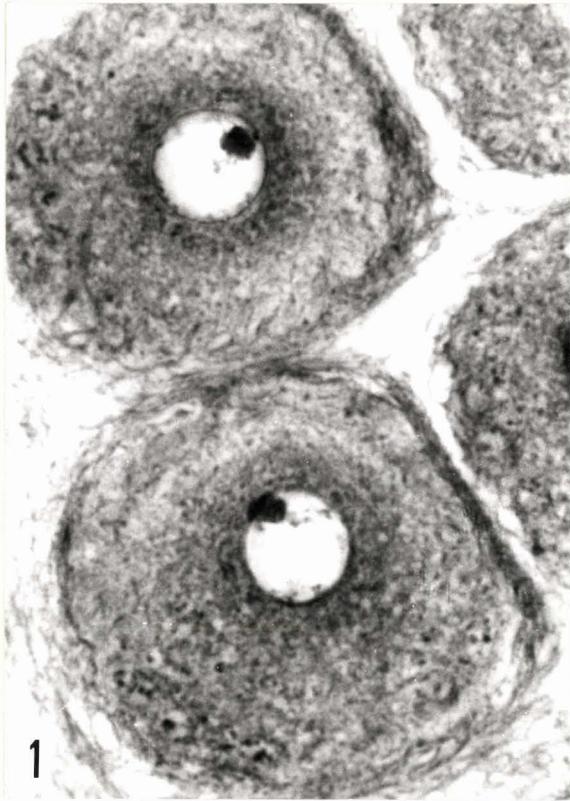


Planche 11

Fig. 1 : Commissure dorsale d'une sangsue élevée à 6 - 7° C et à l'obscurité de Février à Mai. (G x 580).

Fig. 2 : Commissure dorsale d'une sangsue élevée d'abord à 6 - 7° C et à l'obscurité puis pendant trois semaines à la température du laboratoire et à l'obscurité. (G x 580).

Fig. 3 : 6 cellules fuchsinophiles du groupe 2 d'une sangsue élevée de Février à Juin à 6 - 7° C et à l'obscurité. (G x 1500).

Fig. 4 : Cellule fuchsinophile du groupe 2 d'une sangsue élevée d'abord à 6 - 7° C et à l'obscurité puis 14 jours à la température du laboratoire et à l'obscurité. (G x 1500).

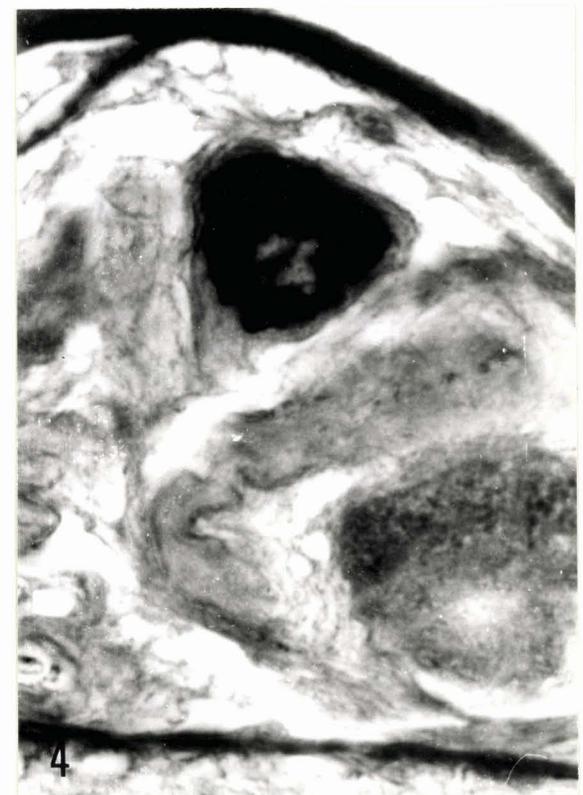
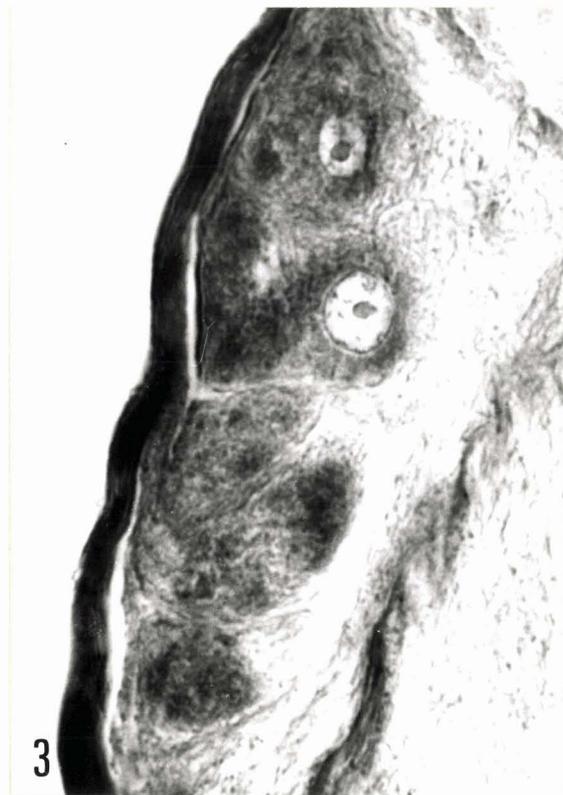
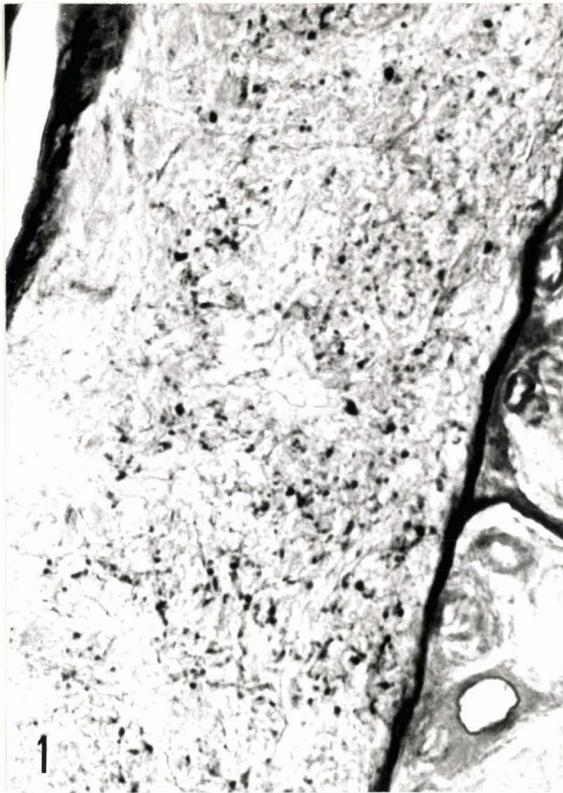


