

N° d'ordre 216

50.376

1970

101-1

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DES SCIENCES

THÈSE

présentée

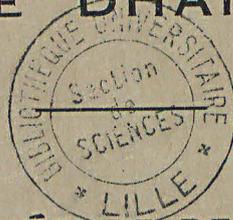
A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR
ÈS SCIENCES NATURELLES

par

ANDRÉ DHAINAUT



CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA GAMÉTOGÉNÈSE
DES NÉRÉIDIENS (ANNÉLIDES POLYCHÊTES)
DANS LES CONDITIONS NATURELLES ET EN L'ABSENCE
D'HORMONE CÉRÉBRALE

Soutenue le 30 Septembre 1970

devant la commission d'examen

MM. R. DEFRETIN, Président
M. DURCHON, Rapporteur
E. VIVIER, Examineur
R. _____ invité



50376
1970
N^o d'ordre
101-1

50.376
1970
101-1

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DES SCIENCES

THÈSE

présentée

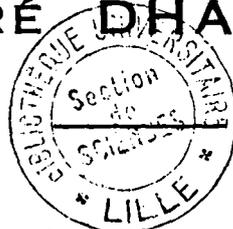
A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR
ÈS SCIENCES NATURELLES

par

ANDRÉ DHAINAUT



**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA GAMÉTOGÈSE
DES NÉRÉIDIENS (ANNÉLIDES POLYCHÈTES)
DANS LES CONDITIONS NATURELLES ET EN L'ABSENCE
D'HORMONE CÉRÉBRALE**

Soutenu le Septembre 1970
devant la commission d'examen

MM. R. DEFRETIN,	Président
M. DURCHON,	Rapporteur
E. VIVIER,	Examineur
R. FOLLIOU,	Membre invité

FACULTE DES SCIENCES DE LILLE

DOYENS HONORAIRES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. ARNOULT, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, DEHEUVELS, DEHORNE,
DOLLE, FLEURY, P. GERMAIN, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG,
Mme LELONG, MM. MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PAUTHENIER, ROIG,
ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKY, CORDONNIER.

DOYEN

M. R. DEFRETIN, Professeur de Biologie Marine

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie et Calcul Numérique
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	I.U.T. Lille
M. BLOCH Vincent	Psychophysiologie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUCHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques
M. DEDECKER Paul	Mathématiques
M. DEHORS	Automatique
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Animale
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique des Fluides
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LIEBAERT	I.U.T. Lille
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. MORIAMEZ Michel	I.U.T. Valenciennes

M. MARTINOT LAGARDE	Mécanique des Fluides
M. PEREZ Jean Pierre	Physique
M. PHAM MAU QUAN	Mathématiques
M. POUZET Pierre	I.U.T. Lille
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Mathématiques
M. TILLIEU Jacques	Physique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Minérale Appliquée E.N.S.C.L.
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WATERLOT Gérard	Géologie et Minéralogie
M. WERTHEIMER Raymond	Physique

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BENABOU Jean	Mathématiques
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. LEBRUN André	C.U.E.E.P.
M. PARREAU Michel	Mathématiques
M. SAVARD Jean	Chimie Générale
M. SCHALLER François	Biologie Animale
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BODART Marcel	Biologie Végétale
M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique et Minérale 1er Cycle
M. DERCOURT Jean Michel	Géologie et Minéralogie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique
M. LINDER Robert	Biologie Végétale
Mle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Minérale Appliquée
M. PROUVOST Jean	Géologie et Minéralogie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés des fonctions)

M. ABBAR	I.U.T. Amiens
M. AUBIN Thierry	Mathématiques Pures
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BILLARD Jean	Physique
M. BROUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLET Pierre	Physique
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRIDOUX Michel	I.U.T. Béthune
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Calcul Numérique
M. CHOQUET Marcel	I.U.T. Lille
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COULON Jean-Paul	Electrotechnique
M. GOURMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAUT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD de la MARRE Pierre	Calcul Numérique
M. JOLY	Biologie Animale
Mlle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie Générale
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANDAIS Jean	Chimie Organique
M. LAURENT François	Automatique
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LEROY Jean-Marie	E.N.S.C.L.
M. LEROY Yves	I.U.T. Lille
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Sciences Appliquées
M. MONSIGNY Michel	Chimie Biologique

M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
Mme MORIAMEZ BOULLET Claude	I.U.T. Valenciennes
M. NICOLE Jacques	E.N.S.C.L.
M. PANET Marius	Electrotechnique
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mécanique des Fluides
M. PONSOLLE	C.S.U. Valenciennes
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY	Radioélectrique
M. ROOS Philippe	I.U.T. Lille
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SAADA Georges	Physique
M. SALMER Georges	Electronique
M. SMET Pierre	Physique
M. SEGUIER Guy	I.U.T. Béthune
M. THOMAS Daniel	C.S.U. Valenciennes
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Mathématiques

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA GAMETOGENESE DES NEREIDIENS
(ANNELIDES POLYCHETES) DANS LES CONDITIONS NATURELLES ET
EN L'ABSENCE D'HORMONE CEREBRALE.

André DHAINAUT

Laboratoire de Biologie Animale
Centre de Recherches sur la Cellule et Laboratoire
Associé au CNRS n° 148
Faculté des Sciences de LILLE.

