50376
1969
27
FACULTE DES SCIENCES DE LILLE

50.376 1969 27

THESE DE TROISIEME CYCLE Mention Biologie Cellulaire

Michel DESCAMPS

CONTRIBUTION A L'ETUDE CYTOLOGIQUE ET CYTOCHIMIQUE DE LA SPERMATOGENESE CHEZ LITHOBIUS FORFICATUS L. (MYRIAPODE CHILOPODE)

Présentée le 20 juin 1969 EUNIVER de de SCIENCES

Jury d'examen

MM. M. DURCHON
E. VIVIER

R. JOLY

Président

Examinateurs

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
MATERIEL ET TECHNIQUES	3
CHAPITRE I : CYCLE SPERMATOGENETIQUE ANNUEL	6
I - Evolution des testicules et des vésicules séminales	8
A) Evolution testiculaire	8
B) Evolution des vésicules séminales	10
II - Cycle spermatogénétique annuel	. 13
DISCUSSION	15
CHAPITRE II : ETUDE CYTOLOGIQUE DES DIFFERENTS STADES SPERMATOGENETIQUES	16
1) Stade de repos génital	17
2) Stade spermatogénétique	19
3) Stade spermiogénétique	25
DISCUSSION	29
CHAPITRE III : ETUDE CYTOCHIMIQUE DE LA SPERMATOGENESE	31
I - Protéines	32
II - Acides nucléiques	36
III - Polysaccharides	38
TV - Lipides	3 9
DISCUSSION	3 9
CHAPITRE IV : ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES STADES SPERMATOGENE- TIQUES	42
MATERIEL ET TECHNIQUES	43
I - Spermatogonie - spermatocyte	43
A - Spermatogonie	43
B - Phase d'accroissement spermatocytaire	45

II - Spermiogénèse	54
III - Le spermatozoïde	64
DISCUSSION	75
IV - Etude des cellules dégénérescentes testiculaires	77
DISCUSSION	81
CONCLUSION GENERALE	83
BIBLIOGRAPHIE	85

INTRODUCTION

La spermatogenèse des Myriapodes Chilopodes a suscité de nombreux travaux; nous ne retiendrons que ceux qui ont été effectués chez les Lithobiomorphes. A l'exception de celles réalisées par NATH (1925 a et b, 1956, 1957) et par TUZET et MANIER (1951, 1954), ces recherches sont souvent anciennes et fragmentaires; elles sont toutes relatives au genre <u>Lithobius</u> et notamment à l'espèce forficatus.

Les premières observations sur les éléments séminaux sont dues à GILSON (1884) et à PRENANT (1887); elles furent reprises et complétées par MEVES et KORFF (1901) et par TÖNNIGES (1902). BOUIN et ses collaborateurs (1899 à 1903) décrivirent les principaux stades spermatogénétiques. L'évolution des éléments cytoplasmiques a été envisagée par NATH et par GOLANSKI (1929), la spermiogenèse et la structure du spermatozoïde par NATH et par TUZET et MANIER. Plus récemment, ZERBIB (1966) dans ses recherches sur le développement post-embryonnaire de l'appareil génital et la différenciation sexuelle chez <u>Lithobius forficatus</u> L. a été amené à étudier la structure interne des gonades et à décrire succinctement quelques stades spermatogénétiques.

D'autre part, à la suite de EOUIN et de ses élèves, de nombreux auteurs ont signalé l'existence d'une double spermatogenèse chez certaines espèces de Myriapodes Chilopodes.

Il nous a semblé utile de préciser les différents stades de la spermatogenèse et d'étudier l'évolution cytoplasmique et nucléaire.

Avant d'aborder ce problème il était intéressant d'étudier le cycle spermatogénétique de façon précise ; cet aspect biologique a été envisagé d'un point de vue chronologique chez les Symphyles (JUBERTHIE-JUPEAU, 1960) et chez quelques Chilopodes (ROBERTS, 1956 ; LEWIS, 1961, 1964 ; NEGREA, 1968).

R. JOLY (1966) a signalé l'existence chez <u>L. forficatus</u> de deux phases annuelles d'activité spermatogénétique. Nous avons complété ces résultats fragmentaires en précisant le cycle testiculaire et en décrivant l'évolution des vésicules séminales, aspect du problème jusqu'alors négligé chez les Chilopodes.

Nous nous sommes également proposés d'aborder le problème d'un point de vue cytochimique. De telles recherches sont fréquentes chez les Arthropodes; chez les Myriapodes, seul ANSIEY (1954) a entrepris l'étude quantitative des acides nucléiques et des protéines associées (histones) de la lignée spermatogénétique d'un Scutigéromorphe, Scutigera forceps Rafinesque. Dans notre travail nous avons surtout recherché la nature chimique des composants cellulaires et leur évolution quantitative.

Enfin nous avons essayé d'élucider certains problèmes à l'aide de la microscopie électronique. Si certaines spermatogenèses sont bien connues grâce à cette technique, chez les Myriapodes Chilopodes, seule a été réalisée l'étude du spermatozoïde d'un Géophilomorphe, <u>Geophilus linearis</u> Koch (HORSTMANN, 1968). Nous n'abordons dans ce mémoire que certains points particuliers de la spermatogenèse, et nous ne prétendons pas élucider complétement le mécanisme de l'évolution cellulaire au cours des différents stades. Les résultats obtenus constituent le point de départ d'une étude plus poussée que nous nous proposons d'effectuer ultérieurement.

MATERIEL ET TECHNIQUES

Pour la conduite de notre travail, nous avons choisi <u>Lithobius</u> <u>forficatus</u> L., Chilopode assez abondant dans le Nord de la France. Les observations, <u>in vivo</u> et après fixation, ont été réalisées sur des individus <u>maturus</u> junior et maturus senior, selon la terminologie de VERHOEFF (1905).

L'étude <u>in vivo</u> a été effectuée après dissection et prélèvement des glandes génitales. Les testicules, écrasés entre lame et lamelle, sont observés dans du liquide de Ringer, directement ou après coloration par le vert Janus; ils sont étudiés en lumière naturelle ou en contraste de phase. Cette méthode permet l'étude morphologique du spermatozoïde, difficilement observable en totalité sur coupes histologiques.

Les fixations sont de deux types : fixation de frottis ou d'organes en place. Dans le premier cas, le testicule et les vésicules séminales sont prélevés, placés dans du Ringer et fendus longitudinalement. Les spermatozoïdes sont recueillis sur des lames de verre qui sont soit déposées dans un récipient saturé de vapeurs de formol (30 mm.), puis immergées dans du formol neutre à 4 % (1 heure), selon la méthode employée par WALKER et MAC GREGOR (1968), soit plongées dans l'éthanol absolu (10 mm.).

Dans le second cas, la moitié postérieure de l'animal est fixée par l'un des liquides suivants : Bouin (sans acide acétique), Bouin-Hollande (id.), Bouin alcoolique (id.), Regaud, Carnoy. Pour l'étude du cycle spermatogénétique annuel et la description des différents stades nous avons eu recours à des méthodes générales de coloration : glychémalun associé soit à l'éosine, à l'érythrosine, ou au picro-indigo-carmin, Mallory, Azan, hémato-xyline ferrique d'Heidenhain, hématoxyline chromique-phloxine de Gomori, fuchsine paraldéhyde suivant la technique de Gabe. Les observations mitochondriales ont été réalisées par les méthodes de Gabe au picrate de vert de méthyle ou de Bensley-Cowdry au vert de méthyle, la base de la coloration étant la fuchsine anilinée selon Altmann.

Dans l'étude cytochimique nous avons eu recours à différentes techniques qui permettent de localiser les principaux composants cytoplasmiques.

TABLEAU I

TECHNIQUES	AUTEURS	COMPOSES ET RADICAUX MIS EN EVIDENCE	REMARQUES
PROTEINES Millon trichloracétique Millon sulfurique	POLLISTER et RIS (1947) POLLISTER et RIS (1947)	Protéine totale Protéine non histone	
Ninhydrine-Schiff	YASUMA et ICHIKAWA (1952- 1953)	- NH ₂	
Jaune Maphtol S Fast green FCF	DEITCH (1955) ALFERT et GESCHWIND (1913)	- NH2 Histones (arginine-lysine)	employé avec et sans extrac- tion à l'acide trichlora- cétique utilisé avec et sans extrac- tion à l'acide picrique avec et sans blocage à la N-ethyl- maleimide
Ecsine Y	BLOCH et HEW (1960)	Histones et protamines	
D.D.D.	BARRNETT et SELIGMAN (1952)	- SH	
Chevremont et Frederic	CHEVREMONT et FREDERIC (1943)	- SH	
Acide performique - bleu Alcian	ADAMS et SLOPER (1955- 1956)	- S - S	
ACIDES MUCLEIQUES			
Feulgen Turchini	PEULGEN et ROSSENHECK (1924 TURCHINI, CASTEL et KAU VAN KIEN (1943, 1944)	ADN ADN et ARN	utilisé avec la 9-phenyl-2- 3-7 trihydroxy-6-fluorone
Bleu de toluidine tamponné	(2,0,, 2,0,,)	ARN	avec ou sans digestion préalable à la RNase
POLYSACCHARIDES			
Acide périodique - Schiff	/MAC MANUS (1946) "HOTCHKISS (1948)	polysaccharides	avec ou sans digestion
PAS-dimédon Bauer (acide chromique - Schiff)	BULMER (1959) BAUER (1933) LISON (1949)	glycogène glycogène	préalable à l'amylase salivaire
Carmin de Best	BEST (1906)	glycogène)
Bleu Alcian	STEEDMAN (1950)	Mucopolysaccharides acides	employé avec ses contrôles méthylation : FISCHER et LILLIE (1954)
			méthylation-saponification : LILLE (1958)
Hale	HALE (1946)	Mucopolysaccharides	
LIPIDES			
Acétone-noir Soudan B	d'après BERENBAUM (in PEARSE)	Phospholipides	
			Run
			(BA2)

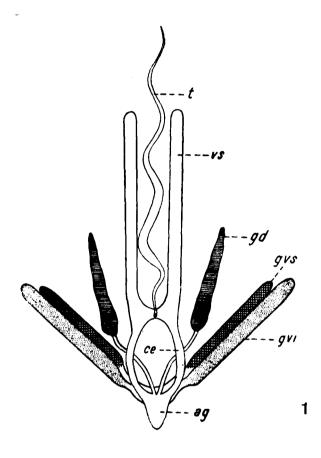
Dans la mesure du possible nous avons complété ces tests et ces colorations, plus ou moins spécifiques, par des extractions enzymatiques ou chimiques et par des réactions de blocage.

Le tableau 1 résume les différentes techniques employées. Nous avons utilisé d'autre part des techniques cytochimiques combinées pour la mise en évidence simultanée des acides nucléiques, des polysaccharides et des protéines (HIMES, MOORE et POLLISTER, 1955; HIMES et MORIBER, 1956; IECHENAULT et OLIVIER, 1966).

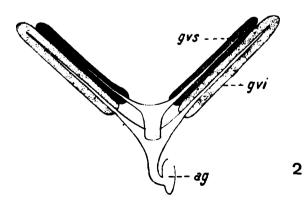
CHAPITRE I

CYCLE SPERMATOGENETIQUE ANNUEL

Avant d'exposer nos résultats il nous semble utile de rappeler l'anatomie de l'appareil reproducteur mâle de <u>L. forficatus</u>. Les premières observations ont été faites par FABRE (1855); elles ont été complété**es** par de nombreux auteurs. Nous résumerons la description de PRUNESCO (1964). Le testicule impair médian est flanqué de deux vésicules séminales et de trois paires de glandes accessoires.



Système génital mâle de L. forficatus. 1: vue dorsale; 2: détail, glandes ventrales. ag., atrium génital; ce., canal éjaculateur; gd., glande dorsale; gvi., glande ventrale inférieure; gva., glande ventrale supérieure; t., testicule; vs., vésicule séminale. D'après Prunesco.



BIS UULE

I - EVOLUTION DES TESTICULES ET DES VESICULES SEMINALES

A - Evolution testiculaire

L'étude histologique permet de distinguer quatre stades :

a) <u>stade de repos</u>: Le testicule ne présente pas de lumière centrale. Il est divisé en logettes renfermant les spermatocytes; les spermatogonies sont en position pariétale (Fig. 1).



Fig. 1 - Stade de repos testiculaire : c., spermatocyte I ; g., spermatogonie. (coupe transversale ; Bouin-Hollande, hématoxyline chromique-phloxine). x 300.

- b) <u>Stade d'activité spermatogénétique</u>: Les spermatocytes ont fait place à de jeunes spermatides souvent réunies par quatre (Fig. 2); ces groupes de quatre éléments sont plus ou moins abondants dans chacune des logettes (Fig. 3).
- c) <u>Stade d'activité spermiogénétique</u>: Il conduit à la présence de faisceaux de spermatozoïdes dans les logettes testiculaires (Fig. 4). Le cloisonnement ne tarde pas à disparaître et les faisceaux se réunissent (Fig. 5); cette évolution marque le début de l'expulsion des spermatozoïdes.



d) <u>Stade de reconstitution</u>: Le testicule est vidé de ses spermatozoïdes ; il contient des fragments cellulaires en dégénérescence. Par la suite, les logettes vont se reformer autour de jeunes spermatocytes provenant de la division des spermatogonies périphériques.

C'est le seul moment de l'évolution testiculaire où il est possible d'observer une lumière centrale (Fig. 6).

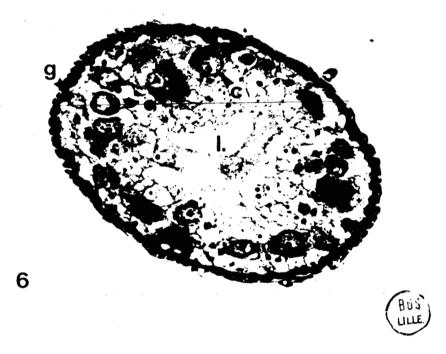


Fig. 6 - Stade de reconstitution testiculaire : c., spermatocyte I ; g., spermatogonie. La lumière (l.) est nettement visible. (coupe transversale ; Bouin-Hollande, Mallory). x 300.

B - Evolution des vésicules séminales

Nous distinguerons trois stades.

a) Stade de repos : Les vésicules séminales ont une forme cylindrique et leurs dimensions sont minimales : quelques mm de long et de 120 à 150 μ de diamètre. Leur paroi, très épaisse (40 μ environ), présente

deux couches : l'une, externe, de nature conjonctive, l'autre, interne, formée d'un endothélium prismatique ; la lumière centrale est pratiquement inexistante (Fig. 7).