Planche 12

Fig. 1 : Cellule fuchsinophile du groupe 1 d'une sangsue élevée de Février à Mai à 6 - 7° C et à l'obscurité. (G x 1500).

Fig. 2 : Cellule fuchsinophile du groupe 3 provenant du même animal que la cellule précédente. (G x 1500).

Fig. 3 : Cellule fuchsinophile du follicule 19 d'une sangsue élevée de Février à Juin à 6 - 7° C et à l'obscurité. (G x 1500).

Fig. 4 : Cellule β_2 provenant du même animal que celles des figures 1 et 2. (G x 1500).



Planche 13

Fig. 1 : Cellule fuchsinophile du neuromère postérieur du ganglion sous-oesophagien d'une sangsue élevée de Février à Juin à 6 - 7° C et à l'obscurité. (G x 1500).

Fig. 2 : Cellule fuchsinophile du neuromère postérieur du ganglion sous-oesophagien d'une sangsue élevée de Février à Mai à 6 - 7° C et à l'obscurité puis pendant 14 jours à la température du laboratoire et à l'obscurité. (G x 1500).

Fig. 3 : Cellule fuchsinophile du follicule 13 d'une sangsue fixée en Septembre. (G x 1500).

Fig. 4 : Cellule fuchsinophile du follicule 13 d'une sangsue fixée en Janvier. (G x 580).

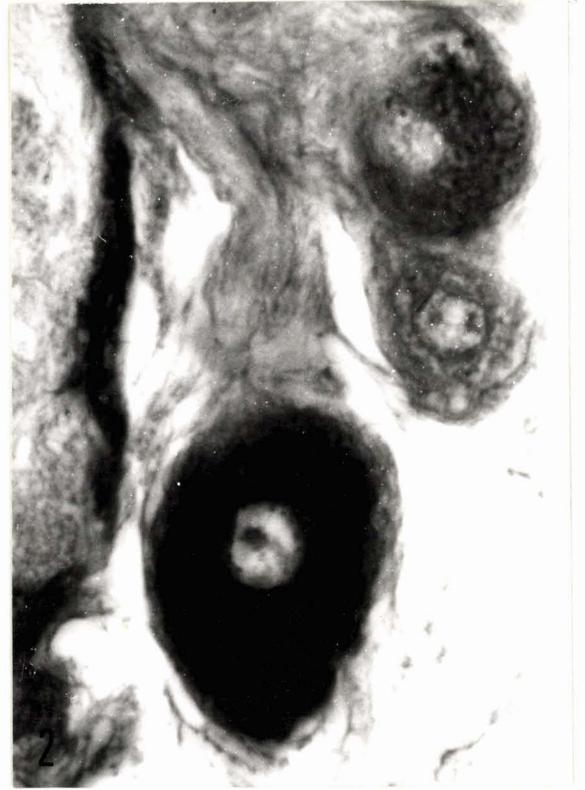
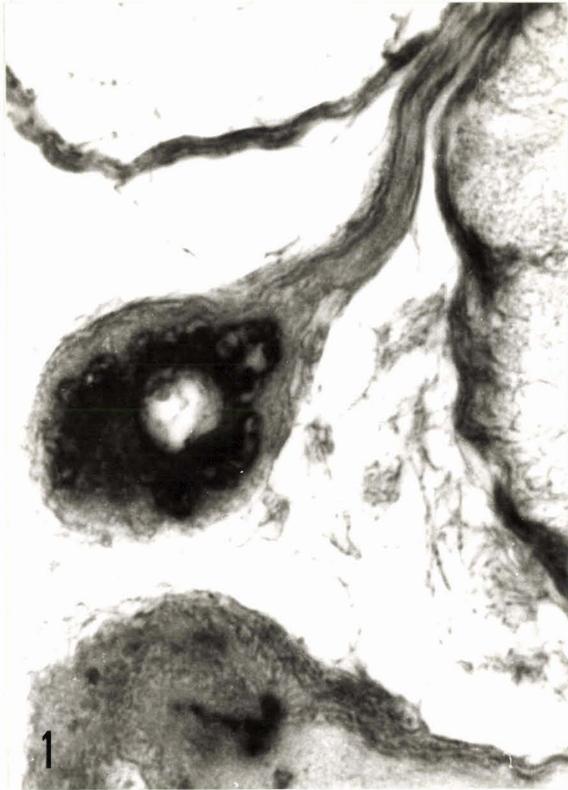