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	p. 1
<u>MATERIEL et TECHNIQUES</u>	p. 4
I - Techniques de microscopie photonique.....	p. 4
II - Techniques de microscopie électronique.....	p. 4
A - Techniques d'observations morphologiques.....	p. 4
B - Techniques de cytochimie ultrastructurale.....	p. 4
1 - Méthode de détection des polysaccharides et glycoprotéines.....	p. 4
2 - Techniques de coloration des acides nucléiques...	p. 5
3 - Techniques de digestions enzymatiques.....	p. 5
4 - Techniques de détection d'activités enzymatiques.	p. 5
III - Techniques autoradiographiques.....	p. 6
1 - Microscopie photonique.....	p. 6
2 - Microscopie électronique.....	p. 6
IV - Techniques de culture organotypique.....	p. 7

PREMIERE PARTIE

OVOGENESE NATURELLE

<u>CHAPITRE I - CROISSANCE OVOCYTAIRE ET STADES CYTOLOGIQUES</u>	p. 9
I - Courbe de croissance ovocytaire.....	p. 9
A - <u>Nereis pelagica</u>	p. 10
B - <u>Perinereis cultrifera</u>	p. 11
C - <u>Nereis diversicolor</u>	p. 12
II - Stades ovocytaires.....	p. 12
A - <u>N. pelagica</u> et <u>P. cultrifera</u>	p. 13
1 - Stade I : prévitellogenèse.....	p. 13
2 - Stade II : élaboration du vitellus protéique.....	p. 13
3 - Stade III : élaboration des polysaccharides.....	p. 14
4 - Stade IV : maturation ovocytaire.....	p. 14
5 - Relation entre les stades cytologiques et les courbes de croissance ovocytaire'.....	p. 15

B - <u>N. diversicolor</u>	p. 15
Conclusion.....	p. 16
<u>CHAPITRE II - ETUDE DU METABOLISME OVOCYTAIRE</u>	p. 17
I - Incorporation d'uridine ³ H.....	p. 18
II - Incorporation de leucine ³ H.....	p. 19
III - Incorporation de lysine et d'arginine ³ H.....	p. 21
IV - Discussion.....	p. 23
1 - Métabolisme de l'ARN.....	p. 23
2 - Métabolisme des protéines totales.....	p. 24
3 - Métabolisme des protéines basiques.....	p. 25
Conclusion.....	p. 27
<u>CHAPITRE III - LE NOYAU</u>	p. 29
I - Evolution nucléaire des ovogonies et des jeunes ovocytes..	p. 29
A - Etude cytologique des ovogonies et des ovocytes en prophase de méiose.....	p. 30
B - Etude autoradiographique des synthèses d'ADN.....	p. 31
1 - Etude " <u>in vitro</u> ".....	p. 31
2 - Etude " <u>in vivo</u> ".....	p. 33
C - Discussion.....	p. 33
II - Lamelles annelées et inclusions intra-nucléaires.....	p. 35
A - Les lamelles annelées intra-nucléaires (<u>N. pelagica</u>)..	p. 35
B - Les vésicules intra-nucléaires (<u>N. diversicolor</u>).....	p. 36
Conclusion.....	p. 36
<u>CHAPITRE IV - LE NUCLEOLE</u>	p. 38
I - Etude au microscope photonique.....	p. 38
1 - <u>N. pelagica</u>	p. 38
2 - <u>N. diversicolor</u>	p. 39
II - Etude au microscope électronique.....	p. 40
A - Stade de prévitellogénèse.....	p. 40
1 - Reconstitution du nucléole.....	p. 40
2 - Edification du massif nucléolaire.....	p. 41
3 - Structure du massif nucléolaire.....	p. 41

B - Evolution nucléolaire au cours de la vitellogenèse.....	p. 43
1 - Phase d'accroissement du nucléole.....	p. 43
2 - Dissociation du nucléole.....	p. 43
C - Stade d'élaboration des mucopolysaccharides.....	p. 44
1 - Reconstitution de l'appareil nucléolaire.....	p. 44
2 - Structure de l'appareil nucléolaire.....	p. 45
3 - Dislocation de l'appareil nucléolaire.....	p. 45
D - Stade de la maturation sexuelle.....	p. 46
III - Discussion.....	p. 46
1 - Relations entre les observations réalisées au microscope photonique et au microscope électronique	p. 46
2 - Edification du complexe nucléolaire.....	p. 47
3 - Evolution structurale des constituants nucléolaires au cours de l'ovogenèse.....	p. 49
4 - Signification physiologique du cycle évolutif des nucléoles.....	p. 51
5 - Le problème de l'ADN intra-nucléolaire.....	p. 53
Conclusion.....	p. 54
<u>CHAPITRE V - EVOLUTION DES EXTRUSIONS NUCLEAIRES DANS LE CYTOPLASME.</u>	p. 56
I - Observations morphologiques.....	p. 56
A - <u>N. pelagica</u>	p. 56
1 - Période de prévitellogenèse et de vitellogenèse...	p. 56
- Formation des agrégats cytoplasmiques.....	p. 56
- Evolution des agrégats cytoplasmiques.....	p. 58
2 - Phase d'élaboration des mucopolysaccharides et maturation ovocytaire.....	p. 59
B - <u>P. cultrifera</u> et <u>N. diversicolor</u>	p. 59
II - Résultats autoradiographiques.....	p. 59
III - Discussion.....	p. 62
1 - Passage du matériel nucléaire dans le cytoplasme..	p. 62
2 - Structure et nature chimique des agrégats cytoplasmiques.....	p. 63
3 - Evolution des extrusions nucléaires dans le cyto- plasme.....	p. 65
4 - Etude cinétique des transferts de matériel nucléaire.....	p. 66
Conclusion.....	p. 67