Ce stade correspond aux stades de repos et d'activité spermatogénétique testiculaires.

b) <u>Stade d'accroissement</u>: La longueur des vésicules séminales augmente et leur paroi s'épaissit; en fait, l'épaississement pariétal affecte surtout l'endothélium, la couche conjonctive externe devenant plus mince. La lumière centrale, importante, renferme un peu de liquide nourricier avec parfois quelques faisceaux de spermatozoïdes (Fig. 8).

Le stade d'accroissement coïncide approximativement avec le début du stade d'activité spermiogénétique testiculaire ; il peut dans certains cas se prolonger jusqu'à l'expulsion des spermatozoïdes du testicule.

c) Stade de développement maximum : Les vésicules séminales atteignent 18 à 20 mm de long ; leur diamètre moyen est de 350 à 400 μ . La paroi, d'épaisseur constante (20 μ environ), est plus mince que lors du stade précédent ; la couche conjonctive, distendue, est aplatie et peut être assimilée à une membrane basale. La lumière, très importante, est remplie d'un liquide nourricier dans lequel on peut observer de nombreux faisceaux de spermatozoïdes (Fig. 9).

Ce dernier stade correspond à l'expulsion des spermatozoïdes du testicule et peut se poursuivre pendant le stade de reconstitution testiculaire. Après l'émission des spermatophores, les vésicules séminales régressent et retrouvent l'aspect décrit lors du stade de repos. Signalons enfin que l'état de leur évolution peut-être différent chez un même individu, l'une étant au stade 2, l'autre au stade 3 (Fig. 10).

Après avoir passé en revue les stades évolutifs des testicules et des vésicules séminales, nous pouvons envisager le cycle spermatogénétique annuel.



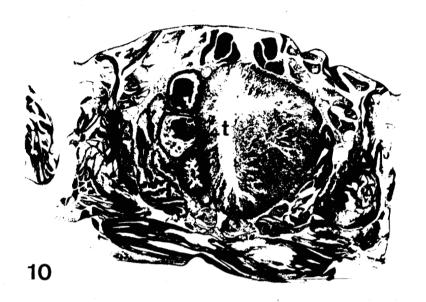


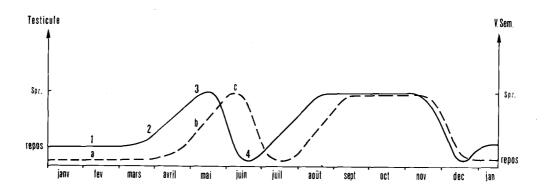
Fig. 10 - La section testiculaire (t.) est encadrée par les sections des vésicules séminales (section supérieure, stade 3 ; section inférieure, stade 2). (coupe transversale ; Bouin-Hollande, Mallory). x 35.

II - CYCLE SPERMATOGENETIQUE ANNUEL

Les résultats obtenus sont schématisés sur la Fig. ll ; ils permettent de tirer les enseignements suivants :

- Le cycle testiculaire présente deux phases spermiogénétiques : une phase printanière (mars - avril - début mai) et une phase estivale (juillet - début août).
- 2) L'expulsion des spermatozoïdes est très rapide après la spermiogenèse printanière ; leur passage dans les vésicules séminales est réalisé dès le mois de juin. Au contraire, après la spermiogenèse estivale, on peut observer des spermatozoïdes dans les testicules jusque vers la mi-novembre. Il faut toutefois noter que les vésicules séminales renferment des spermatozoïdes dès la mi-septembre.

- 3) Les stades de repos testiculaire ont une durée très différente : courte avant la phase spermiogénétique estivale, elle est extrêmement prolongée (mi-décembre à début mars) avant la phase printanière.
- 4) Le cycle des vésicules séminales suit une évolution parallèle à celle du cycle testiculaire. Elles sont remplies de spermatozoïdes a) en mai et juin, b) de la mi-septembre à la fin novembre. L'émission des spermatophores a lieu en juillet et vers la mi-décembre. La durée du séjour des spermatozoïdes dans les vésicules séminales est très brève avant la première émission, alors qu'elle peut atteindre de 2 à 3 mois avant la seconde. Le stade de repos estival est très court et le stade hivernal dure de la fin décembre au début d'avril.



(BVE)

Fig. 11 - Cycle spermatogénétique annuel (trait continu) et évolution corrélative des vésicules séminales (trait discontinu).

1, 2, 3, 4 : stades de repos, d'activité spermatogénétique, d'activité spermiogénétique et de reconstitution testiculaire.

a, b, c : stades de repos, d'accroissement et de développement maximum des vésicules séminales.

DISCUSSION

Le facteur climatique paraît avoir une influence sur le déclenchement des phases spermatogénétiques. Après un hiver relativement doux, la spermiogenèse printanière est précoce et commence dès le mois de février. C'est vraisemblablement ce facteur qui est responsable de l'absence d'activité cyclique chez les Chilopodes cavernicoles de Roumanie (NEGREA, 1968). Des expériences sont en cours pour préciser le rôle de la température sur le cycle spermatogénétique.

En l'absence de copulation, il n'y a pas d'émission de spermatophores, mais le cycle spermatogénétique n'est pas inhibé. Des individus isolés en septembre et sacrifiés au printemps suivant présentent une nette activité spermiogénétique, alors que leurs vésicules séminales sont remplies de spermatozoïdes qui n'ont pu être expulsés.

Comme chez la plupart des Arthropodes, le cycle de mue et le cycle de reproduction sont indépendants, caractère qui différencie les Chilopodes des Symphyles (JUBERTHIE-JUPEAU, 1960). D'autre part, l'étude histologique prouve indiscutablement l'existence de deux phases spermatogénétiques annuelles. Ce résultat infirme ceux qui ont été obtenus chez <u>Lithobius variegatus</u> (ROBERTS, 1956) et chez <u>L. forficatus</u> (IEWIS, 1964); ces auteurs décrivent une seule phase et situent l'émission de spermatophores respectivement en automne et au printemps. IEWIS, toutefois, ne rejette pas la possibilité d'une double émission annuelle, observation comparable à celle qu'il a effectuée chez le Géophilomorphe Strigamia maritima Leach (1961).

CHAPITRE II

ETUDE CYTOLOGIQUE DES DIFFERENTS. STADES SPERMATOGENETIQUES

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit le cycle spermatogénétique et distingué quatre stades : un stade de repos génital durant lequel le testicule renferme des spermatogonies périphériques et des spermatocytes axiaux, un stade d'activité spermatogénétique, un stade d'activité spermiogénétique et un stade de reconstitution testiculaire.

Nous nous réfèrerons à ces stades pour la description des éléments séminaux.

1) Stade de repos génital (mi-décembre à fin avril et début juillet)

a) Spermatogonie

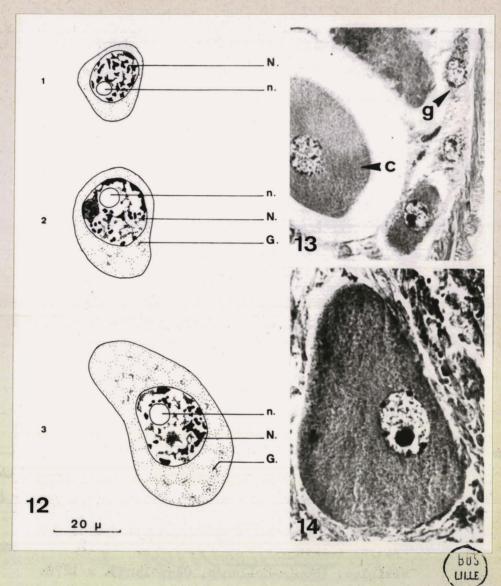
Ia spermatogonie est une cellule d'environ 20 à 25 μ de diamètre ; le noyau, de grande taille (15 μ), renferme des mottes de chromatine et un nucléole volumineux (Fig. 12, n° 1 ; Fig. 13). Le cytoplasme est peu abondant ; l'appareil de Golgi est presque inexistant et les mitochondries assez rares.

La phase d'accroissement suit le stade spermatogonie. Les volumes du noyau et du cytoplasme augmentent progressivement. Simultánément l'appareil de Golgi et les mitochondries deviennent plus abondants (Fig. 12, n° 2 et 3; Fig. 13). A la fin de cette phase les cellules mesurent 100 μ environ dans leur plus grande dimension ; ce sont des spermatocytes de premier ordre (Fig. 14).

b) Spermatocyte I

Leur taille peut atteindre 100 μ ; toutefois, mesurée sur une coupe testiculaire longitudinale, elle est en moyenne de 50 μ . Cette différence est la conséquence du chevauchement et de la compression des spermatocytes dans la logette spermatique.

Le diamètre du noyau atteint 30 μ ; celui du nucléole de 6 à 7 μ . Le cytoplasme est bourré de mitochondries et le Golgi, très abondant, est réparti uniformément dans toute la cellule. A la fin du stade spermatocyte I le cytoplasme est finement granuleux ; le Golgi n'est plus décelable en lumière naturelle et son évolution ne peut être suivie qu'à l'aide de la microscopie en contraste de phase.



Figs 12-14 - Spermatogonies et croissance spermatocytaire.

Fig. 12: n° 1, spermatogonie; n° 2 et 3, spermatocyte en croissance: G., appareil de Golgi; n., nucléole; N., noyau.

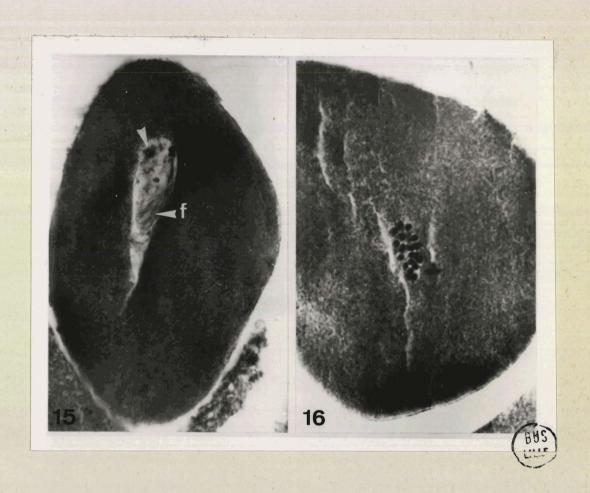
Fig. 13: Spermatogonie (g.) et spermatocyte en croissance (c.) (Bouin-Hollande, hémalun picro-indigo-carmin). x 470.

Fig. 14: Spermatocyte I. (Bouin-Hollande, Cleveland). x 700.

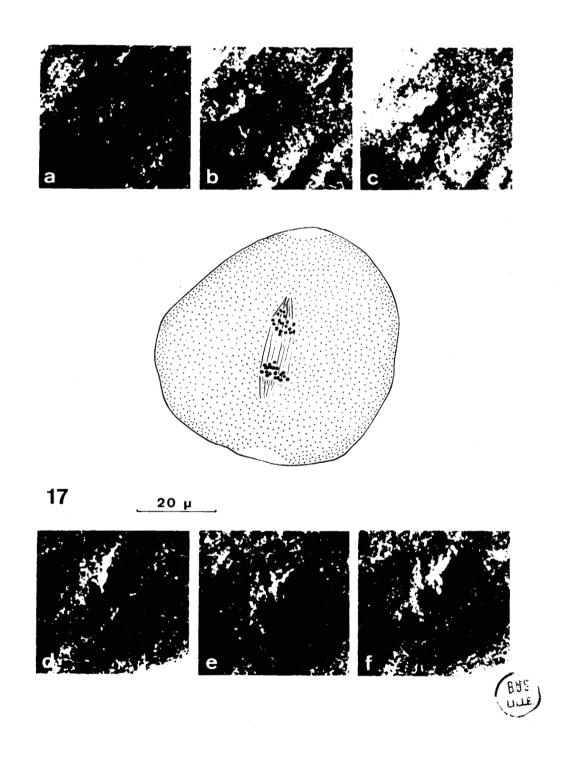
2) Stade spermatogénétique (fin avril-début mai et juillet)

Comme l'a signalé PRENANT (1887, 1892) et après lui de nombreux auteurs, en particulier BOUIN, les premières divisions spermatogénétiques présentent successivement trois types de fuseaux : un fuseau astérien, un fuseau d'origine nucléaire et un fuseau de séparation.

Le fuseau achromatique astérien n'intervient pas dans la division. Les asters migrent rapidement vers les pôles cellulaires; chacun d'eux est entouré d'une zone de cytoplasme moins dense. La membrane nucléaire disparaît et le fuseau nucléoplasmique s'élabore; le nucléole diminue d'importance et les chromosomes s'individualisent (Fig. 15). La plaque métaphasique permet de compter 24 chromosomes, tous punctiformes (Fig. 16).



La montée polaire met en évidence deux groupes de 24 chromosomes, chacun d'eux se dirigeant vers un des pôles fusoriaux (Fig. 17).



mation de deux cellules diploides, plasmique ; il persiste longtemps après la reconstitution des membranes ment à sa base (Fig. 19). Ce fuseau permet la formation de la membrane cytoconstitué de fibrilles épaisses et chaque demi-fibrille présente un renfleou fuseau de séparation, se forme à l'équateur du précédent ; il est dent très rapidement en une masse chromatique (Fig. 18). Le troisième fuseau, Dès le début de la télophase, le fuseau disparaît et les chromosomes se fon-

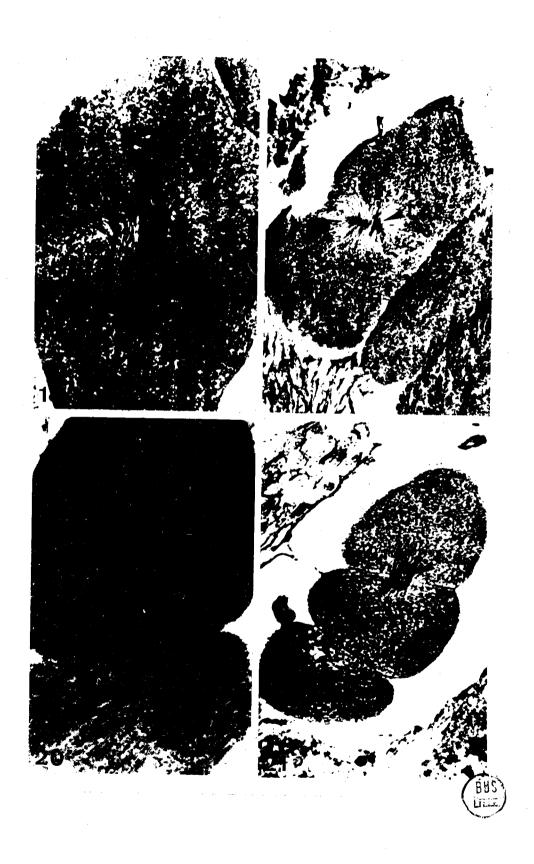
La membrane nucléaire des spermatocytes I' disparaît rapidement que nous avons appelées spermatocytes I', dont la taille atteint 70 µ.

quatre cellules diploides ; nous les avons appelées spermatocytes I" (50 µ). sible après la reconstitution de la membrane nucléaire. On peut alors compter Les divisions sont synchrones et le fuseau de séparation (Fig. 21) reste viet les plaques équatoriales métaphasiques présentent 24 chromosomes (Fig. 20).