Planche 14

Fig. 1 Zone de contact entre les tissus mis à nu et l'épiderme en place.
Remarquer la migration en surface des noyaux épidermiques (né).
Trois jours de culture.

mc : membrane de cicatrisation

Fig. 2 Membrane de cicatrisation formée par les petites cellules fusiformes
(les flèches indiquent leur noyau). Explant dont l'épiderme et la
couche pigmentaire ont été excisés. Sept jours de culture.

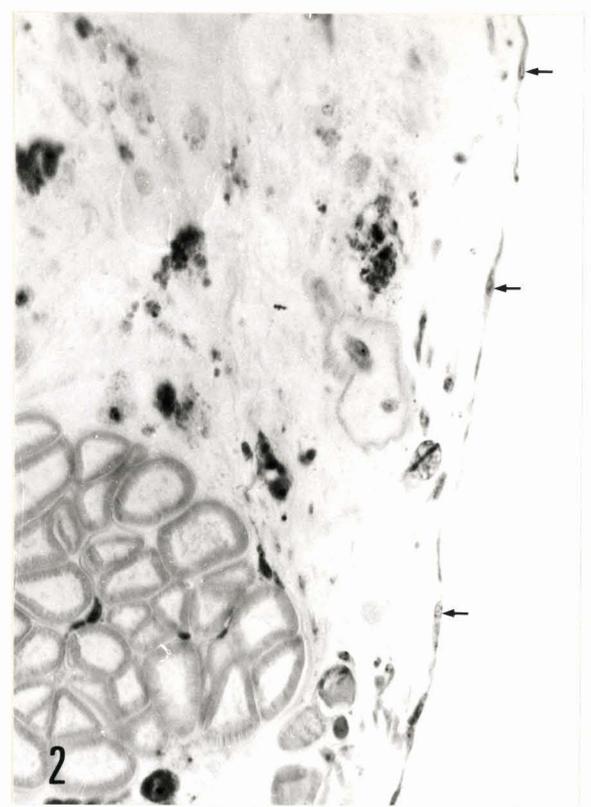
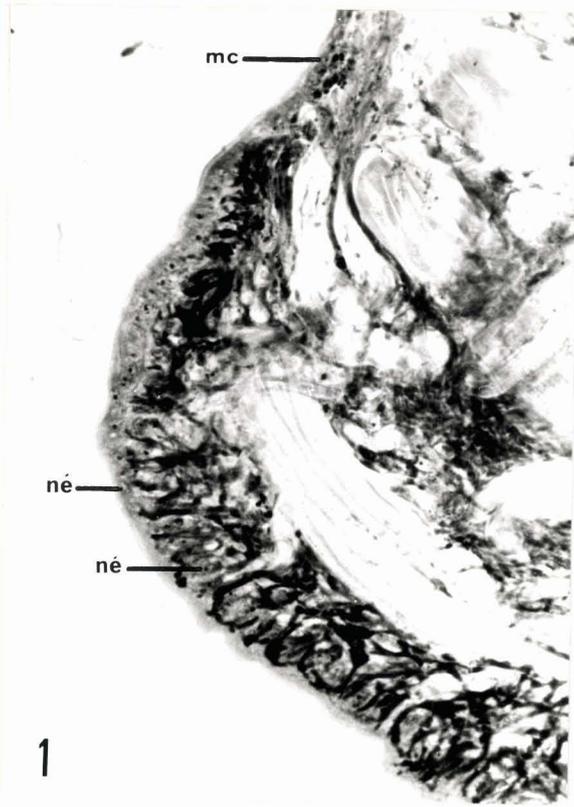
Fig. 3 - Même explant que précédemment. Une zone d'accumulation (flèche) de
cellules fusiformes.

cb : cellules botryoïdes

fm : fibres musculaires

Fig. 4 - Membrane de cicatrisation définitive après 14 jours de culture. Les
flèches indiquent les cellules en mitose.