<u>CHAPITRE VI - LES PROCESSUS DE VITELLOGENESE</u>	p. 68
I - Structure du cytoplasme au cours des stades de prévitellogénèse.....	p. 68
II - Stade d'apparition du vitellus.....	p. 69
III - La vitellogénèse au cours de la phase de grand accroissement.....	p. 70
A - Etude morphologique.....	p. 70
1 - Formation des nouveaux lobules de vitellus protéique.....	p. 71
2 - Processus d'accroissement des lobules vitellins.	p. 72
B - Etude autoradiographique.....	p. 74
1 - Techniques.....	p. 74
2 - Résultats.....	p. 74
IV - Discussion.....	p. 76
A - Etude comparative des processus de vitellogénèse.....	p. 76
B - Formation du vitellus.....	p. 78
C - La synthèse des protéines.....	p. 78
Conclusion.....	p. 81
 <u>CHAPITRE VII - PROCESSUS D'ELABORATION DES MUCOPOLYSACCHARIDES ET MATURATION OVOCYTAIRE</u>	p. 82
I - <u>Nereis pelagica</u> et <u>Perinereis cultrifera</u>	p. 83
A - Les formations alvéolaires.....	p. 83
1 - Etude cytochimique.....	p. 83
2 - Etude morphologique.....	p. 85
B - Processus d'élaboration du matériel mucopolysaccha- ridique.....	p. 85
1 - Etude morphologique.....	p. 85
2 - Etude autoradiographique.....	p. 86
C - Remaniement structural du cytoplasme lors de la maturation ovocytaire et de la fécondation.....	p. 88
1 - L'auréole basophile péri-nucléaire.....	p. 88
2 - Les lobules lipidiques.....	p. 88
3 - Les lobules de vitellus protéique.....	p. 89
4 - La zone corticale.....	p. 89
5 - Destinée des mucopolysaccharides lors de la fécondation.....	p. 90

II - <u>Nereis diversicolor</u>	p. 91
A - Les formations corticales.....	p. 91
1 - Les alvéoles corticaux.....	p. 92
2 - Les granules corticaux.....	p. 92
B - Morphologie de l'appareil de Golgi et de son matériel sécrétoire.....	p. 93
1 - Morphologie du premier type de dictyosome.....	p. 93
2 - Morphologie du deuxième type de dictyosome.....	p. 94
3 - Dictyosomes à caractères intermédiaires.....	p. 95
III - Discussion.....	p. 96
A - Les formations corticales.....	p. 96
1 - Lobules mucopolysaccharidiques et alvéoles corticaux.....	p. 96
2 - Les granules corticaux.....	p. 97
B - L'appareil de Golgi.....	p. 98
1 - Rôle de l'appareil de Golgi dans l'élaboration des formations corticales.....	p. 98
2 - Evolution fonctionnelle de l'appareil de Golgi.	p. 101
3 - Les processus d'involution de l'appareil de Golgi.....	p. 103
Conclusion.....	p. 103
 <u>CHAPITRE VIII - L'ENVELOPPE OVOCYTAIRE</u>	 p. 105
I - Structure de la paroi des ovocytes jeunes.....	p. 105
II - Structure de la paroi des ovocytes en phase de vitellogenèse.....	p. 106
A - Etude morphologique.....	p. 106
1 - Les villosités.....	p. 106
2 - Le chorion.....	p. 107
3 - Les invaginations de la membrane plasmique.....	p. 107
B - Etude cytochimique.....	p. 108
1 - Microscopie optique.....	p. 108
2 - Microscopie électronique.....	p. 108
III - Modification de la structure de la paroi au cours de la maturation de l'ovocyte.....	p. 108
1 - Le chorion.....	p. 108
2 - Les villosités.....	p. 109

IV - Les remaniements de la paroi ovocytaire lors de la fécondation.....	p. 110
V - Discussion.....	p. 111
1 - Etude comparative de la structure de l'enveloppe ovocytaire.....	p. 111
2 - Le chorion.....	p. 111
3 - Les villosités.....	p. 113
Conclusion.....	p. 114
 <u>CHAPITRE IX - LES ELEOCYTES - RAPPORTS ELEOCYTES-OVOCYTES.....</u>	 p. 115
I - Structure et activité physiologique des éléocytes des individus atokes.....	p. 116
A - Zone de formation des éléocytes.....	p. 116
B - Structure des éléocytes libres.....	p. 117
C - Les processus d'endocytose.....	p. 118
1 - Morphologie.....	p. 118
2 - Injection de thorotrast.....	p. 118
3 - Détection enzymatique.....	p. 119
D - Les granules protéiques du cytoplasme.....	p. 119
1 - Morphologie.....	p. 119
2 - Mode de formation.....	p. 120
E - Discussion.....	p. 120
1 - Activité phagocytaire.....	p. 121
2 - Les granules cytoplasmiques.....	p. 122
Conclusion.....	p. 122
II - Evolution cytologique des éléocytes à l'approche de la maturité sexuelle.....	p. 123
A - <u>Nereis pelagica</u>	p. 123
1 - Eléocytes des individus femelles.....	p. 123
2 - Eléocytes des individus mâles.....	p. 125
B - <u>Nereis diversicolor</u> et <u>Perinereis cultrifera</u>	p. 125
C - Discussion.....	p. 126
III - Les relations éléocytes-ovocytes.....	p. 127
A - Données morphologiques.....	p. 127
B - Données autoradiographiques.....	p. 128
1 - Métabolisme du glycogène.....	p. 128
2 - Métabolisme des ARN et des protéines.....	p. 129