AND ADD THE TO SHIELD

and a branchia price Periodian, the doctor de salaunitata (Sealisch). Des

CENTRAL PROPERTY OF STREET, ST



La méiose n'intervient qu'après ces deux mitoses : les plaques métaphasiques de la division réductionnelle présentent 12 tétrades (Fig. 22).



Fig. 22 - Spermatocytes I": lère division méiotique (métaphase). Coupes sériées: a, 4 tétrades visibles; b, 8 tétrades. (Bouin-Hollande, hémalun picro-indigo-carmin). x 1270.

Les deux divisions méiotiques se succèdent sans doute très rapidement car nous n'avons jamais observé de spermatocyte de second ordre. Les cytodiérèses présentent un système complexe de cloisons incurvées et les spermatides restent longtemps groupées par quatre, chaque tétrade provenant d'un spermatocyte I" (Fig. 23). Le noyau (8-10 μ) est apical.



Fig. 23 - Jeunes spermatides groupées par quatre (coupe transversale dans la région postérieure). (Bouin-Hollande, hématoxyline ferrique). x 1270.

Nous avons suivi l'évolution des organites cytoplasmiques au cours des quatre divisions successives, préméiotiques et méiotiques. Les éléments golgiens uniformément répartis dans les spermatocytes I' (Fig. 24, n° 1) sont localisés à l'un des pôles nucléaires dans les spermatocytes I" (Fig. 24, n° 2) et surtout dans les spermatides.

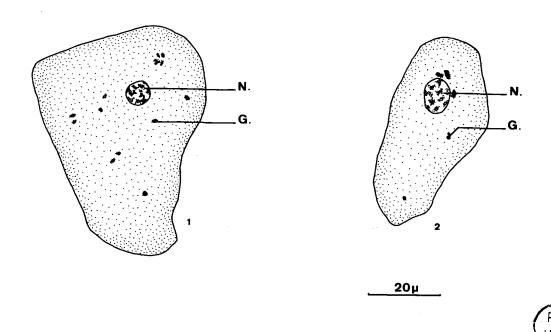


Fig. 24 - Répartition des éléments golgiens. 1 : spermatocyte. I'. 2 : spermatocyte I". G., Golgi; N., noyau.

3) Stade spermiogénétique (mars-avril-début mai, juillet-début août)

Les spermatides s'allongent; le flagelle se développe au niveau d'un centriole situé au pôle nucléaire postérieur (Fig. 25, n° 1). Ultérieurement, apparaît une formation que nous désignons sous le terme de "cage nucléaire" (Fig. 25, n° 2); elle est constituée d'un ensemble de filaments, de nature mitochondriale, qui coiffent le noyau et se poursuivent à la périphérie du flagelle. Au pôle nucléaire antérieur, les granules golgiens proacrosomiaux sont bien visibles. Les filaments de la "cage nucléaire", encore nombreux, glissent vers la région postérieure (Fig. 26), et les granules proacrosomiaux fusionnent en une masse supranucléaire (Fig. 25, n° 3).

Le noyau de la spermatide qui jusqu'alors était du type à chromatine en mottes change complètement d'aspect : on peut y dinstinguer deux zones, l'une périphérique, hyaline, l'autre centrale, très dense et très chromophile (Fig. 25, n° 4; Fig. 27). Le centriole postérieur proximal est logé dans une encoche de la membrane nucléaire; un mince filament le relie au centriole distal.

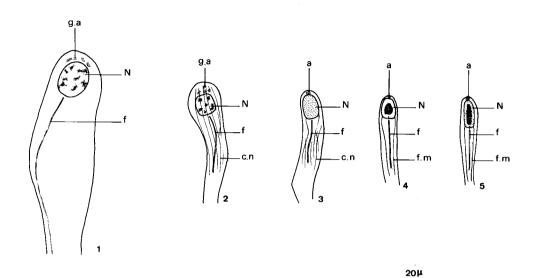


Fig. 25 - 1, 2, 3, 4, 5, schémas récapitulatifs des différents stades spermiogénétiques. a., proacrosome; c.n., "cage nucléaire"; f., flagelle; f.m.: filament mitochondrial; g.a., granules

Dans une phase ultérieure, la "cage nucléaire" n'est plus observable dans la région périnucléaire ; il ne persiste que deux filaments encadrant le flagelle. Simultanément le noyau se transforme ; il s'allonge, prend une forme en doigt de gant $(8 \times 3 \mu)$ et ses deux zones chromatiques sont moins visibles. Le centriole postérieur proximal est toujours logé dans l'encoche nucléaire (Fig. 25, n° 5 ; fig. 28).

acrosomiaux; N., noyau.

Vers la fin du stade spermiogénétique, le noyau s'allonge et se spiralise; il reste entouré d'une mince gaine cytoplasmique (Fig. 29 a). Les deux filaments mitochondriaux de la partie caudale s'organisent en une spire, d'abord lâche, et progressivement de plus en plus serrée (Fig. 29 b).



Nous n'avons observé qu'un seul type de spermatozoïde. Long d'environ 2 mm, il comprend trois parties : l'acrosome, le noyau et la queue.

L'acrosome a une forme pyramidale ; il atteint une longueur de 4 μ et coiffe l'extrémité antérieure du noyau. Ce dernier est spiralé et mesure de 380 à 400 μ (Figs 30 et 31). La queue (1,5 à 1,8 mm), très fragile et cassante, est constituée d'une double hélice mitochondriale entourant une zone cytoplasmique hyaline au centre de laquelle se trouve le flagelle (Fig. 32). La gaine mitochondriale se poursuit jusqu'à l'extrémité de la queue qui correspond ainsi à une pièce intermédiaire.



La figure 33 schématise les différents stades de la spermatogenèse.

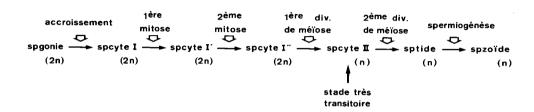




Fig. 33 - Stades spermatogénétiques chez L. forficatus.

DISCUSSION

Nos observations permettent de préciser certains détails de la spermatogenèse chez Lithobius forficatus.

Les spermatocytes sont de grande taille, comme l'ont déjà signalé de nombreux auteurs, en particulier NATH qui les qualifie de "like egg cell". Il semble que ce soit là un caractère constant chez les Chilopodes.

Le nombre diploïde de chromosomes est de 24, résultat qui confirme les observations de BOUIN P. et BOUIN M. (1902) qui en comptaient 22 ou 24.

Nos observations sur l'évolution des organites cellulaires sont comparables à celles de NATH (1925 a et b) et à celles de GOIANSKI (1929). Toutefois NATH n'a pas décrit l'existence d'une encoche nucléaire dans laquelle vient se loger le centriole postérieur proximal, ni celle des deux zones chromatiques nucléaires. Ces dernières pourraient correspondre aux deux zones fréquemment observées dans le noyau des spermatozoïdes : une zone externe granulaire et une zone interne fibrillaire ; HORSTMANN (1968) les décrit notamment chez Geophilus linearis Koch (Géophilomorphe).

Le noyau du spermatozoïde est spiralé, observation qui confirme

celles de TÖNNIGES et de TUZET et MANIER. Toutefois la taille nucléaire, 380 à 400 μ , semble nettement supérieure à celle mesurée par TUZET et MANIER (57 et 114 μ). En ce qui concerne la queue, notre observation est comparable à celle d'HORSTMANN qui observe chez <u>Geophilus linearis</u> des hélices mitochondriales se poursuivant jusqu'à son extrémité et ne laissant libre qu'une faible portion de flagelle terminal.

D'autre part, nous n'avons trouvé qu'un seul type de spermatozoïdes chez <u>L. forficatus</u> et nous ne pouvons confirmer les résultats de TUZET et MANIER (1954). Il ne semble pas exister de double spermatogenèse comparable à celle qui est décrite chez de nombreuses espèces de Chilopodes et que signale ZERBIB (1966).

Le point essentiel de cette étude réside en la mise en évidence de deux mitoses préméiotiques intercalées entre la fin de la croissance spermatocytaire et la première division méiotique. Les cellules qui en résultent et que nous avons appelées spermatocytes I' et I" sont diploides ; cette particularité avait échappé aux auteurs précédents qui les avaient considérées respectivement comme des spermatocytes II et des spermatides. L'existence de ces deux mitoses préméiotiques prouvée par des caractères caryologiques se justifie mathématiquement. Les stades spermatogénétiques et spermiogénétiques se déroulent en effet dans des logettes testiculaires qui conservent un volume identique. Les files de spermatocytes évoluent et donnent des faisceaux de plus de 600 spermatozoïdes, dont les noyaux se trouvent au même niveau ; les longueurs des files et des faisceaux sont comparables, 2 mm environ. La section de chaque spermatocyte I mesurant 50 µ, les files de spermatocytes comportent donc une quarantaine d'unités. Cela implique l'existence de quatre divisions; en effet 40 spermatocytes I - 80 spermatocytes I' - 160 spermatocytes I" -> 320 spermatocytes II -> 640 spermatides -> 640 spermatozoides.

Une spermatogenèse classique conduirait à la formation de 640 spermatozoïdes à partir de 160 spermatozytes I; la longueur de la file spermatozytaire atteindrait environ 8 mm et serait quatre fois supérieure à celle du faisceau de spermatozoïdes, ce qui est infirmé par l'observation. Un tel processus semble assez inhabituel mais il n'est pas unique dans le régne animal. En effet, SERRA et KOSHMAN (1967) ont également décrit 1, 2 ou 3 divisions préméiotiques chez Cepaea nemoralis L..

Notons enfin que nous avons observé dans le testicule les cellules dégénérescentes décrites par BOUIN (1903), dont l'étude est envisagée plus loin.

CHAPITRE III

ETUDE CYTOCHIMIQUE DE LA SPERMATOGENESE

Nous envisagerons successivement l'étude des protéines, des acides nucléiques, des polysaccharides et des lipides dans les différents stades de la lignée spermatogénétique.

I) PROTEINES

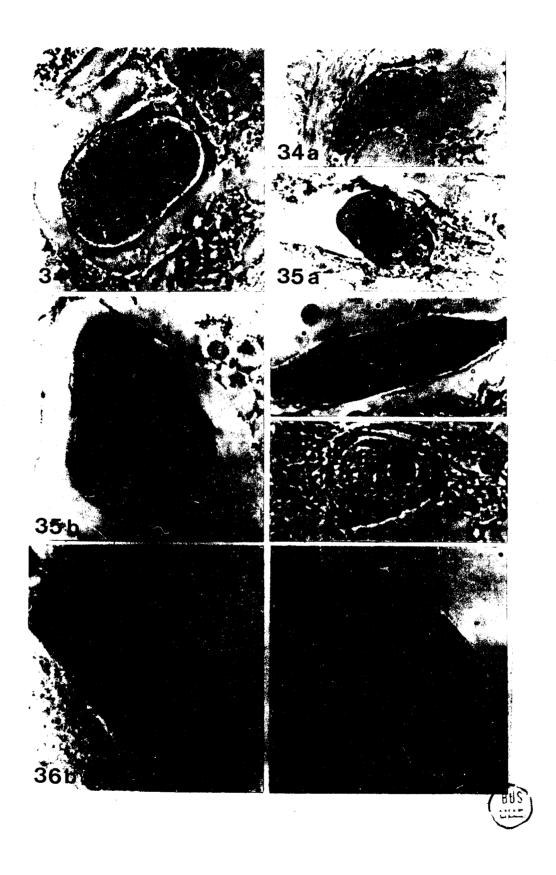
a) Spermatogonies et spermatocytes

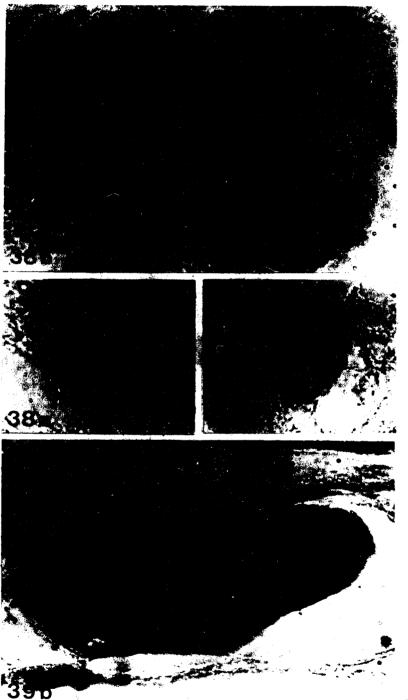
Les protéines sont régulièrement réparties dans le cytoplasme (Fig. 34, et 35), mais les protéines basiques (groupement NH₂) sont surtout localisées dans le nucléole (Fig. 36 et 37). La teneur en histones est très élevée dans le nucléole et dans certaines régions nucléaires (Fig. 38 et 39).