(Fixation au Bouin-Hollande. Epaisseur des coupes : 6 μ . Coloration
par l'hématoxyline de Regaud. G x 370).



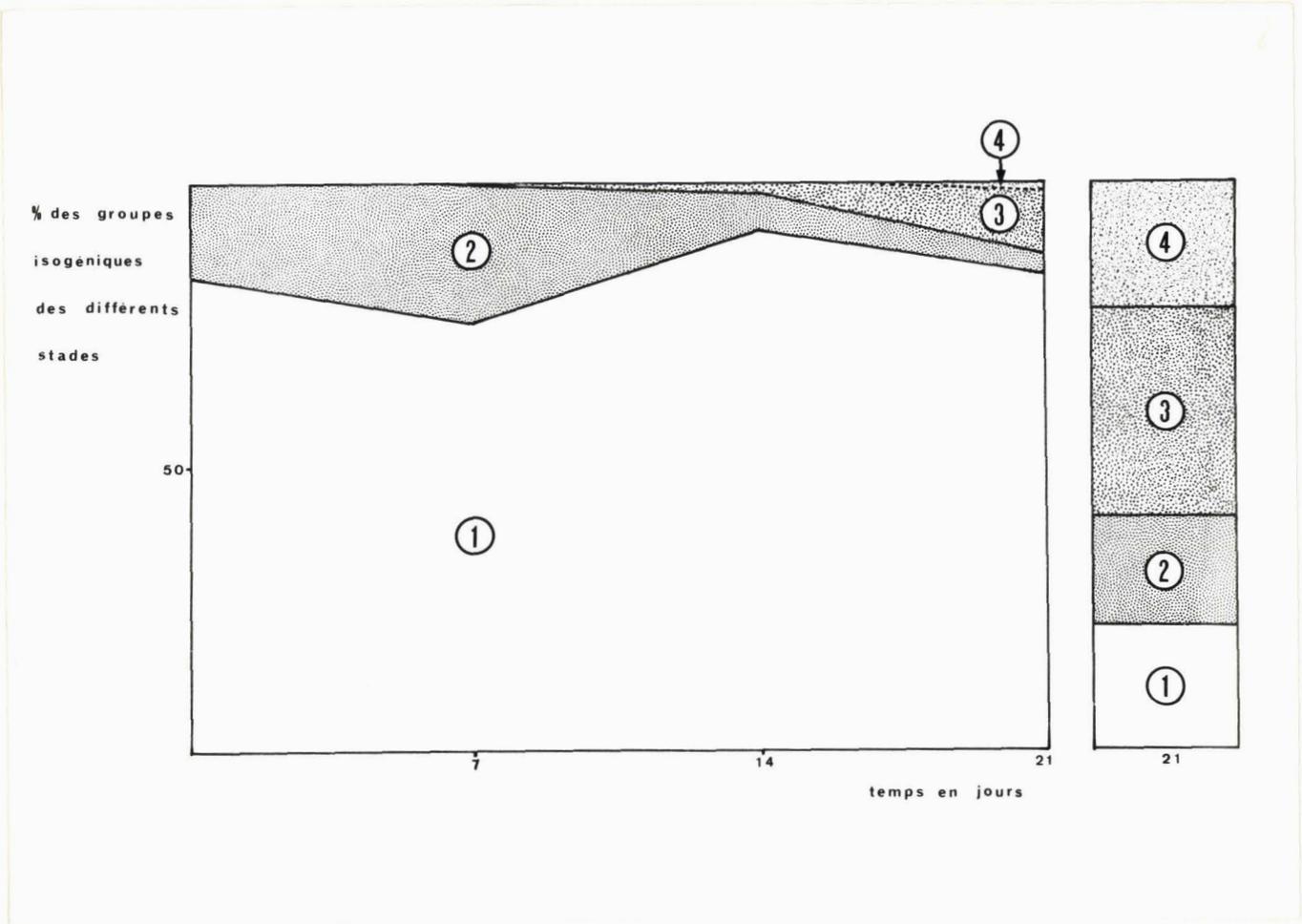


Planche 15

- à gauche : évolution du contenu des testicules, cultivés isolement, d'une sangsue maintenue à 6 - 7° C et à l'obscurité jusqu'à la mise en culture.

- à droite : état du contenu des testicules de la sangsue précédente explantés in vitro pendant 21 jours, en association avec le système nerveux central accompagné des deux premiers ganglions segmentaires.

(Les chiffres cerclés de noir correspondent aux différents stades. Les lignes discontinues sont tracées arbitrairement).

Planche 16

Fig. 1 - Coupe d'un explant après 14 jours de culture.

(Fixation au Bouin-Hollande. Epaisseur de la coupe : 7 μ . Coloration au glychémalum-éosine. G x 40).