C - Discussion.....	p. 130
Conclusion du chapitre.....	p. 132
<u>CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE.....</u>	p. 135

DEUXIEME PARTIE

INCIDENCE DE LA LEVEE DE L'INHIBITION CEREBRALE
SUR L'EVOLUTION DE LA GAMETOGENESE

<u>INTRODUCTION.....</u>	p. 138
<u>CHAPITRE X - ETUDE BIOMETRIQUE ET CYTOLOGIQUE DE L'EVOLUTION</u>	
<u>OVOCYTAIRE EN L'ABSENCE D'HORMONE CEREBRALE.....</u>	p. 140
I - Techniques d'expérimentation.....	p. 140
1 - Expérimentation " <u>in vivo</u> ".....	p. 140
2 - Expérimentation " <u>in vitro</u> ".....	p. 140
II - <u>Nereis pelagica</u>	p. 141
1 - Résultats biométriques.....	p. 141
2 - Evolution cytologique.....	p. 142
III - <u>Perinereis cultrifera</u>	p. 143
1 - Période estivale.....	p. 143
2 - Période hivernale.....	p. 143
IV - <u>Nereis diversicolor</u>	p. 144
A - Etude " <u>in vivo</u> ".....	p. 144
1 - Résultats biométriques.....	p. 144
2 - Etude cytologique.....	p. 145
B - Etude " <u>in vitro</u> ".....	p. 145
1 - Parapodes isolés.....	p. 146
2 - Réassociation en cours de culture de prostomiums à des parapodes initialement isolés.....	p. 146
3 - Associations parapodes et prostomiums d'âges différents.....	p. 147
V - Discussion.....	p. 147
1 - Accroissement de volume.....	p. 147
2 - Evolution cytologique.....	p. 148
Conclusion.....	p. 149

CHAPITRE XI - INFLUENCE DE L'ABSENCE D'HORMONE CEREBRALE SUR LE METABO-
LISME OVOCYTAIRE...... p. 151

I - Matériel et techniques.....	p. 151
II - Incorporation d'uridine ³ H.....	p. 152
III - Incorporation de leucine ³ H.....	p. 153
IV - Incorporation de lysine ³ H et d'arginine ³ H.....	p. 154
V - Discussion.....	p. 155
Conclusion.....	p. 156

CHAPITRE XII - LE NOYAU ET LES INCLUSIONS NUCLEAIRES...... p. 157

I - Le nucléole.....	p. 157
1 - Observations.....	p. 157
2 - Discussion.....	p. 158
II - Les inclusions intra-nucléaires.....	p. 158
A - Les lamelles annelées intra-nucléaires.....	p. 158
1 - Etude morphologique.....	p. 158
2 - Mode de formation.....	p. 159
B - Les vésicules intra-nucléaires.....	p. 159
1 - Etude morphologique.....	p. 159
2 - Etude cytochimique.....	p. 160
III - Discussion.....	p. 161
1 - Structure et répartition des lamelles annelées et des inclusions intra-nucléaires.....	p. 161
2 - Processus de formation.....	p. 162
3 - Signification physiologique des lamelles annelées et des inclusions intra-nucléaires...	p. 163
Conclusion.....	p. 164

CHAPITRE XIII - LE RETICULUM ET LES LAMELLES ANNELEES CYTOPLASMIQUES

	p. 166
I - <u>Nereis diversicolor</u>	p. 166
1 - Evolution ovocytaire " <u>in vivo</u> " à la température de 10 - 15 ° C.....	p. 166
2 - Evolution ovocytaire " <u>in vitro</u> " à la température de 20° C.....	p. 167
3 - Evolution ovocytaire " <u>in vitro</u> " en culture organotypique.....	p. 168

- Observations morphologiques.....	p. 168
- Digestions enzymatiques.....	p. 169
II - <u>Nereis pelagica</u>	p. 169
III - Discussion.....	p. 170
1 - Répartition et structure des lamelles annelées cytoplasmiques.....	p. 170
2 - Origine des lamelles annelées cytoplasmiques..	p. 172
3 - Signification physiologique de l'accroissement du réticulum et de l'existence des lamelles annelées cytoplasmiques.....	p. 175
Conclusion.....	p. 177

CHAPITRE XIV - L'APPAREIL DE GOLGI ET LES INCLUSIONS CYTOPLAS-

<u>MIQUES</u>	p. 178
I - L'appareil de Golgi.....	p. 178
II - Les lobules de vitellus protéique	p. 179
1 - <u>N. diversicolor</u>	p. 179
2 - <u>N. pelagica</u>	p. 179
III - Lipides et glycogène.....	p. 179
1 - Lipides.....	p. 179
2 - Glycogène.....	p. 180
IV - Les formations corticales.....	p. 180
1 - <u>N. pelagica</u>	p. 180
2 - <u>N. diversicolor</u>	p. 181
V - Les formations lysosomiales.....	p. 181
VI - L'enveloppe ovocytaire.....	p. 182
VII - Discussion.....	p. 182
1 - Evolution de l'appareil de Golgi.....	p. 182
2 - Le vitellus.....	p. 183
3 - Les formations lysosomiales.....	p. 184
Conclusion.....	p. 185