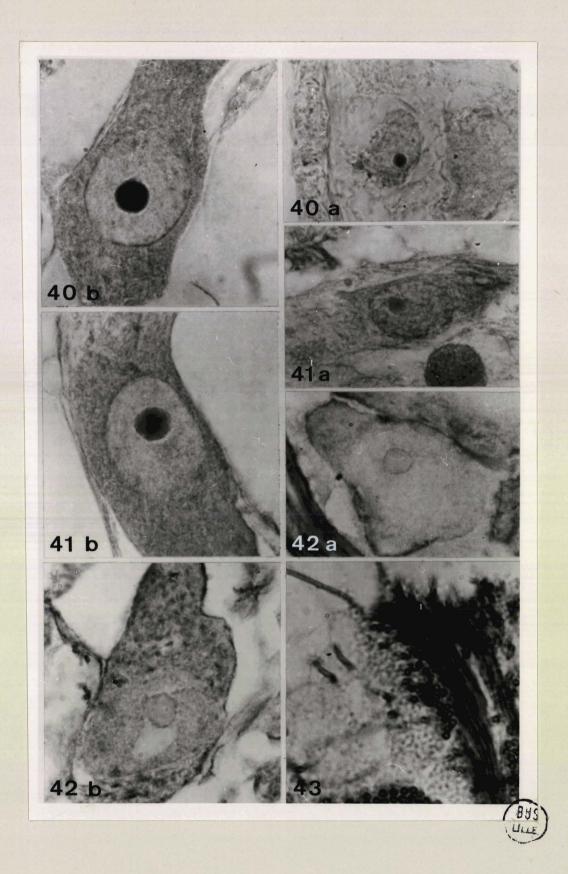
Les radicaux SH sont abondants dans le nucléole ; rares dans le cytoplasme, ils semblent absents du nucléoplasme (Fig. 40 et 41). La localisation des liaisons -S-S est différente chez les spermatogonies et les jeunes spermatocytes d'une part et chez les spermatocytes âgés d'autre part. Dans le premier cas, elles ne sont mises en évidence qu'au niveau de la membrane cellulaire (Fig. 42 a), tandis que dans le second elles se présentent en petites plages régulièrement réparties dans le cytoplasme (Fig. 42 b).

b) Spermatides et spermatozoïde

Au cours de la spermiogenèse la distribution des protéines ne présente pas de changements très importants. Leurs réactions génèrales sont fortement positives, surtout dans la queue du spermatozoïde où, cependant, elles ne se manifestent qu'au niveau de la gaine mitochondriale. Les histones sont peu abondantes et leur mise en évidence est plus facile à l'éosine Y qu'au Fast green. La concentration en radicaux SH est faible; celle des radicaux S-S est très forte (Fig. 43).







II - Acides NUCLEIQUES

a) Spermatogonies et spermatocytes

L'ADN nucléaire présente une forme réticulée ou dispersée ; sa coloration étant très faible par la technique classique du Feulgen, nous avons surtout employé la triple coloration de MORIBER et HIMES où le Schiff est remplacé par une technique utilisant l'Azur A. Cette méthode provoque une coloration nettement positive des spermatogonies et beaucoup plus faible des spermatocytes. Les résultats obtenus chez les spermatocytes peuvent trouver une explication dans la forte croissance nucléaire et la plus grande abondance de protéines associées à l'ADN ; ces protéines colorées par le Jaune Naphtol S, masquent partiellement la teinte bleue prise par l'ADN.

Ia concentration en ARN est forte ; surtout localisé dans le nucléole, il est également mis en évidence au niveau des extrusions nucléolaires et dans tout le cytoplasme (Fig. 44).

b) Spermatides et spermatozoide

Nous avons décelé une diminution progressive de la concentration en ARN au cours de la spermiogenèse. Chez le spermatozoïde l'ARN nucléaire est peu abondant (Fig. 46) il est associé à une grande quantité d'ADN (Fig. 45). La queue d'autre part, est caractérisée par la métachromasie au rouge du bleu de toluidine.



III - POLYSACCHARIDES

Une trame polysaccharidique constitue le fond cytoplasmique des spermatogonies et des spermatocytes. Toutefois certaines plages réagissent plus intensément (Fig. 48); d'après leur forme, leur dimension, et leur répartition, elles correspondent aux dictyosomes. Afin de préciser la nature du produit mis en évidence pour la coloration nous avons procédé à des extractions lipidiques par l'acétone ou la pyridine. Les dictyosomes restent PAS positifs. La coloration disparaît après acétylation; elle réapparaît après saponification. Ce sont donc des radicaux glycol qui réagissent et non des fonctions amino-alcool. Les dictyosomes renferment une substance qui semble être de nature polysaccharidique.



Fig. 48 - Mise en évidence des polysaccharides (P.A.S.). c., spermatocyte ; g., spermatogonie ; G., appareil de Golgi. x 900.

Il ne nous a pas été possible de déceler l'existence de glycogène ou de mucopolysaccharides acides, toutes les colorations spécifiques se révélant négatives.

Le spermatozoïde présente dans son ensemble une réaction négative aux polysaccharides, sauf au niveau de l'acrosome.

IV - LIPIDES

Etant donnée la nature essertiellement protéique des cellules spermatogénétiques nous n'avons pas approfondi l'étude des lipides. Nous nous sommes contentés de localiser les phospholipides; liés aux membranes, plasmiques et cytoplasmiques, ils sont responsables de la coloration noire générale après utilisation du noir Soudan B car toutes les cellules de la lignée mâle sont riches en mitochondries et en saccules golgiens.

DISCUSSION

Les cellules de la lignée spermatogénétique sont essentiellement et classiquement de nature protéique. Il faut noter la grande teneur nucléo-laire en protéines à radicaux SH. D'après GABE et MARTOJA-PIERSON (1956) ces radicaux ne sont décelés que dans les nucléoles des cellules présentant des synthèses protéiques importantes. C'est le cas des cellules germinales de \underline{L} . forficatus dont la taille lors de la croissance spermatocytaire passe de $25~\mu$ à $100~\mu$.

La métachromasie au rouge du bleu de toluidine dans la queue du spermatozoïde pose un problème important. Cette réaction pourrait être attribuée à l'existence d'un polysaccharide à fonction acide ; cependant elle est négative au bleu alcian. De plus, la métachromasie persiste après méthylation. La substance responsable n'est donc pas un mucopolysaccharide acide. Par contre, la métachromasie disparaît après action de la ribonucléase (1 heure à 37°, à pH 6,4 ou 6,8) (Fig. 47). LISON et MUTSAARS (1950) ont montré que l'ARN en solution faiblement concentrée donne une métachromasie au rouge. Notre étude, réalisée sur coupes, permettait donc de conclure à la faible concentration en ARN dans la queue du spermatozoïde mûr.

La figure 49 nous montre les principaux traits de l'évolution cytochimique au cours de la spermatogenèse. Cette évolution présente deux phases principales. L'une, incluant les stades spermatogonies et spermatocytes

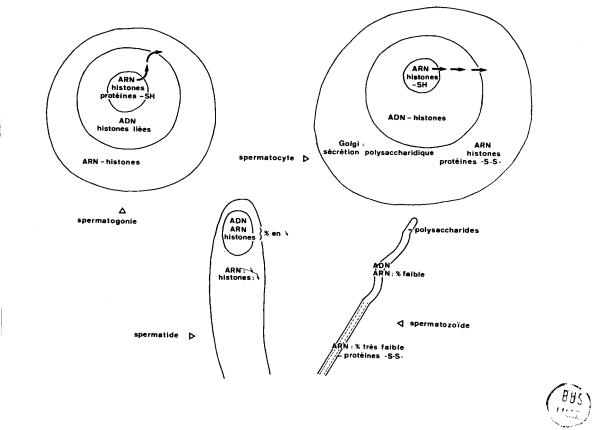


Fig. 49: Evolution cytochimique des cellules sexuelles mâles chez \underline{L} . forficatus.

est caractérisée par la synthèse de protéines basiques (histones) et d'ARN; l'autre correspond à la spermiogenèse et montre une baisse de teneur en histones et en ARN. Ces deux phases encadrent les divisions de maturation. Nous avons signalé que les spermatogonies et les spermatocytes sont éosinophiles et colorés en vert par le Fast green; cette dernière réaction est due à la présence d'histones riches en arginine. En l'absence de mesures microspectrophotométriques nous ne pouvons pas déterminer avec précision l'évolution qualitative des histones au cours de la croissance spermatocytaire. Il semble cependant que ce soient les histones riches en arginine qui prédominent. Le spermatozoïde présente une réaction positive, quoique assez faible, à l'éosine Y, et pratiquement négative au Fast green. Ces résultats sont

comparables à ceux qu'ont obtenus CIAYPOOL et BLOCH (1967) chez Chortophaga viridifasciata. Chez cet Orthoptère comme chez Lithobius la spermiogenèse est accompagnée d'une baisse de teneur en ARN et d'une diminution quantitative des histones riches en arginine, au profit des histones éosinophiles. Selon BLOCH (1966) il ne s'agit pas du remplacement d'une histone par une autre mais d'un masquage par l'histone éosinophile de l'histone colorable par le Fast green. Cet auteur estime que les histones riches en lysine pourraient jouer le rôle d'un régulateur de synthèse, non spécifique, de l'ARN, ce qui explique leur plus forte teneur relative dans les cellules qui ne subissent plus ni divisions, ni synthèses importantes, comme les spermatides et les spermatozoïdes. Des résultats comparables ont été obtenus in vitro par HUANG et BONNER (1962) et par ALLFREY, LITTAU et MIRSKY (1963).

Signalons enfin l'intérêt de l'étude de la croissance spermatocytaire. Chez <u>L. forficatus</u>, les spermatogonies subissent un accroissement considérable auquel participent une protéosynthèse et une phagocytose d'éléments dégénératifs. Il serait intéressant de savoir si les éléments phagocytés provoquent une variation, ne serait-ce que temporaire, de la teneur et de la nature des histones du spermatocyte en croissance.

CHAPITRE IV

ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES STADES SPERMATOGENETIQUES

L'étude optique des stades spermatogénétiques laisse subsister quelques imprécisions. Nous avons essayé de les lever en utilisant les techniques de la microscopie électronique. Les résultats obtenus portent surtout sur l'évolution nucléaire et cytologique lors de la croissance spermatocytaire, les modifications mitochondriales lors de la spermiogenèse et la structure du spermatozoïde.

MATERIEL et TECHNIQUES - Les testicules sont fixés au glutaraldéhyde à 6,25 % dans le tampon phosphate à pH 7,2, suivi d'une post-fixation à l'acide osmique à 1 % dans le même tampon ; l'inclusion se fait dans l'epon. Les coupes, effectuées à l'ultramicrotome Porter Blum sont contrastées à l'acétate d'uranyle, aqueux ou alcoolique, suivi ou non d'une coloration au citrate de plomb selon Reynolds.

Les grilles ont été examinées au microscope électronique HITACHI HS 7 S.

I - SPERMATOGONIE - SPERMATOCYTE

A - Spermatogonie (Fig. 50)

La chromatine est dispersée dans l'ensemble du <u>noyau</u>, elle n'est jamais périnucléaire. Certaines zones présentent une plus grande densité de grains chromatiniens.

Le nucléole est du type homogène. Il est constitué par un nucléolonéma dont les grains élémentaires (170 - 180 Å) sont arrangés en sphérules; les sphérules se détachent à la périphérie et constituent les fragments nucléolaires isolés décelés en microscopie optique.

L'enveloppe nucléaire présente sur toute sa surface de nombreux pores qui permettent le passage dans le cytoplasme d'importantes quantités de matériel nucléaire.

Les <u>mitochondries</u> sont assez peu nombreuses, et relativement petites $(0,5 \ all \ \mu)$. Elles possèdent des crêtes transversales et la matrice, dense aux électrons, montre parfois des granules.

Le cytoplasme renferme peu de <u>dictyosomes</u>. En général composés de 5 à 10 saccules aplatis, les dictyosomes sont en relation avec un important réseau réticulaire et présentent une polarité nette. A ce stade les sécrétions golgiennes sont peu abondantes.

Le matériel contenu dans les vésicules qui se détachent des saccules est peu dense.



B - Phase d'accroissement spermatocytaire

La dispersion de la chromatine dans le <u>nucléoplasme</u> augmente avec l'accroissement de taille nucléaire.

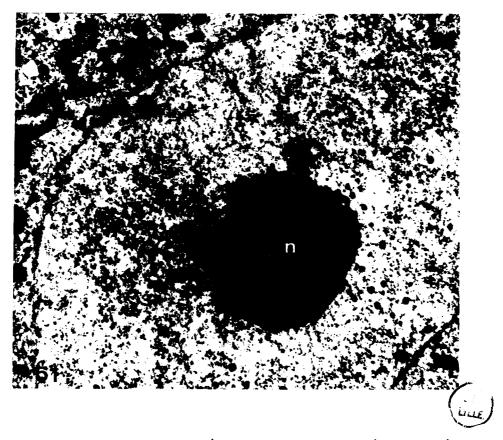
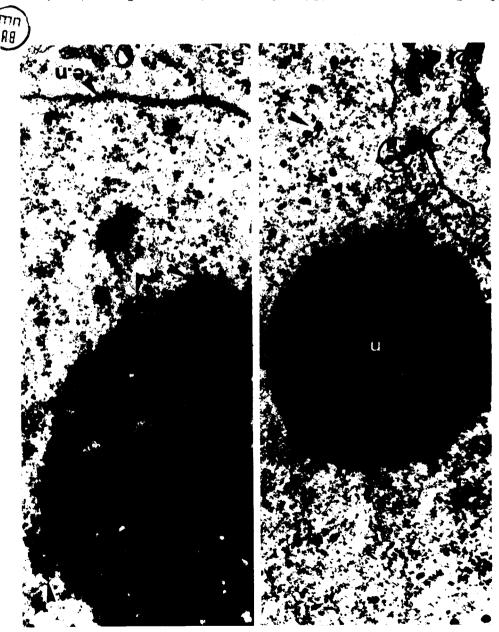


Fig. 51 - Jeune spermatocyte. D'importantes quantités de matériel dense se trouvent dans le cytoplasme (flèches). n., nucléole. x 16000.

Le nucléole tout en augmentant de volume va changer peu à peu de structure. D'abord homogène (Figs 51, 52), le nucléolonéma va présenter des espaces plus clairs qui correspondent soit à des vacuoles, soit à de la pars amorpha (Fig. 53). Seul l'emploi d'enzymes protéolytiques permettra de déterminer leur nature exacte.



16. x 14 500. au travers des pores de l'enveloppe nucléaire (cercle). n., nucléores (flèches) sont nombreuses. On observe des figures de passage Fig. 52 - Spermatocyte au milieu de sa croissance. Les extrusions nucléolai-

nucléaire, x 12 000. nucléolaires sont très nombreuses (flèches). e.n., enveloppe Fig. 53 - Spermatocyte submature. Le nucléole est vacuolisé. Les extrusions

Les extrusions nucléolaires sont très nombreuses. Nous avons pu suivre leur évolution (Fig. 54). Au voisinage de l'enveloppe nucléaire l'extrusion, de nature granulaire (1), perd progressivement sa structure (2) et présente un aspect "nuageux" (3). C'est sous cet état qu'elle traverse les pores nucléaires et pénètre dans le cytoplasme (4), où deux voies se présentent : a) accumulation de ce matériel et différenciation de grains plus denses à l'intérieur de ces amas (5 et 6). Ces derniers sont entourés de mitochondries et constituent le matériel indispensable à leur constitution - b) différenciation directe en figures ribosomales (5').

Les figures de genèse mitochondriale, déjà visibles lors du stade gonial sont plus nombreuses encore au début de la phase d'accroissement.