ép : épiderme en place
m : membrane de cicatrisation
mc : muscles circulaires
ml : muscles longitudinaux
mo : muscles obliques
t : testicule

Fig. 2 - Testicule témoin fixé le jour de la mise en culture.

1 : groupe isogénique de stade 1
2a: groupe isogénique de stade 2 a
2b: groupe isogénique de stade 2 b

Fig. 3 - Testicule provenant du même donneur que le précédent après 21 jours de culture isolée.

1 : groupe isogénique de stade 1
lm: groupe isogénique de stade 1 en mitose
3 : groupe isogénique de stade 3
ph: phagocyte

Fig. 4 - Testicule provenant du même donneur que les précédents après 21 jours de culture en association avec le système nerveux central et les deux premiers ganglions segmentaires.

4 : groupe isogénique de stade 4

(Les testicules des figures 2-3 et 4 ont été fixés au Bouin Hollande. L'épaisseur des coupes est de 6 μ . La coloration est faite par l'hématoxyline de Regaud. G x 370).

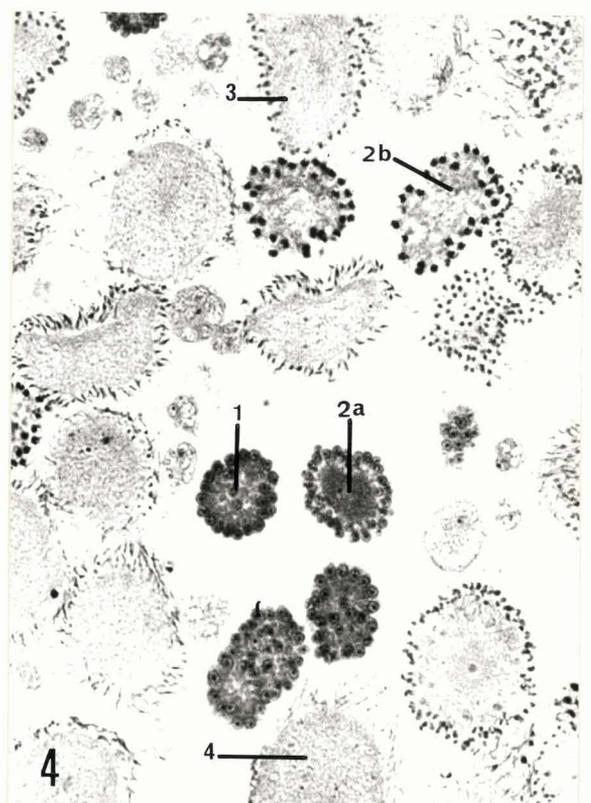
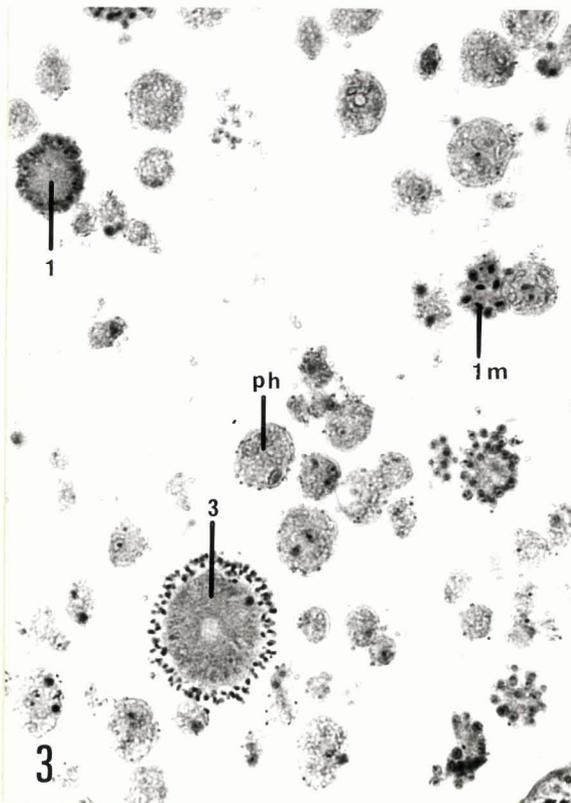
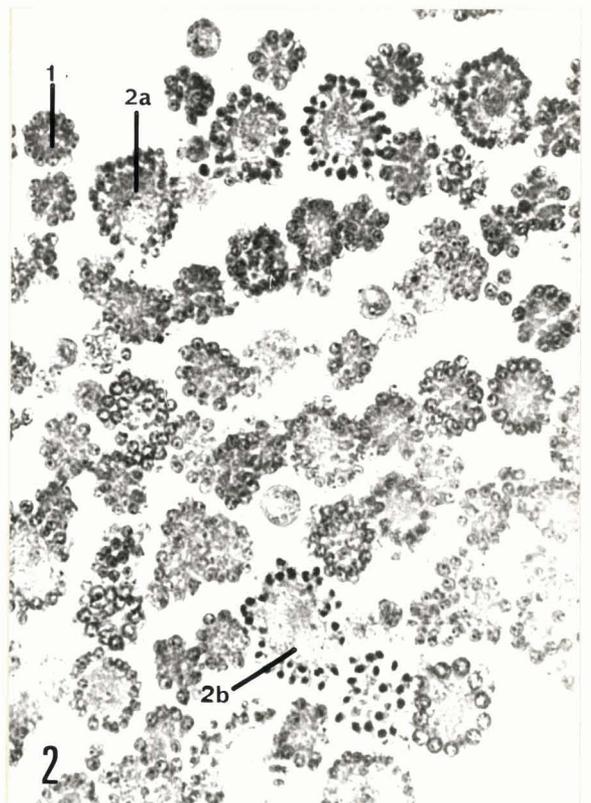
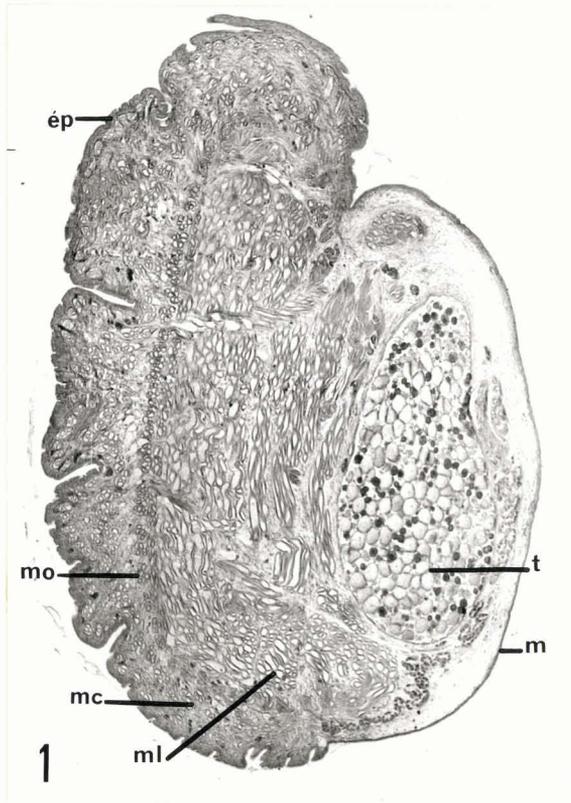