CHAPITRE XV - INFLUENCE DE L'HORMONE CEREBRALE SUR LES SYNTHESSES

<u>D'ADN AU COURS DE LA GAMETOGENESE</u>	p. 187
I - Spermatogenèse.....	p. 188
A - Evolution " <u>in vitro</u> ".....	p. 188
1 - Matériel et techniques.....	p. 188
2 - Evolution des spermatoctes en l'absence d'hormone (parapodes isolés).....	p. 188

3 - Evolution des spermatocytes en présence d'hormone (associations parapode-prostomiums..	p. 189
4 - Incidence de la réintroduction du facteur hormonal sur le déroulement de la sperma- togenèse.....	p. 190
5 - Action de l'actinomycine D.....	p. 191
B - Evolution " <u>in vivo</u> " en l'absence d'hormone - Comparaison avec la spermatogenèse naturelle.....	p. 192
1 - Evolution " <u>in vivo</u> ".....	p. 192
2 - Spermatogenèse naturelle.....	p. 193
II - Ovogenèse.....	p. 194
1 - Matériel et techniques.....	p. 194
2 - Résultats.....	p. 194
III - Discussion.....	p. 195
Conclusion.....	p. 198

CHAPITRE XVI - INFLUENCE DE LA LEVEE DE L'INHIBITION HORMONALE

<u>SUR L'EVOLUTION ELEOCYTAIRE.....</u>	p. 199
I - Observations au microscope photonique.....	p. 199
II - Observations au microscope électronique.....	p. 200
III - Discussion.....	p. 201
1 - Les modalités d'accumulation du glycogène.....	p. 201
2 - Evolution des éléocytes en condition anhormonale.....	p. 203
Conclusion.....	p. 203

CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE.....

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....

I - Evolution cytologique et fonctionnelle du cytoplasme ovocytaire.....	p. 208
II - Evolution nucléaire.....	p. 213

AVANT-PROPOS

Je suis particulièrement heureux de pouvoir remercier en premier lieu Monsieur le Professeur M. DURCHON, Directeur du Laboratoire de Biologie Animale de la Faculté des Sciences. Après m'avoir proposé le sujet de ce travail, il n'a cessé de me prodiguer ses conseils durant la réalisation de cet ouvrage. Sa haute compétence scientifique, son enthousiasme pour les techniques les plus modernes de la biologie, ont été pour moi le plus précieux des stimulants au cours de ces recherches. Qu'il veuille bien trouver dans ce mémoire l'expression de ma respectueuse gratitude et de mon profond et sincère attachement.

Toute ma reconnaissance va également à Monsieur le Professeur R. DEFRETIN, Doyen de la Faculté des Sciences. Après m'avoir accueilli dans ce laboratoire, il a guidé mes débuts de chercheur dans le domaine de la cytologie. Pour la formation reçue auprès de lui et pour l'excellent accueil qu'il m'a toujours réservé, en particulier lors de mes séjours au Laboratoire de Biologie Maritime et Régionale de Wimereux, je le prie d'accepter le témoignage de ma profonde et très vive gratitude.

Il m'est agréable d'adresser également mes remerciements à Monsieur le Professeur E. VIVIER pour les facilités de travail qu'il m'a accordées dans le domaine de la microscopie électronique et pour l'intérêt qu'il a porté à cette oeuvre en acceptant de faire partie de mon jury de thèse. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Monsieur R. FOLLLOT, Professeur à la Faculté des Sciences de Rennes, m'a fait le grand honneur de s'intéresser à mes recherches et de participer à mon jury de thèse. Je le prie d'accepter l'expression de ma vive gratitude.

Monsieur le Professeur B. DROZ, Directeur du Laboratoire de Biologie au C.E.A. a eu l'amabilité de m'initier à la technique de l'autoradiographie à haute résolution. Je suis heureux de lui adresser mes vifs remerciements.

Madame MEUNIER, technicienne, Messieurs LAZARECKI et BOUCHEQUET, photographes, Mesdames DESCAMPS, DERACHE et BONET, secrétaires, Monsieur HIMPENS, dessinateur au C.N.R.S., m'ont apporté, avec beaucoup de gentillesse, une aide particulièrement efficace dans la préparation matérielle de ce travail. Je tiens à leur exprimer mon amicale reconnaissance.

INTRODUCTION

L'action des sécrétions endocrines sur les processus gamétogénétiques a été démontrée, en dehors des Arthropodes, dans plusieurs classes d'Invertébrés: Mollusques Gastéropodes (PELLUET, 1964 ; STREIFF, 1967 ; CHOQUET, 1969), Céphalopodes (WELLS et WELLS, 1959 ; DURCHON et RICHARD, 1967), Lamelibranches (MAGABHUSHANAM, 1964 ; LUBET, 1965) ; Némertes (BIERNE, 1964) ; Alvéolides Oligochètes (HERLANT-MEEWIS, 1959 ; SAUSSEY, 1966), Hirudinées (HAGADORN, 1962, 1969 ; MALECHA, 1970), Polychètes Arenicolidae (HOWIE, 1963) et Syllinae (HAUENSCHILD, 1959 ; DURCHON, 1959 ; DURCHON et WISSOCQ, 1964).