Dans le matériel dense (Fig. 55) apparaît un système membranaire (stade 1) qui bientôt se referme et donne naissance à une vésicule, remplie de matériel dense et dont la taille est voisine de celle d'une petite mitochondrie $(0,3~\mu)$. Les crêtes sont encore absentes et l'espace intermembranaire a la même densité que l'espace matriciel (stade 2). Ce n'est qu'ultérieurement que l'aire intermembranaire s'éclaircit (stade 3) et que les crêtes apparaissent (stade 4).

Nous avons constaté à proximité des zones où se forment des mitochondries, du reticulum agranulaire qui semble en continuité avec la membrane mitochondriale ; une espèce de ciment remplit parfois les espaces intermitochondriaux (Fig. 56).

Dans un jeune spermatocyte les <u>mitochondries</u> sont plus nombreuses et plus allongées que dans le cytoplasme gonial $(1,5 \ a \ 2 \ \mu)$. Leurs crêtes sont plus serrées et leur matrice moins dense (Fig. 57). La longueur et le nombre de mitochondries augmentent avec l'âge de la cellule.

Parallèlement s'opère un murissement mitochondrial : l'espace intracristal se dilate et constitue selon la définition d'ANDRE (1962) la pseudomatrice dont l'importance va augmenter jusqu'au stade spermatocyte I. Il y a inversion des contrastes ; la pseudomatrice prend la prépondérance sur l'espace matriciel qui est rejeté à la périphérie de la mitochondrie (Figs 58 et 59).

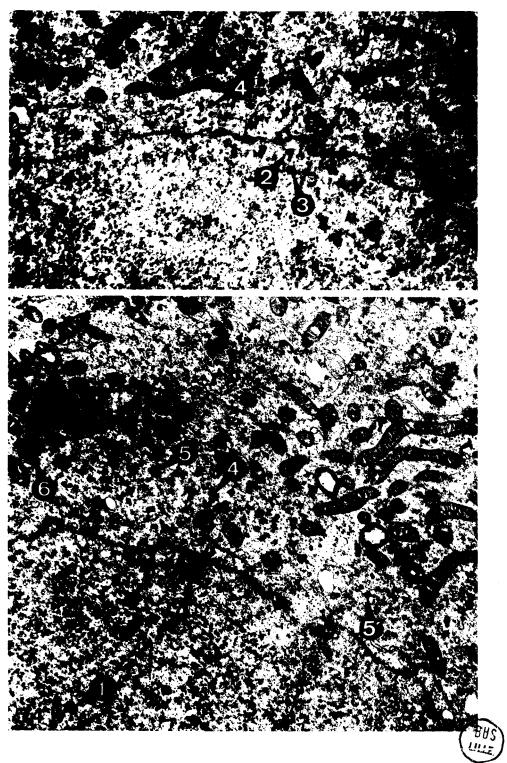


Fig. 54 - Evolution des extrusions nucléolaires. 1, 2, 3, 4, 5, 5', 6 : différents stades. x 16 000.

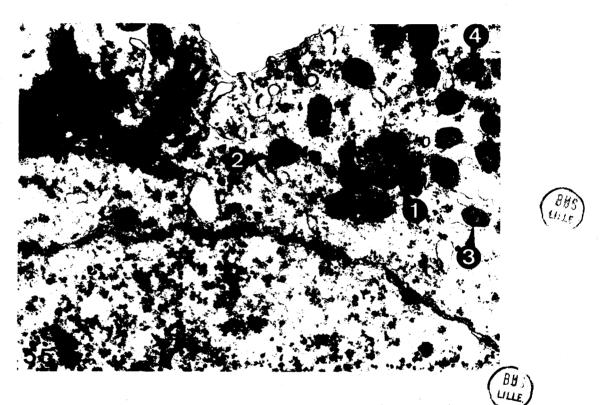


Fig. 55 - Figures de genèse mitochondriale. 1, 2, 3, 4 : différents stades. x 24 000.



Fig. 56 - Apparente relation mitochondrie-reticulum (flèche), et ciment intermitochondrial (*). x 46 000.



Fig. 57-58 - Evolution mitochondriale. Fig. 57 : Spermatocyte en cours de croissance. x 46 000. Fig. 58 : Spermatocyte submature. On remarque l'importance de la pseudomatrice. x 48 000.

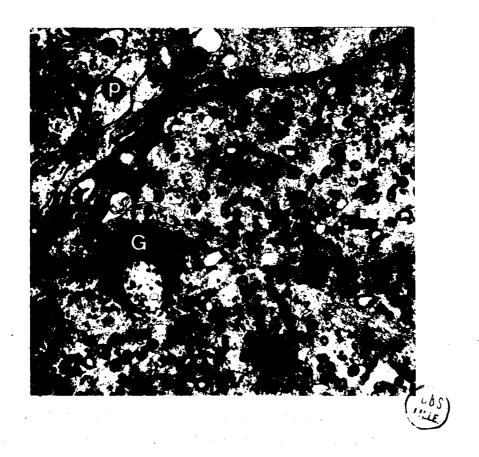
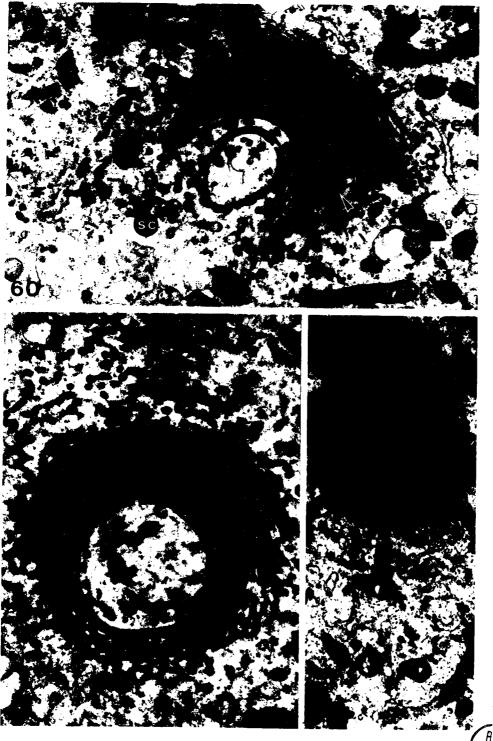


Fig. 59 - Spermatocyte submature. G., dictyoseme; p., paroi de la logette testiculaire. x 12 000.

Au cours de la croissance spermatocytaire apparaissent de nombreux <u>dictyosomes</u>, souvent en forme de fer à cheval. Extrêmement développés $(3 \text{ à } 4 \text{ } \mu)$, ils peuvent compter jusqu'à 30 ou 40 saccules pour les formes simples (Figs. 59, 60, 61), et parfois beaucoup plus pour les dictyosomes en double fer à cheval.

Chaque dictyosome est en relation étroite avec le reticulum agranulaire (Fig. 60). Les saccules présentent une structure périphérique réticulée (Fig. 62).

Les vésicules qui s'en détachent sont remplies de matériel dense et mesurent environ 650 Å de diamètre. Elles correspondent à la forme primaire de la sécrétion golgienne. L'aspect définitif des sécrétats n'est obtenu qu'après fusion de plusieurs vésicules, primaires, donnant ainsi des granules de 1500 Å de diamètre.



(B) S ULLE Nous avons déjà signalé les relations du <u>reticulum</u> avec la formation des mitochondries et ses rapports avec les dictyosomes. Le reticulum, surtout du type agranulaire, est abondant. Nous n'avons rencontré le type granulaire que dans les spermatogonies et dans les jeunes spermatocytes.

Les spermatocytes submatures renferment des concentrations réticulaires importantes (Fig. 63).

En relation avec le reticulum nous avons pu observer des structures particulières (Fig. 64) ; d'environ 0,4 μ de longueur, elles sont constituées de 6 ou 7 ensembles lamellaires légèrement arqués, et l'espace intermembranaire atteint 150 Å.

La densité en <u>ribosomes</u> augmente au cours de la croissance spermatocytaire. Ils se rencontrent surtout sous forme de polyribosomes en rosette, forme caractéristique des cellules à métabolisme élevé.

II - SPERMIOGENESE

Nous n'avons pu observer que deux phases de <u>l'évolution nucléaire</u>; chez la très jeune spermatide, avant l'apparition de la "cage nucléaire", le noyau (Fig. 65) encore subsphérique ne présente que de la chromatine, en cours de condensation. L'enveloppe nucléaire garde un aspect classique. Lorsque la spermatide est plus âgée (stade de la spire mitochondriale lâche), le noyau est très allongé et a subi un début de spiralisation. La chromatine se présente sous forme de longs filaments, vraisemblablement les chromosomes, intriqués les uns dans les autres. Les deux membranes de l'enveloppe nucléaire se sont rapprochées (200 Å) (Fig. 66).

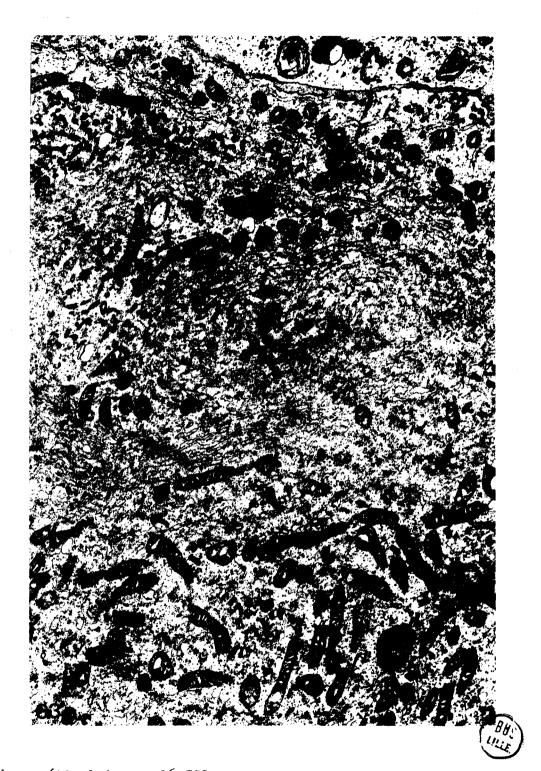
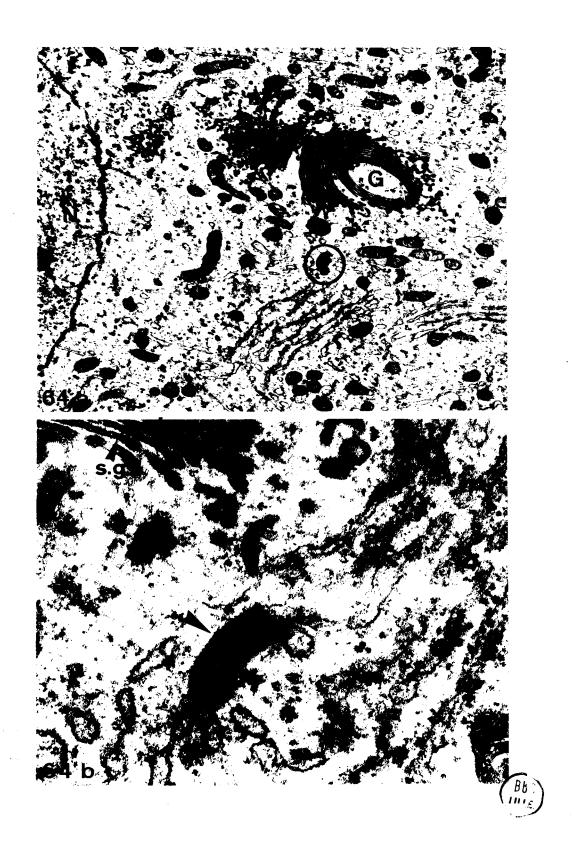
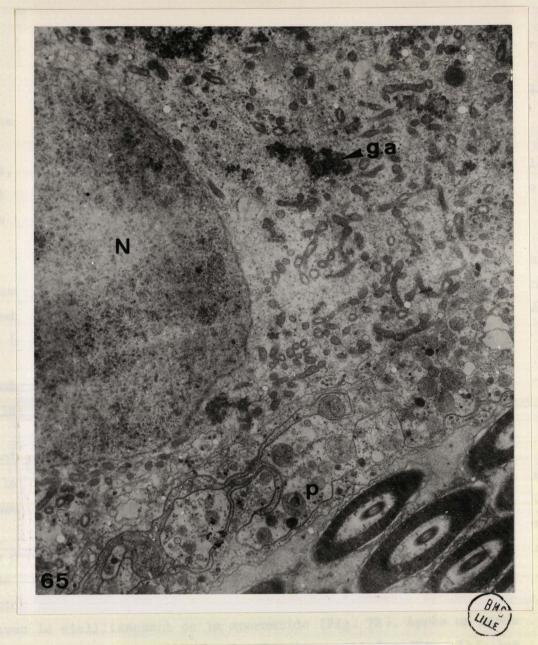
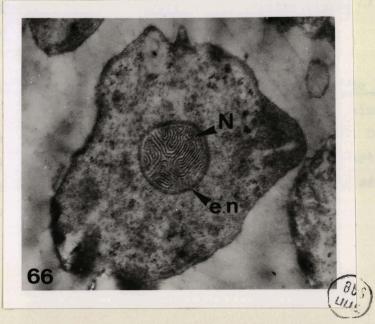


Fig. 63 - Amas réticulaire. x 16 500.







Après la méiose, les <u>mitochondries</u> jusqu'alors réparties régulièrement dans le cytoplasme, vont subir d'importants remaniements.

Dès la phase d'allongement de la spermatide et l'apparition du flagelle, elles vont se ranger sous la membrane plasmique (Fig. 67). Simultanément commencent l'élimination de la pseudomatrice et l'augmentation de l'espace matriciel. Cette évolution est accompagnée de la disparition des crêtes.

Les premières images caractéristiques d'un arrangement hélicoïdal apparaissent bientôt. D'abord très lâche, la spire est constituée d'éléments mitochondriaux à matrice uniformément dense : toute la pseudomatrice a été rejetée (Fig. 68).

Progressivement, les hélices sont plus visibles (Fig. 69). Les mitochondries paraissent s'allonger perpendiculairement à l'axe longitudinal de la spermatide.

Jusqu'alors les mitochondries n'avaient pas de rapports entre elles. C'est au cours du stade suivant qu'apparaissent des évaginations pariétales se faisant vis à vis (Fig. 70 a). Les deux hélices mitochondriales commencent à constituer une gaine continue autour du flagelle (Fig. 70 b).