Planche 17

Fig. 1 - Testicule témoin fixé le jour de la mise en culture.

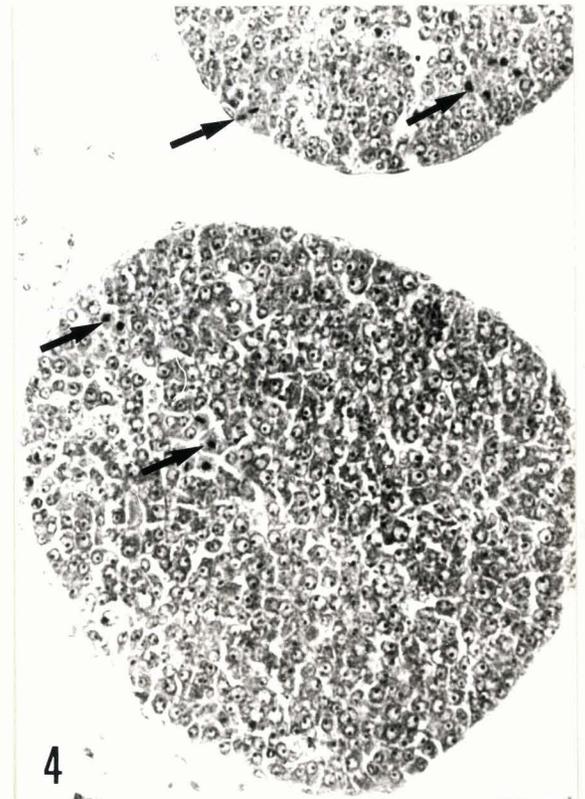
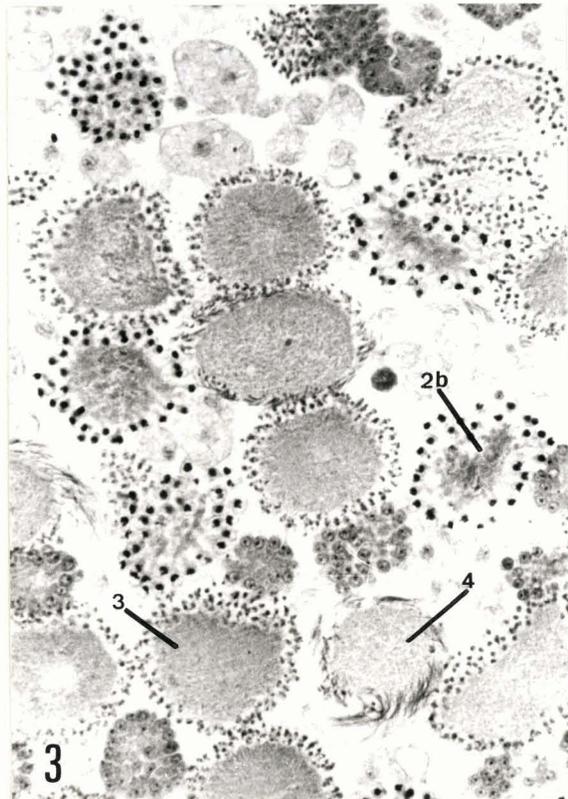
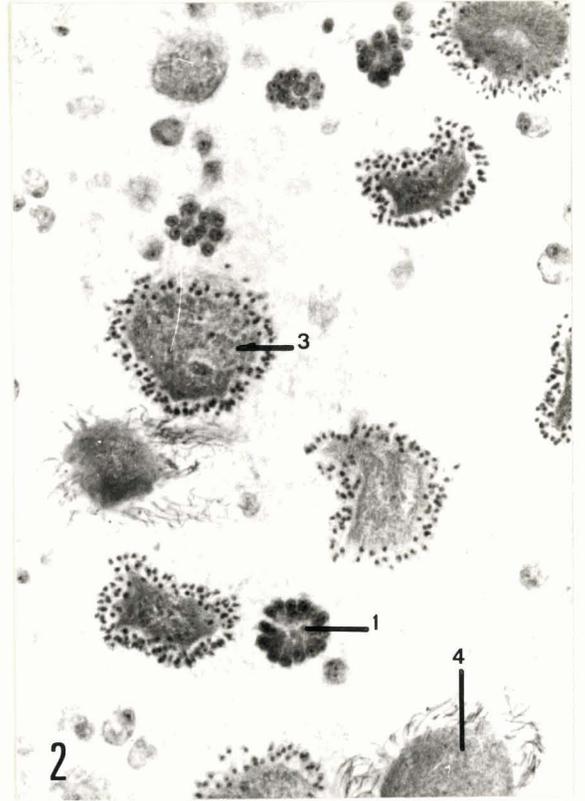
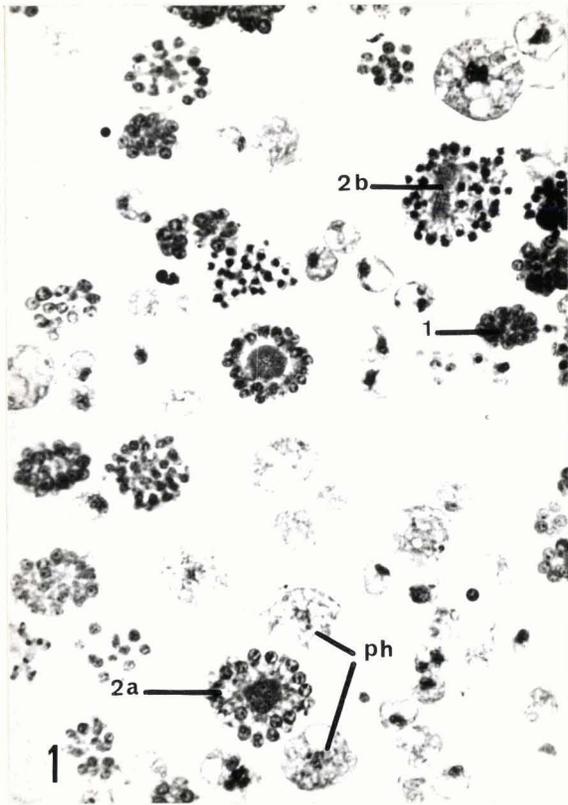
Fig. 2 - Testicule provenant du même donneur que le témoin après 14 jours de culture isolée.

Fig. 3 - Testicule provenant du même donneur que les précédents après 14 jours de culture en association avec le système nerveux central.

- 1 : groupe isogénique de stade 1
- 2a : groupe isogénique de stade 2a
- 2b : groupe isogénique de stade 2b
- 3 : groupe isogénique de stade 3
- 4 : groupe isogénique de stade 4

Fig. 4 - Ovaire après 14 jours de culture isolée. Coupe passant par les zones à ovogonies. Les flèches indiquent les mitoses.

(Fixation au Carnoy. Epaisseur des coupes : 6 μ . Coloration par l'hématoxyline de Regaud. G x 370).