Chez les Néréidiens, les recherches relatives au contrôle hormonal de la sexualité ont permis de mettre en évidence l'existence d'une hormone inhibitrice, d'origine cérébrale (DURCHON, 1952). Chez les espèces présentant naturellement une épitoque, ce facteur inhibe dans les deux sexes les transformations morphologiques et anatomiques en Heteronereis ; sa suppression expérimentale provoque une épitoque prématurée chez P. cultrifera (DURCHON, 1948, 1952, 1956), N. irrorata (DURCHON, 1952), P. marionii (DURCHON, 1952), N. pelagica (CHOQUET, 1962), Pl. dumerilii (HAUENSCHILD, 1963) et N. succinea (MALECHA, 1967)

Chez tous les Néréidiens de sexe mâle, l'ablation du cerveau déclenche les divisions spermatocytaires et aboutit rapidement à la libération des spermatozoïdes (DURCHON, 1962). Elle détermine également, quel que soit le sexe, l'évolution accélérée des parasites vivants dans le coelome ; Grégarines (Diplauxis hattii de P. cultrifera ; DURCHON et VIVIER, 1961, 1964), Coccidies (Coelotropha durchoni de N. diversicolor ; PORCHET-HENNERE, 1968).

Chez les femelles par contre, l'évolution des cellules germinales en l'absence du facteur inhibiteur est plus nuancée et varie selon les espèces. HAUENSCHILD (1956) le premier constate, que les ovocytes de Pl. dumerilii subissent une croissance accélérée après ablation du prostomium. Il note toutefois dans ce cas une distribution anormale des lobules vitellins. Chez N. diversicolor, CLARK et RUSTON (1963) mentionnent que les ovocytes des vers décérébrés présentent une rapide augmentation de taille puis dégèrent. Par contre CHOQUET (1962) note, qu'en condition anormale, les ovocytes de N. pelagica, après une croissance accélérée, acquièrent une morphologie analogue aux gamètes ayant subi une ovogénèse normale.

Ces résultats reposent cependant uniquement sur des données biométriques et l'examen "in toto" des ovocytes en expérimentation. Nous nous sommes

proposé d'aborder, sous l'angle cytologique, l'étude des processus de la gamétogenèse en condition anormale, dans le but d'arriver à préciser, si possible, le mode de contrôle de l'hormone cérébrale sur l'évolution cellulaire.

Nos investigations ont porté sur 3 espèces de Néréidiens :

- deux espèces se reproduisant sous la forme hétéronéridienne, à savoir Nereis pelagica L. et Perinereis cultrifera Grube. Ces deux Annélides ont une durée de vie respective de deux et trois ans (HERPIN, 1925).

- une espèce dépourvue d'épitoque : Nereis diversicolor O.F. Müller dont le cycle est de deux ans (DALES, 1950).

Auparavant, cependant, un examen approfondi du déroulement normal des processus de la gamétogenèse s'imposait. En effet, si les cellules coelomiques des Annélides Polychètes ont fait l'objet d'études détaillées en microscopie photonique (ROMIEU, 1923 ; DEHORNE et DEFRETIN, 1933) et si les oeufs des Néréidiens ont constitué un matériel de choix pour l'analyse des processus de fécondation (LILLIE, 1911 ; COSTELLO, 1949), par contre les recherches portant sur le développement des cellules germinales sont peu nombreuses (DEHORNE, 1911 et FAURE-FREMIET, 1924, chez Sabellaria ; NORDBACK, 1956, chez Hydroïdes). A notre connaissance aucun travail n'avait été effectué sur la gamétogenèse des Néréidiens ; les remarquables travaux d'HERPIN (1925) ayant été orientés, chez divers Polychètes, sur le comportement sexuel et l'aspect biologique de la reproduction.

Notre travail sera donc divisé en deux parties :

- La première portera sur l'évolution cytologique, métabolique et ultrastructurale des ovocytes dans les conditions naturelles. Le rôle des éléocytes dans l'édification des réserves de l'ovocyte sera envisagé à ce propos. A la suite d'études effectuées au microscope photonique, divers auteurs (CLAPAREDE, 1968 ; KÜKENTHAL, 1885 ; MC INTOSH, 1907 ; ROMIEU, 1923) avaient envisagé la possibilité d'un transfert vers les ovocytes des réserves nutritives élaborées par les éléocytes. Ce problème a fait l'objet d'une réinvestigation à l'échelle de la microscopie électronique.

- La deuxième partie sera consacrée tout d'abord aux particularités cytologiques présentées par les ovocytes ayant subi une évolution accélérée en l'absence d'hormone, de façon à préciser le rôle respectif des organites cytoplasmiques dans les processus de la croissance.

Le mode de contrôle de l'hormone cérébrale nous a conduit d'autre part à envisager le métabolisme nucléaire. Dans ce but, nous avons été amené à considérer, en particulier au niveau des cellules germinales mâles, l'incidence de la suppression du facteur inhibiteur sur le déroulement des synthèses d'ADN, corrélatives des divisions de maturation de la spermatogenèse.

MATERIEL ET TECHNIQUES

Les Nereis pelagica L. ont été récoltées dans les crampons de Laminaires près du Laboratoire de Biologie Marine de Wimereux (Pas-de-Calais). Les Nereis diversicolor O.F. Müller proviennent des facies saumâtres de l'estuaire de la Slack et du petit port de Boulogne. Les Perinereis cultrifera Grube ont été recueillies à la Station Biologique de Luc-sur-Mer (Calvados).

I - TECHNIQUES DE MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Les échantillons récoltés sont fixés selon les cas au Carnoy, au Bouin-Hollande, au Helly ou au formol à 10 %. Ils sont inclus à la paraffine et coupés à 6 μ . Les colorations histologiques et histochimiques citées dans le texte ont été réalisées selon ^{les} indications de LISON (1960) et de GABE (1968).

II - TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

A - TECHNIQUES D'OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES

Après anesthésie des vers par le MS 222 (Laboratoire Sandoz) dilué à 1/1000 dans l'eau de mer, les parapodes contenant les ovocytes sont disséqués et immergés dans le fixateur à la température de 4°C.

Deux types de fixateurs ont été utilisés :

- Tétroxyde d'Osmium à 2 % tamponné par le tampon phosphate (pH 7,2) à une molarité de 0,2 M.

- Glutaraldéhyde à 3 ou 5 % dans le tampon phosphate (0,2 M) suivi d'une fixation osmiée.

L'inclusion a été effectuée dans l'épon. Les coupes sont contrastées par l'acétate d'uranyle en solution alcoolique pendant une minute, puis par le citrate de plomb selon Reynolds (1963).

B - TECHNIQUES DE CYTOCHIMIE ULTRASTRUCTURALE

1 - Méthode de détection des polysaccharides et glycoprotéines.

Coloration par l'acide phosphotungstique (RAMBOURG, 1967).

Les ovocytes, fixés uniquement par la glutaraldéhyde sont inclus dans le glycol-méthacrylate (LEDUC et BERNHARD, 1967). Les coupes sont colorées pendant deux minutes par flottage sur une solution d'acide chromique à 10 % et rincées rapidement à l'eau distillée.

Coloration par la thiocarbohydrazide-protéinate d'argent.

(Technique de SELIGMAN modifiée par THIERY, 1967)

Après oxydation préalable par l'acide periodique à 1%, les coupes subissent un flottage de 2 à 48 heures sur la thiocarbohydrazide à 0,2%, puis après un rinçage soigneux à l'eau acétique, elles sont transférées sur le protéinate d'argent à 1% pendant une demi-heure.

2 - Techniques de coloration des acides nucléiques. (PALEKAR et BERNHARD, 1968 ; BERNHARD, 1969).

Les coupes ultrafines d'ovocytes fixés uniquement à la glutaraldéhyde sont transférées après flottage sur l'acétate d'uranyle aqueux à 5%, sur une solution de tampon Mc Ilvaine puis colorées très rapidement par le citrate de sodium. Toutes les structures ribonucléoprotéiniques du cytoplasme et du noyau sont ainsi fortement contrastées, la chromatine par contre est presque incolore.

3 - Techniques de digestions enzymatiques.

Le matériel fixé uniquement par la glutaraldéhyde est inclus dans le glycol-méthacrylate (LEDUC et BERNHARD, 1967). Les digestions enzymatiques ont été effectuées à 37°C par flottage des coupes ultrafines sur des solutions de pepsine à 0,2% dans HCL (0,1 M) ou de ribonucléase à 0,15 % dans l'eau distillée (pH : 6,8). Les coupes témoins subissent un flottage sur de l'eau distillée amenée à un pH analogue à celui des solutions utilisées.

Nous avons également effectué des digestions sur coupes d'épon selon la technique de MONNERON et BERNHARD (1966). Dans ce cas, les coupes subissent une oxydation préalable sur l'acide periodique avant d'être mises en contact avec la solution enzymatique.

4 - Techniques de détection d'activités enzymatiques.

Les ovocytes et éléocytes obtenus par ponctionnement coelomique sont fixés pendant vingt minutes par la glutaraldéhyde tamponnée au cacodylate de sodium.

Les pièces destinées à la recherche de l'activité phosphatasique sont incubées à 37°C dans le milieu de GOMORI, modifié selon MILLER et PALADE (1964) et contenant du β glycérophosphate de sodium (Merck). Celles destinées à la recherche d'activité de nucléotidases ont été incubées dans le milieu de WACHSTEIN et MEISEL (1957) en présence d'adénosine triphosphate (ATP, SIGMA grade).

Après incubation, les pièces sont lavées rapidement dans les solutions de tampon, puis subissent une post-fixation osmiée.

III - TECHNIQUES AUTORADIOGRAPHIQUES

1 - Microscopie photonique

Après incorporation du précurseur tritié, les pièces sont fixées au Carnoy ou au formol à 10 %. Après déparaffinage, les coupes sont immergées dans une solution d'acide perchlorique à 1 % (4°C) afin d'éliminer les molécules de précurseur non incorporées et les petits nucléotides.

Les lames sont alors recouvertes selon les séries, de l'émulsion Gel Ilford K 5 ou L 4 selon la technique de FICQ (1961). Après exposition, les autoradiogrammes sont révélés au D 19 b KODAK et colorés par le rouge solide-picro-indigo-carmin.

2 - Microscopie électronique

a) Mode de fixation

La validité des études autoradiographiques concernant les synthèses de protéines et d'acides nucléiques repose sur le fait que les précurseurs radioactifs sont incorporés dans les macromolécules et que les précurseurs libres sont éliminés par les processus usuels de fixation (glutaraldéhyde - osmium).

Différents auteurs dont PETERS et ASHLEY (1967), BERGERON et DROZ (1968), ont attiré l'attention sur les artéfacts assez considérables entraînés par ce processus de fixation dans les études d'incorporation de leucine ^3H . Cette radioactivité parasite est due à une rétention par la glutaraldéhyde des acides aminés précurseurs.