Un profond changement survient dans les contrastes. Les différentes parties de la queue de la spermatide (Fig. 71) présentent de grandes variations de contraste. La densité du cytoplasme axial, d'abord très faible, est rapidement comparable à celle du manchon mitochondrial; elle s'attenuera avec le vieillissement de la spermatide (Fig. 72). Après un stade intermédiaire au cours duquel elles semblent vacuolisées (Fig. 73), les mitochondries restent denses aux électrons (Fig. 74).

Nous n'avons pas pu suivre le début de <u>la formation de l'acrosome</u>. La seule image que nous possédons (Fig. 65) nous montre des grains proacrosomiaux de C,15 μ de diamètre placés à l'un des pôles du noyau. Des dictyosomes sont visibles, avant la formation de la spire, dans la partie caudale des jeunes spermatides ; de petite taille, ils ne semblent pas sécrétér mais engagés dans un processus lytique.

Figs 67-68 - Evolution mitochondriale lors de la spermiogenèse. Fig. 67 : Spire non organisée. e., évagination de la membrane plasmique ; f., flagelle; m., mitochondrie. x 18 000. Fig. 68: Stade de la spire lâche. e., évagination de la membrane plasmique ; f., flagelle. x 19 500.

And the state of t

La de la companya de

and the contract of the contra

 $(\mathbf{v}_{t}, \mathbf{v}_{t}, \mathbf{u}_{t}, \mathbf{v}_{t}, \mathbf{v$

and the second second

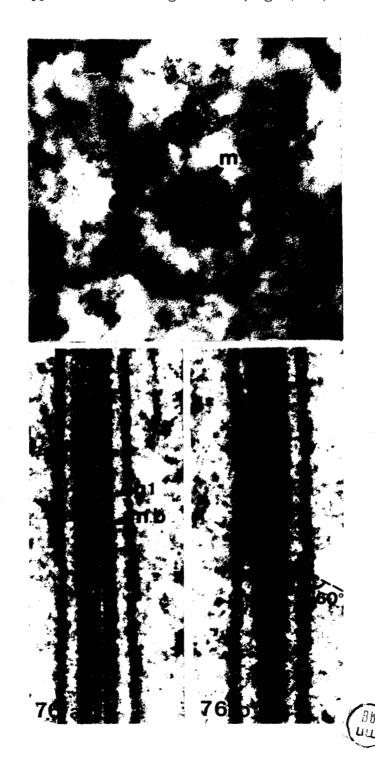
 $(\mathcal{A}_{i,j}) = \{ (\mathcal{A}_{i,j}) \mid \mathcal{A}_{i,j} = \{ (\mathcal{A}_{i,j}) \mid \mathcal{$





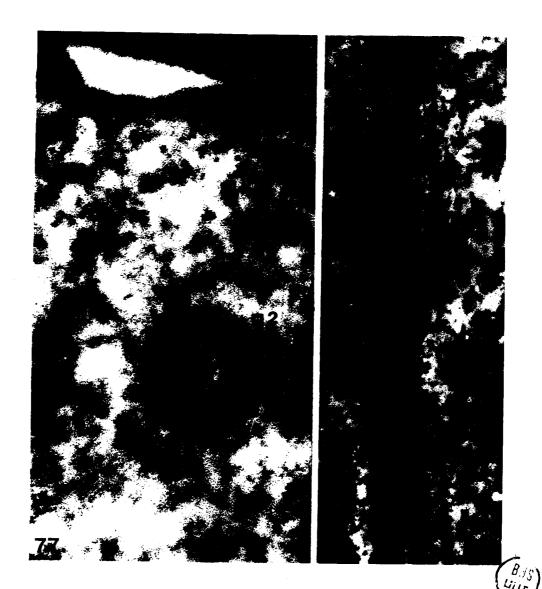


BUS LILLE Dès son apparition, le <u>flagelle</u> est entouré d'une membrane bordante et d'une couronne de microtubules (250 Å) (Fig. 75). Au cours de l'évolution spermiogénétique une première gaine apparaît autour de la structure flagellaire (Fig. 76 a). Elle semble dériver de la couronne microtubulaire. La membrane bordante persiste. La gaine présente une structure périodique inclinée à 60 ° par rapport à l'axe flagellaire (Fig. 76 b). Corrélativement



une seconde couronne de microtubules apparaît autour de ce premier ensemble; elle paraît donner naissance à une seconde gaine, dont la densité aux électrons est plus faible que celle de la première (Fig. 77). Le complexe flagellaire conserve le même aspect (Fig. 78) mais nous ne pouvons affirmer que les deux gaines présentent les mêmes structures périodiques, correspondant en fait à des hélices très serrées. Plusieurs hypothèses sont possibles : a) les structures périodiques existent sur les deux gaines et se superposent de façon parfaite - b) la structure persiste sur la gaine interne et reste visible par transparence - c) elle disparaît sur la première gaine et n'existe que sur la gaine externe.

Simultanément se forme une troisième gaine, plus mince, qui ne semble pas provenir de la transformation de microtubule (Fig. 77). La membrane bordante a disparu.



Les trois gaines dont nous venons de décrire la formation se constituent au début de la spermiogenèse. La plus externe disparaît vers la fin de la spermiogenèse; le matériel qui la constitue sert à édifier des manchons tubulaires dans lesquels se différencient les ponts transversaux intermitochondriaux (Figs 71, 72, 73, 74).

Il existe d'autre part un système microtubulaire longitudinal parallèle aux hélices mitochondriales et intercalé entre elles (Fig. 70). Il pourrait jouer un rôle dans l'élaboration des relations entre les hélices, relations que nous décrirons avec plus de précision lors de l'étude du spermatozoide.

Dès les premiers stades de la spermiogenèse les spermatides contractent des <u>rapports morphologiques</u>: des évaginations de la paroi cellulaire (Figs 67 et 68) se soudent et forment ainsi de véritables ponts. Ces derniers, plus ou moins vésiculeux (Fig. 69) au début de leur évolution, prennent un aspect cylindrique, à diamètre constant (Figs 70, 71, 73, 74), et ils ont la forme de tubules.

III - LE SPERMATOZOIDE

Le spermatozoïde de <u>L. forficatus</u> peut être divisé en ⁴ zones distinctes : l'acrosome, le noyau, la zone d'attache du noyau sur le complexe flagellaire, et la queue.

L'acrosome a un diamètre de 0,4 μ ; il est constitué par un matériel finement granulaire entouré par un système de deux doubles membranes (Fig. 79). Un étranglement est visible au niveau de la jonction noyau-acrosome (Fig. 80). Cependant en l'absence de figures plus précises, nous ne pouvons décrire avec certitude la structure même de l'acrosome et celle des systèmes membranaires.



Fig. 79 - Acrosome (a). x 67 000.

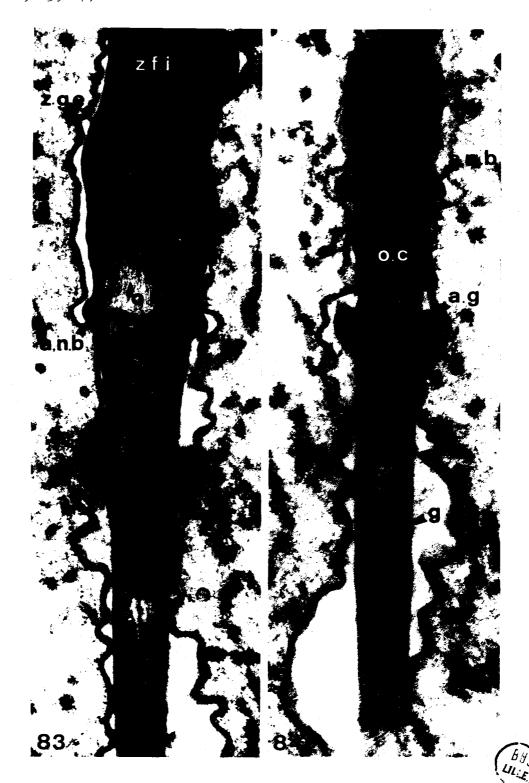
Fig. 80 - Limite acrosome-noyau : a : a., acrosome ; N., noyau. x 18 500. b : a., acrosome ; z.f.i., zone fibrillaire interne ; z.g.e., zone granulaire externe. x 43 000.

Le <u>noyau</u> mesure environ 400 μ de long sur 0,5 - 0,7 μ de large ; il est spiralé et la spirale a un pas de 2 μ . On y distingue deux zones : a) une zone centrale fibrillaire. Chaque fibrille à un diamètre de 35 Å. b) une zone granulaire externe. Il semblerait exister deux sortes de granules, variant par leur taille (60 à 150 Å) (Figs 81 et 82).



Figs 81-82 - Noyau. e.n., enveloppe nucléaire; m., membrane du spermatozoïde; z.f.i., zone fibrillaire interne; z.g.e., zone granulaire externe. Fig. 81: x 45 000. Fig. 82: x 70 000.

La zone d'attache est placée à la partie postérieure du noyau. Elle est constituée par une pièce en forme d'ogive. La région moyenne de cet organite est entourée d'un bourrelet nucléaire, de structure granulaire et sa partie basale est enveloppée par des expansions des gaines flagellaires (Figs 83, 84, 85, 87).







Ia <u>queue</u> <u>du</u> spermatozoïde présente deux parties : a) une zone flagellaire dépourvue de manchon mitochondrial (diamètre moyen 0.7μ) - b) une zone (diamètre 1.25μ) entourée d'un manchon qui présente dans sa région antérieure un aspect caractéristique (Fig. 86).

Les mitochondries sont en relation par des plis de jonction, au niveau desquels on peut observer une membrane (Fig. 88). La structure mitochondriale est profondément modifiée. Les membranes externes sont épaissies à la périphérie du manchon et au niveau des plis de jonction. Les membranes internes sont difficilement visibles. La matrice est dense aux électrons, d'une manière toutefois hétérogène (Fig. 88).

Le manchon est constitué de deux hélices principales (Figs. 88, 89, 91) elles-mêmes subdivisées en deux hélices secondaires.

Les limites entre hélices présentent une structure caractéristique, en surface et en coupe. En surface (Fig. 91) les hélices principales sont réunies par une sorte de ciment intermitochondrial dans lequel on peut observer des granules denses. En coupe, on observe un épaississement membranaire entre deux mitochondries contiguës (Fig. 88). La séparation entre les deux hélices principales est nettement visible sur des coupes transversales (Fig. 89).

Les liaisons entre hélices secondaires sont beaucoup plus étroites (Fig. 89). En surface (Fig. 91), elles ne présentent pas de structure particulière. Une coupe sagittale montre l'imbrication (l₂) qui existe entre les mitochondries des deux hélices secondaires. Au niveau de l'affrontement les membranes mitochondriales sont épaissies et se présentent sous la forme d'une sinusoïde (Fig. 88).

Enfin signalons que les hélices sont reliées par des ponts transversaux, dont nous avons déjà décrit la formation.

Le flagelle a une structure classique : 9 doublets périphériques et un doublet central. Il est entouré de deux gaines, constituée chacune par une double membrane, et dont la structure périodique est moins bien observable que chez les spermatides.

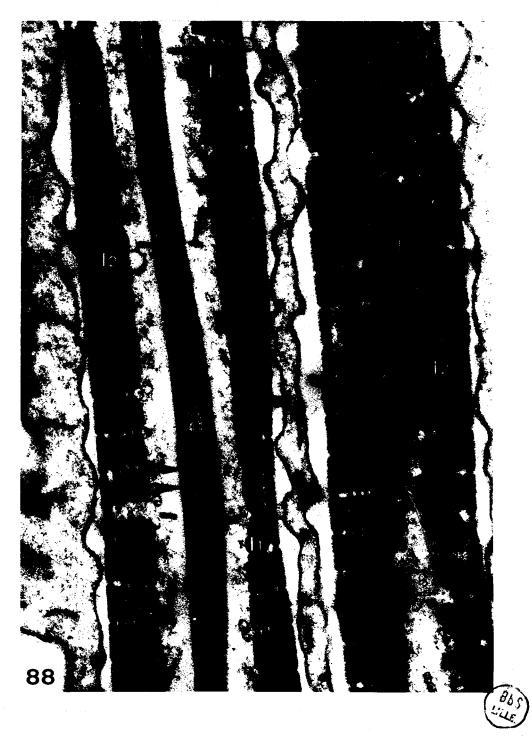
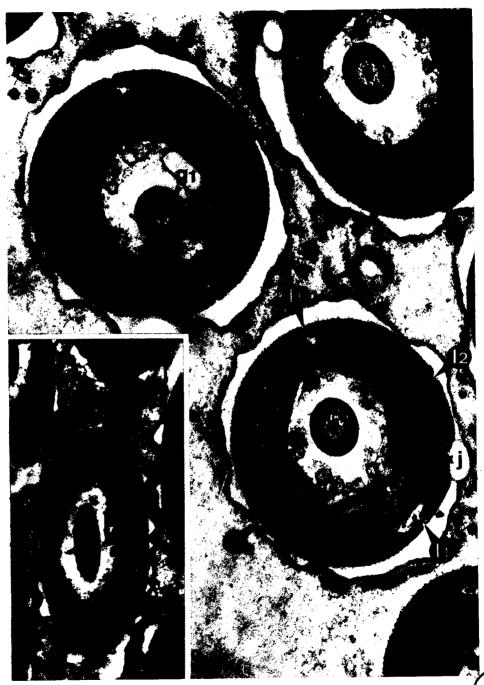


Fig. 88 - Queue du spermatozoide. Coupe longitudinale. g_1 , gaine interne ; g_2 , gaine externe ; j., pli de jonction ; l_1 , limite entre hélices principales ; l_2 , limite entre hélices secondaires ; p., pont transversal. x 40 600.



BIS

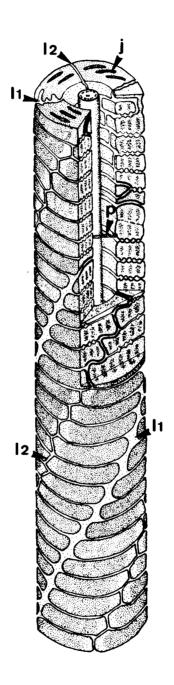


Fig. 91 - Reconstitution tridimensionnelle du manchon mitochondrial. j., pli de jonction ; l₁, limite entre hélices principales ; l₂, limite entre hélices secondaires ; p., pont transversal.

Le manchon mitochondrial se termine brusquement à l'extrémité distale du spermatozoïde, sans structure particulière de transition (Fig. 92). A ce niveau, le flagelle semble avoir perdu une partie de ses fibrilles et se termine par un petit prolongement.

Un important système tubulaire réunit entre eux les spermatozoïdes (Fig. 90). Les tubules existent sur toute la longueur du gamète, sauf peutêtre dans la région acrosomiale.