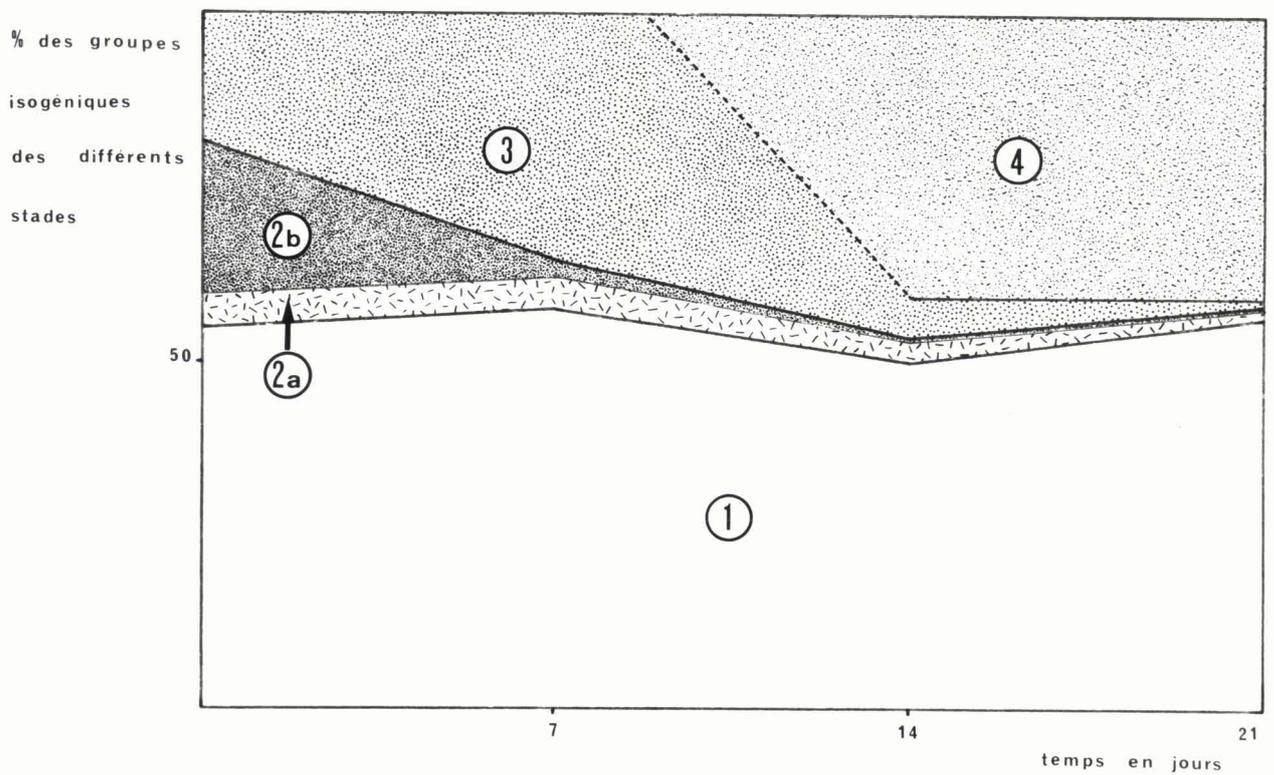


Planche 18

Evolution du contenu des testicules, explantés isolément in vitro, d'une sangsue maintenue à 6 - 7° C et à l'obscurité, puis pendant sept jours jusqu'à la mise en culture à la température du laboratoire et à l'éclairement naturel.

(Les chiffres cerclés de noir correspondent aux différents stades. Les lignes discontinues sont tracées arbitrairement. L'importance du pourcentage des stades 2b porté sur ce graphique entre le 14^e et le 21^e jour de culture est exagérée).



Fig. 1 : Coupe du ganglion sous-oesophagien (trois semaines de culture).
n : cellule neurosécrétrice fuchsino-phile du follicule 13.

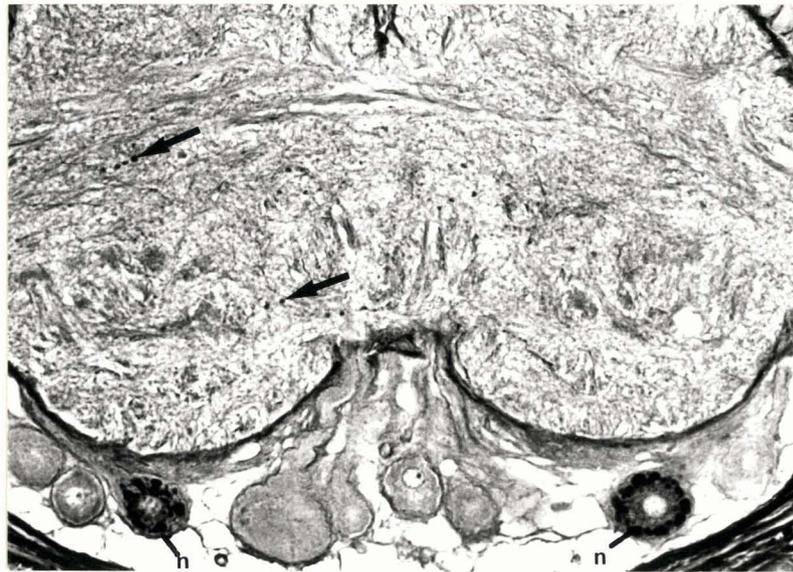


Fig. 2 : Coupe d'un ganglion segmentaire (trois semaines de culture). n : cellule neurosécrétrice fuchsino-phile. Les flèches montrent des granules fuchsino-philes dans le neuropile.
(Fixateur : Bouin-Hollande sans acide acétique, épaisseur des coupes : 7μ , coloration : fuchsine paraldéhyde avec coloration de fond de Halmi variante de Clark. G x 370).