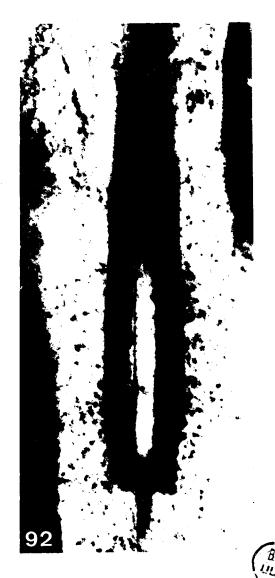


Fig. 92 - Extrémité distale de la queue du spermatozoïde. x 21 000.

DISCUSSION

L'étude ultrastructurale de la spermatogenèse de <u>L. forficatus</u> pose un certain nombre de problèmes. Au cours de la croissance spermatocytaire le cytoplasme renferme d'importants amas de reticulum endoplasmique, observation comparable à celle qui a été faite dans l'ovocyte d'<u>Ophioderma</u> (KESSEL, 1968). Cependant chez cet ovocyte il y a ultérieurement différenciation en lamelles annelées, phénomène que nous n'avons jamais observé dans les spermatocytes de <u>Lithobius</u>. Il semble donc bien qu'il s'agisse d'une simple convergence morphologique.

Les structures lamellaires arquées en relation avec le reticulum n'ont à notre connaissance jamais été décrites jusqu'alors. Profondément différents des saccules golgiens et des canaux réticulaires avec lesquels ils ne sauraient être confondus, leur rôle et leur genèse sont encore inconnus.

Nous avons constaté, comme c'est le cas dans de nombreuses spermatogenèses, que les spermatogonies sont pauvres en mitochondries. Par contre les spermatocytes I sont pourvus d'un abondant chondriome.

Il semble que la multiplication se fasse uniquement dans la zone périnucléaire au niveau d'amas de matériel dense dont nous avons décrit la formation. Le mode de formation de ces amas semble plus complexe que dans la spermatogenèse et l'ovogenèse de la Grenouille (CIEROT, 1968). Chez Lithobius, les apports nucléaires ne semblent pas être utilisés directement mais subissent une transformation intranucléaire matérialisée par la diminution de taille des granules, suivie d'une différenciation dans le cytoplasme. Une étude en cytochimie ultrastructurale permettra sans doute d'en préciser le processus.

La maturation des mitochondries est comparable à celle décrite par ANDRE (1960, 1962) dans le spermatocyte de rat ; elle s'opère par apparition de pseudomatrice dans l'espace intracristal. Par contre l'évolution mitochondriale lors de la spermiogenèse est profondément différente et ne se rapproche d'aucun cas décrit jusqu'alors, notamment en ce qui concerne les variations matricielles de densité aux électrons.

L'évolution des couronnes microtubulaires en gaines périflagellaires

à structure périodique, gaines qui prennent ensuite l'aspect de doubles membranes n'a pas été décrite dans la bibliographie. La structure des microtubules est mal connue. Ils seraient formés de sous structures filamenteuses qui pourraient également être à la base de la constitution des membranes (SANDBORN et Coll., 1965). L'hypothèse avancée par ces auteurs permettrait de comprendre les transformations observées, mais elle n'explique toutefois pas l'apparition des structures périodiques.

Le spermatozoïde de <u>Lithobius</u> présente des analogies avec celui de <u>Geophilus</u> (HORSTMANN, 1968). Les noyaux possèdent approximativement la même structure : une zone centrale fibrillaire et une zone externe granulaire, saillante et spiralée. La zone d'attache, constituée principalement par une pièce en forme d'ogive semble toutefois légèrement plus complexe chez <u>Geophilus</u>. Les principales différences sont relatives à la structure caudale. Chez <u>Lithobius</u>, elle présente deux zones distinctes, une zone proximale sous la zone d'attache et dépourvue de manchon mitochondrial et une zone distale entourée d'un manchon ; chez <u>Geophilus</u> la gaine mitochondriale est continue. Chez ce dernier, la structure même du manchon et celle de la partie postérieure de la queue sont beaucoup plus complexes.

Chez <u>Lithobius</u> les spermatides et spermatozoïdes présentent des relations morphologiques. Des structures comparables ont été décrites chez <u>Dacus oleae</u> Gmel et chez <u>Drosophila melanogaster</u> Meig. (Insectes Diptères) (BACCETTI et BAIRATI, 1965). Elles pourraient permettre les échanges entre cellules voisines et jouer un rôle dans le synchronisme des processus spermiogénétiques à l'intérieur des logettes testiculaires et dans la cohésion des paquets de spermatozoïdes lors de la formation des spermatophores.

L'examen d'une coupe sagittale de testicule met en évidence l'existence de cellules en dégénérescence. Alignées ou groupées en amas, elles alternent avec des rangées de spermatocytes normalement constitués. Leur présence a été signalée par BOUIN (1903). Selon cet auteur, les résidus cellulaires sont utilisés comme matériel alimentaire par les spermatocytes en croissance. Nous avons repris cette étude afin de préciser leur nature et les différentes étapes de leur évolution.

IV - ETUDE DES CELLULES DEGENERESCENTES TESTICULAIRES

Nous avons entrepris cette étude en microscopie optique et.en microscopie électronique.

La dégénérescence affecte généralement les jeunes spermatocytes, mais elle peut également atteindre des cellules de taille plus grande.

Le processus dégénératif se décompose en trois étapes principales :

- 1) La première étape est caractérisée par la réduction progressive du cytoplasme (Fig.93). Le noyau et surtout le nucléole restent bien visibles et conservent un aspect normal. L'examen ultrastructural révèle des transformations au niveau de tous les organites cellulaires (Fig.94). Dès le début du processus dégénératif l'appareil de Golgi cesse de fonctionner; les saccules se vacuolisent. Les granules précédemment sécrétés conservent leur aspect normal. La structure des mitochondries subit un profond remanizment : la matrice devient moins opaque aux électrons, les crêtes jusqu'alors subtransversales s'orientent longitudinalement ou s'enroulent. L'enveloppe nucléaire subsiste encore. Durant ce stade, la densité aux électrons est comparable à celle d'une cellule normale.
- 2) La deuxième phase du processus est marquée par la disparition du nucléole. L'enveloppe nucléaire disparaît; le cytoplasme et le nucléoplasme ne se différencient plus (Fig.95). La dégénérescence des organites cytoplasmiques suit son évolution (Fig.96): les sécrétions golgiennes s'agglomèrent et prennent une forme "en haltères". Les ribosomes, qui au stade précédent formaient encore des polysomes en rosette, ne se trouvent plus que sous forme isolée. La densité générale aux électrons augmente.
- 3) au terme de la dernière étape la cellule est complètement dégénérée; elle est subsphérique, et ne présente aucune structure en microscopie optique (Fig.97). L'étude ultrastructurale montre que ce résidu



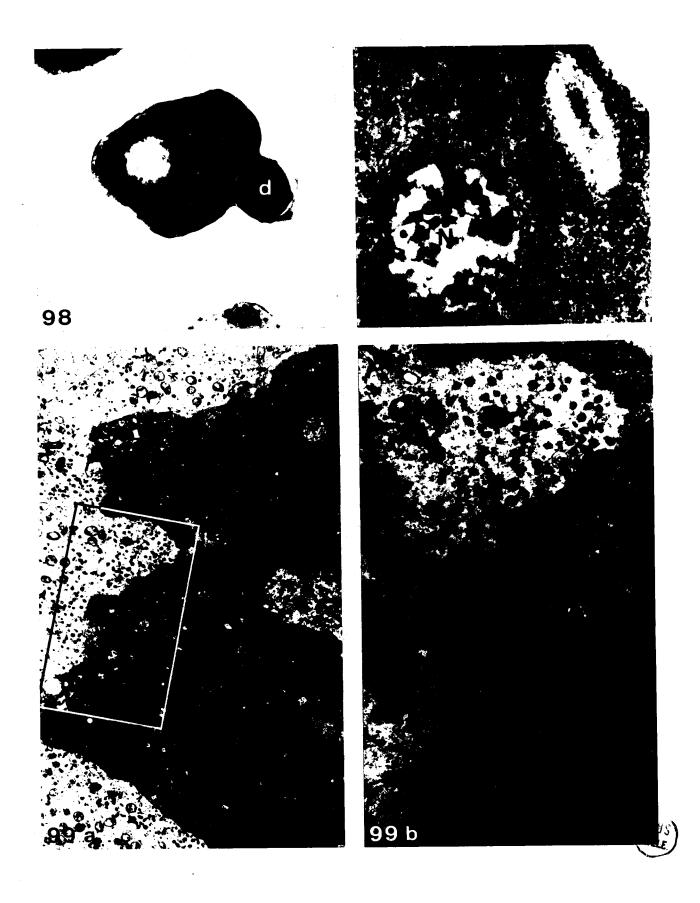
cellulaire devenu extrèmement opaque aux électrons, n'est plus formé que par un ensemble de figures myéliniques, de corps " en haltères", de mitochondries plus ou moins transformées, d'éléments provenant de la dégénérescence des différents organites. Des ribosomes occupent les espaces libres (Fig.99).

La cellule dégénérée est ensuite phagocytée (Figs.98-99). Après accolement des membranes, elle est progressivement englobée par le spermatocyte en phase d'accroissement. Le résidu cytoplasmique est absorbé; on ne distingue plus qu'une "vacuole" qui disparaît rapidement (Fig.100).

Certains spermatocytes peuvent phagocyter plusieurs éléments simultanément (Fig.101), comme le prouve l'existence de nombreuses vacuoles digestives. Dans d'autres cas, le même matériel peut être phagocyté par deux spermatocytes (Fig.102).

D'autre part, il n'est pas rare de rencontrer des cellules apparemment bi -, voire tri - ou tétranucléées (Fig.103). BOUIN (1903) avais émis l'hypothèse que ces figures résultaient de la phagocytose par un spermatocyte d'un élément dégérératif dont le noyau n'aurait subi qu'un début de pycnose. Nous pouvons confirmer cette hypothèse. En effet certaines dégénérescences suivent un processus différent de celui que nous venons de décrire : le cytoplasme diminue rapidement de volume et forme une mince couronne autour du noyau dont la structure est pratiquement conservée (Fig.104). Le spermatocyte qui phagocyte cet élément présente alors un aspect bi- ou même plurinucléé.

En microscopie électronique, certains spermatocytes montrent deux sections nucléaires qui ne sont pas séparées par une membrane plasmique. Les deux noyaux (Fig.105) ont une structure normale; leur enveloppe toute-fois a un aspect sinueux et ne semble pas être en relation avec le réticu-lum endoplasmique. Il est possible que le noyau fonctionnel ne soit pas dans le plan de coupe, mais nous ne pouvons pas affirmer que les deux noyaux visibles soient en cours de dégénérescence ou de digestion. L'étude enzy-mologique des cellules plurinucléées pourra seule nous permettre d'apporter une explication.



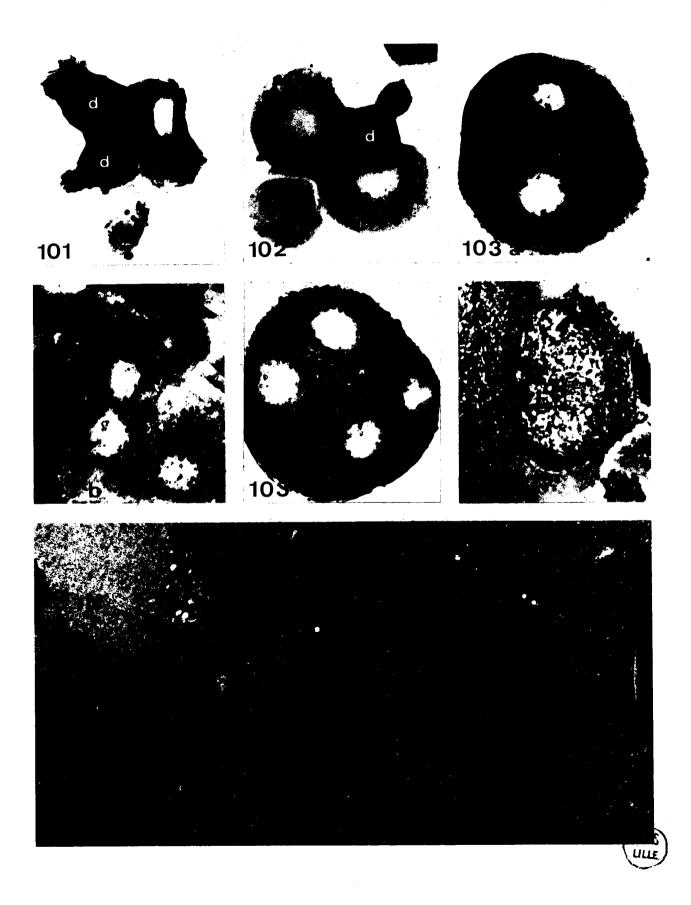
DISCUSSION

Nos observations confirment généralement celles de BOUIN. Cet auteur toutefois décrit quelques rares phénomènes de dégénérescence chez les spermatides. Certaines figures obtenues en microscopie électronique peuvent suggérer leur existence; on distingue alors des amas essentiellement mitochondriaux qui ne semblent pas devoir être phagocytés ultérieurement.

Grâce à l'étude ultrastructurale, nous avons pu préciser les différentes étapes de la dégénérescence spermatocytaire et apporter la preuve de l'existence de la phagocytose. La croissance des spermatocytes se fait par deux voies différentes; ajoutés aux synthèses métaboliques classiques les importants apports phagocytaires pourraient expliquer la grande taille des spermatocytes chez les Myriapodes Chilopodes et notamment chez L.forficatus.

Il nous est actuellement impossible d'émettre une hypothèse sur la cause des phénomènes de dégénérescence qui existent durant toute l'année quelle que soit la période du cycle spermatogénétique.

Communication of the second



CONCLUSION GENERALE

L'étude cytologique de la spermatogenèse chez <u>Lithobius forficatus</u> L. nous a permis de préciser la morphologie des différents stades spermiogénétiques et de mettre en évidence un certain nombre de phénomènes passés jusqu'alors inaperçus, (présence de deux mitoses préméiotiques, structure nucléaire des spermatides, etc ...).

Les résultats obtenus en microscopie électronique confirment les observations réalisées en microscopie optique. Le nombre de mitochondries et de dictyosomes croît depuis le stade spermatogonie jusqu'au stade spermatocyte I. Les sécrétions golgiennes sont agglomérées en granules proacrosomiaux dès les premiers stades de la spermiogenèse, et la spire mitochondriale se condense progressivement au cours des stades suivants .

L'étude ultrastructurale des très jeunes stades spermiogénétiques montre que la "cage nucléaire", visible en microscopie optique, correspond non à de véritables filaments, mais à un alignement de mitochondries suivant des lignes préférentielles. D'autre part, il est vraisemblable que l'encoche nucléaire correspond à la région qui donne naissance à la zone d'attache du spermatozoïde.

Nous n'avons pas retrouvé en microscopie électronique les deux zones du noyau des spermatides, mais elles sont visibles dans celui du spermatozoïde. La chromatine nucléaire présente une évolution progressive; d'abord granulaire, sa structure devient fibrillaire.

Enfin, seule la microscopie électronique permet l'étude fine du spermatozoïde, notamment celle de la zone d'attache et de la queue.

L'étude ultrastructurale n'a pas la prétention d'être complète; quelques points restent à préciser, en particulier la structure et la formation des asters, la structure du fuseau de séparation, la génèse de l'acrosome et l'installation du complexe centriolaire.

Les résultats obtenus par l'étude cytochimique peuvent également être comparés avec ceux de l'étude ultrastructurale. Les cellules germinales mâles sont de nature essentiellement protéique et nous n'y avons jamais décelé de glycogène et de globules lipidiques.

La dispersion des grains chromatiniens à l'intérieur du noyau des spermatogonies et des spermatocytes explique la faible coloration obtenue au Feulgen. Le cytoplasme des spermatocytes en période de croissance

est très riche en ribosomes et les extrusions nucléolaires sont nombreuses, ce qui confirme les résultats obtenus au bleu de toluidine tamponné. Nous avons également pu suivre la diminution progressive du nombre de ribosomes et l'affaiblissement corrélatif de la coloration de l'ARN au cours de la spermiogenèse. On peut ainsi expliquer la métachromasie au rouge du bleu de toluidine dans la queue du spermatozofide.

La coloration au P.A.S. des dictyosomes golgiens, faible chez les spermatogonies et intense chez les spermatocytes, correspond à l'importance de leur physiologie sécrétoire.

L'étude de la spermatogenèse chez <u>L.forficatus</u> est surtout caractérisée par des particularités cytologiques : taille des spermatocytes, existence de mitoses préméiotiques, importance de la gaine mitochondriale des spermatozoïdes. L'évolution cytochimique par contre est sensiblement comparable à celle qui a été décrite chez les autres Arthropodes, notamment chez Chortophaga viridifasciata (Insecte Orthoptère).

Le travail que nous présentons ne constitue pas un aboutissement, notamment en ce qui concerne l'étude cytologique ultrastructurale. D'autre part, le métabolisme des cellules germinales ne pourra être entièrement élucidé qu'après utilisation de diverses techniques modernes : culture in vitro, cytochimie, enzymologie et autoradiographie en microscopie électronique.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS, and SLOPER: (1955-1956) in PEARSE, A.G.E. (1961).
- ALFERT, M., and I.I. GESCHWIND: A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. Proc. Nat. Acad. Sci. 39, 991-999 (1953).
- ALLFREY, V.G., V.C. LITTAU and A.E. MIRSKY: On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. Proc. Nat. Acad. Sci. 49, 414 421 (1963).
- ANDRE, J.: L'évolution ultrastructurale du chondriome au cours de la spermatogenèse chez le Rat. Proc. European Régional Conf. Electron Microscopy, Delft 1960, Vol. II, 947-950 (1960).
- ANDRE, J.: Contribution à la connaissance du chondriome. Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogenèse. J. Ultrastruct. Res., Suppl. 3, 1-185 . (1962).
- ANSLEY, H.R.: A cytological and cytophotometric study of alternative pathways of meiosis in the house centipede (<u>Scutigera forceps</u> Rafinesque).

 Chromosoma <u>6</u>, 656-695 (1954).
- BACETTI, B. e A. BAIRATI: Indagini comparative sull'ultrastruttura delle cellule germinali maschili in <u>Dacus oleae</u> Gmel ed in <u>Drosophila melanogaster</u> Meig (Ins. Diptera). Redia, 49, 1-29 (1965).
- BARRNETT, R.J., and A.M. SELIGMAN: Histochemical demonstration of protein bound sulfhydril groups. Science, <u>116</u>, 323-327 (1952).
- BAUER, H.: Mikroskopisch-chemischer Nachweis von glycogen und einigen anderen Polysacchariden. Z. Mikr. anat. Forsch. 33, 143-160 (1933).
- BEST, F.: Uber Karminfarbung des Glykogens und der Kerne. Z. wiss. Mikr. 23, 319-322 (1906).
- BLOCH, D.P.: Histone differenciation and nuclear activity. Chromosoma 19, 317-339 (1966).
- BLOCH, D.P., and H.Y.C. HEW: Schedule of spermatogenesis in the Pulmonate snail Helix aspersa, with special reference to histone transition. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 515-532 (1960).

- BOUIN, P.: Spermatocytes en dégénérescence utilisés comme matériel alimentaire pendant la spermatogenèse. C.R. Soc. Biol. (Paris) 55, 765-767 (1903).
- BOUIN, P., et M. BOUIN: Sur la présence et l'évolution des formations ergastoplasmiques dans les cellules séminales de <u>Lithobius forficatus</u> (Lin.). Bibliogr. Anat. 7, 141-150 (1899).
- BOUIN, P., et M. BOUIN: Réduction chromatique chez les Myriapodes. C.R. Assoc. Anat., 4ème session, 74-78 (1902).
- BULMER, D.: Dimedon as an aldehyde blocking reagent to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. Stain Technol. 34, 95-98 (1959).
- CHEVREMONT, M., et J. FREDERIC: Une nouvelle méthode histochimique de mise en évidence des substances à fonction sulfhydrile. Arch. Biol. (Paris) 54, 589-605 (1943).
- CLAYPOOL, C.J., and D.P. BLOCH: Synthesis of ribonucleic acid and histone change during spermatogenesis in the grasshopper <u>Chortophaga viridifasciata</u>. Nature 215, 966-967 (1957).
- CLEROT, J.C.: Mise en évidence par cytochimie ultrastructurale de l'émission de protéines par le noyau d'auxocytes de Batraciens. J. Microscopie, 7, 973-992 (1968).
- DEITCH, A.D.: Microspectrophotometric study of the binding of the anionic dye, naphtol yellow S by tissue sections and by purified proteins. Lab. Invest. 4, 324-351 (1955).
- FABRE, J.H.: Recherches sur l'anatomie des organes reproducteurs et sur le développement des Myriapodes. Ann. Sci. Nat. Zool., 4ème série, 3, (1855).
- FEULGEN, R., und H. ROSSENBECK: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsaure von Typus der Thymonucleinsaure und auf die darauf beruhunde elecktive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparatur.

 Z. Physiol. Chem. 135, 203-248 (1924).
- FISHER, E.R., and R.D. LILLIE: The effect of methylation on basophilia. J. Histochem. Cytochem. 2, 81-87 (1954).

- GABE, M., et M. MARTOJA-PIERSON : Localisation histochimique des groupements SH dans quelques nucléoles. Ann. Histochem. I, 230-236 (1956).
- GILSON, G.: La spermatogenèse chez les Arthropodes. La Cellule 1, 1-190 (1884).
- GOLANSKI, K.: Composants plasmatiques des cellules sexuelles mâles chez <u>Lithobius forficatus</u> L. (Myriapode). C.R. Soc. Biol. (Paris) <u>100</u>, 227-229 (1929).
- HALE, C.W.: Histochemical demonstration of acid polysaccharides in animal tissues. Nature 157, 802 (1946).
- HIMES, M., B.C. MOORE, and A.W. POLLISTER: A triple test for desoxyribose nucleic acid, polysaccharides and proteins. Anat. Rec. <u>122</u>, 467-468 (1955).
- HIMES, M., and L. MORIBER: A triple stain for desoxyribonucleic acid, polysaces charid and proteins. Stain Technol. 31, 67-70 (1956).
- HORSTMANN, E.: Die Spermatozoen von <u>Geophilus linearis</u> Koch (Chilopoda). Z. Zellforsch. 89, 410-429 (1968).
- HOTCHKISS, R.D.: A microchemical reaction resulting in the staining of Polysaccharide structure in fixed tissue preparation. Arch. Biochem. 16 131-141 (1948).
- HUANG, R.C., and J. BONNER: Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis.

 Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 1216-1222 (1962).
- JOLY, R.: Contribution à l'étude du cycle de mue et de son déterminisme chez les Myriapodes Chilopodes. Bull. Biol. France Belg. 3, 379-480 (1966).
- JUBERTHIE-JUPEAU, L.: Cycle d'émission des spermatophores et évolution des testicules et des vésicules séminales au cours de l'intermue chez Scutigerella pagesi Jupeau (Symphyles). C.R. Acad. Sci. (Paris) 250, 2285-2287 (1960).
- KESSEL, R.G.: Annulate lamellae. J. Ultrastruct. Res., Suppl. 10, 1-82 (1968).
- LECHENAULT, A., et J. OLIVIER: Réactions histochimiques combinées intéressant la détection simultanée des protéines, polysaccharides, ribonucléines et lipides. Ann. Univ. A.R.E.R.S., Reims 4, 31-34 (1966).

- LEWIS, J.G.E.: The life history and ecology of the littoral centipede <u>Strigamia</u> (= <u>Scolioplanes</u>) <u>maritima</u> Leach. Proc. Zool. Soc. Lond. <u>137</u>, 221-248 (1961).
- LEWIS, J.G.E.: The food and reproductive cycles of the centipedes <u>Lithobius</u>

 variegatus and <u>Lithobius forficatus</u> in a Yorkshire woodland. Proc.

 Zool. Soc. Lond. 144, 269-283 (1965).
- LILLIE, R.D.: Acetylation and nitrosation of tissue amines in histochemistry.

 J. Histochem. Cytochem. 6, 352-362 (1958).
- LISON, L.: Sur la réaction de Bauer appliquée à la recherche histochimique du glycogène. C.R. Soc. Biol. (Paris) 143, 117 (1949).
- LISON, L.: Histochimie et cytochimie animales. Gauthier-Villars, Paris (1960).
- LISON, L., et W. MUTSAAR: (1950) in LISON L. (1960).
- MAC MANUS, J.F.A.: Histological demonstration of mucin after periodic acid. Nature 158, 202 (1946).
- MEVES, Fr., und K. v. KORFF: Zur Kenntnis der Zelltheilung bei Myriapoden. Arch. mikr. anat. 57, 481-486 (1901).
- NATH, V.: Spermatogenesis of <u>Lithobius forficatus</u>. Proc. Cambridge Phil. Soc., B. 1, 270-277 (1925 a).
- NATH, V.: Mitochondria and sperm tail with particular reference ot moths, scorpions and centipedes: Quart. J. micr. Sci. 69, 643-659 (1925 b).
- NATH, V.: Cytology of spermatogenesis. Int. Rev. Cytol. 5, 395-453 (1956).
- NATH, V.: Animal gametes. Res. Bull. Panjab Univ. 95-99, 1-207 (1957).
- NEGREA, S.: Aperçu sur les Chilopodes cavernicoles de Roumanie. Communic. orale, ler Congr. int. Myriapod., Paris (1968).
- PEARSE, A.G.E.: Histochemistry-Theoretical and Applied. J. and A. CHURCHILL Ltd, London (1961).
- POLLISTER, A.W., and H. RIS: Nucleoprotein determination in cytological preparation. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 12, 147-157 (1947).

- PRENANT, A.: Observations eytologiques sur les éléments séminaux de la Scolopendre (Scolopendra morsitans, Gerv.) et de la Lithobie (Lithobius forficatus). La Cellule 3, 415-442 (1887).
- PRENANT, A.: L'origine du fuseau achromatique nucléaire dans les cellules séminales de la Scolopendre. C.R. Soc. Biol. (Paris) 44, 249-253 (1892).
- PRUNESCO, C.: Anatomie microscopique du système génital mâle des Lithobiidés (<u>Lithobiomorpha</u>, <u>Chilopoda</u>). Rev. Roumaine Biol., <u>9</u>, 101-107 (1964).
- ROBERTS, H.: An ecological study of the arthropods of a mixed beech-oak woodland, with particular reference to <u>Lithobiidae</u>. Ph. p. thesis, Univ. of Southampton (1956).
- SANDBORN, E., A. SZEBERENYI, P.E. MESSIER and P. BOIS: A new membrane model derived from a study of filaments, microtubules and membranes. Rev. Can. Biol. 24, 243-276 (1965).
- SERRA, J.A., et R.W. KOSHMAN: Synchronous divisions in spermatogonial cells of a snail. Canad. J. Genet. Cytol. 9, 38-43 (1967).
- STEEDMAN, H.F.: Alcian blue 8GS: a new stain for mucin. Quart. J. Mier. Sci. 91, 477-479 (1950).
- TÖNNIGES, C.: Beiträge zur Spermatogenese und Oogenese der Myriapoden. Z. wiss. Zool. 71, 328-335 (1902).
- TURCHINI, J., P. CASTEL, et MAU VAN KIEN: (1943, 1944) in LISON L. (1960).
- TUZET, O., et J.F. MANIER: La spermatogenèse de <u>Lithobius calcaratus</u> C. Koch (Myriapode, Chilopode). C.R. Acad. Sci. (Paris)232, 882-884 (1951).
- TUZET, O., et J.F. MANIER : Les spermatozoïdes de quelques Myriapodes Chilopodes et leur transformation dans le réceptable séminal de la femelle. Ann. Sci. Nat. Zool. 15, 221-230 (1954).
- VERHOEFF, K.W.: Über die Entwicklungsstufen der Steinläufer, Lithobiiden und Beiträge zur Kenntnis der Chilopoden. Zool. Jb. suppl. VII, 195-298 (1905).

- WALKER, M., and H.C. MAC GREGOR: Spermatogenesis and the structure of the mature sperm in Nucella lapillus (L.). J. Cell. Sci. 3, 95-104 (1968).
- YASUMA, A., and T. ICHIKAWA: Ninhydrin-Schiff and alloxan-Schiff staining. A new histochemical staining method for protein. Nagaya J. Mec. Sc. <u>15</u>, 96-102 (1952).
- YASUMA, A., and T. ICHIKAWA: Ninhydrin-Schiff and alloxan-Schiff staining. A new histochemical staining method for protein. J. Laborat. Clin. Med. 41, 296-299 (1953).
- ZERBIB, C.: Etude descriptive et expérimentale de la différenciation de l'appareil génital du Myriapode Chilopode <u>Lithobius forficatus</u> L. Bull. Soc. Zool. Fr. 91, 203-215 (1966).