Ces auteurs proposent de substituer à cette dernière la formaldéhyde fraîchement préparée à partir de la paraformaldéhyde (1 % dans le tampon phosphate 0,2 M) ; dans ce cas, la rétention des acides aminés libres est fortement atténuée. Nous avons utilisé ce mode de fixation pour les faibles durées d'incorporation au cours desquelles le taux de radioactivité de la fraction acido-soluble est particulièrement important.

Une rétention analogue a été observée en ce qui concerne l'uridine ^3H . MONNERON et MOULE (1969) considèrent qu'un lavage soigneux permet d'éliminer la majorité des molécules de précurseur non incorporées. Dans nos séries d'autoradiographies nous avons procédé dans ce but au renouvellement, à plusieurs reprises, du liquide de lavage, et la fixation par l'osmium n'a été effectuée que 24 heures après celle par les aldéhydes.

b) Processus autoradiographique

Après inclusion dans l'épon, les ultracupes sont déposées sur une lame porte-objet préalablement recouverte d'une membrane de celloïdine (GRANBOULAN, 1965). Les coupes sont ensuite contrastées à l'acétate d'uranyle et carbonées (SALPETER et BACHMANN, 1965). Les autoradiographies ont été réalisées en trempant les lames dans l'émulsion ILFORD L 4 diluée au 1/5 dans l'eau bidistillée. Les temps d'exposition sont de 2 et 3 mois. Les autoradiographies ont été développées pendant 4 minutes dans le Microdol X à 18°C et fixées dans le thiosulfate à 30 %. Les membranes de celloïdine portant les autoradiographies sont ensuite décollées des lames porte-objet, transférées sur grilles et amincies par dissolution dans l'acétate d'isoamyle pendant 2 minutes (DROZ, 1967).

IV - TECHNIQUES DE CULTURE ORGANOTYPIQUE

Les vers sont tout d'abord isolés en eau de mer stérile additionnée de pénicilline et de streptomycine pendant 3 à 4 jours. Les parapodes explantés sont cultivés en saignée à la température de 20°C. Le milieu de culture gélosé est celui mis au point par DURCHON et SCHALLER (1963).

Dans le cas d'explants destinés à une étude autoradiographique, le précurseur radioactif est ajouté au milieu de culture à la dose de 2 μ C par ml.

PREMIERE PARTIE

OVOGENESE NATURELLE

CHAPITRE I

CROISSANCE OVOCYTAIRE ET STADES CYTOLOGIQUES

D'intéressantes données concernant le cycle biologique de N. pelagica et P. cultrifera, espèces se reproduisant sous la forme hétéronéridienne, sont rassemblées dans l'important travail d'HERPIN (1925) portant sur la reproduction et le développement des Annélides Polychètes vivant sur les côtes du Cotentin.

Plus récemment, la courbe de croissance ovocytaire de deux espèces de Néridiens dépourvues d'épitoque a été établie par BRAFIELD et CHAPMAN (1967) en ce qui concerne N. virens et par DALES (1950) et CLARK et RUSTON (1963) chez N. diversicolor.

Nous envisagerons tout d'abord dans ce chapitre l'évolution du diamètre ovocytaire en fonction de l'âge des individus. Ce critère morphologique a été retenu pour plusieurs raisons :

- Il fournit une indication rapide de l'état génital d'un individu à la suite d'une ponction coelomique.

- Les valeurs numériques obtenues permettent une analyse statistique de la croissance.

- L'évolution du diamètre ovocytaire enfin est corrélative de l'évolution cytologique, comme nous le verrons dans la deuxième partie de ce chapitre.

I - COURBES DE CROISSANCE OVOCYTAIRE

Les ovocytes des différents individus recueillis au hasard lors des récoltes mensuelles sont prélevés par ponction intra-coelomique et le diamètre en est mesuré à l'aide d'une chambre claire ou d'un micromètre oculaire. La moyenne du diamètre ovocytaire est établie pour chaque individu après examen d'une dizaine d'ovocytes. Les résultats portant sur l'ensemble des individus d'une récolte donnée sont répartis en une courbe de dispersion, unimodale ou bimodale selon les cas. La valeur des moyennes des

histogrammes de fréquence a servi à l'établissement des courbes traduisant l'évolution ovocytaire en fonction du temps.

A - NEREIS PELAGICA (Fig. I)

L'étude d'une population naturelle de N. pelagica montre que les ovocytes deviennent matures en un peu moins d'une année. Après une période de quiescence relative pendant les mois d'été, ils manifestent une augmentation considérable de taille entre les mois de Novembre et de Février (le diamètre ovocytaire double durant cette période). D'autre part, pour un individu donné, les variations de la taille des ovocytes sont beaucoup plus considérables chez les animaux jeunes, que chez ceux proches de la maturité sexuelle.

Il est intéressant de noter que la courbe de croissance ovocytaire de N. pelagica est très proche de celle établie par BRAFIELD et CHAPMAN (1967) chez N. virens, espèce ne présentant pas d'épitoque et dont la période de reproduction se situe en Mai.

B - PERINEREIS CULTRIFERA

Cette étude, menée en collaboration avec PORCHET (1966) s'adresse à une espèce dont le cycle de vie est de 3 ans.

1 - Courbe de croissance ovocytaire (Fig. II)

Les animaux éclos en Juin-Juillet présentent à la fin de la première année un diamètre ovocytaire moyen de 50 à 60 μ . Durant la deuxième année, la croissance ovocytaire est très faible jusqu'à l'automne. A partir d'Octobre, la courbe présente une ascension rapide jusqu'aux mois de Février-Mars de la 3ème année.

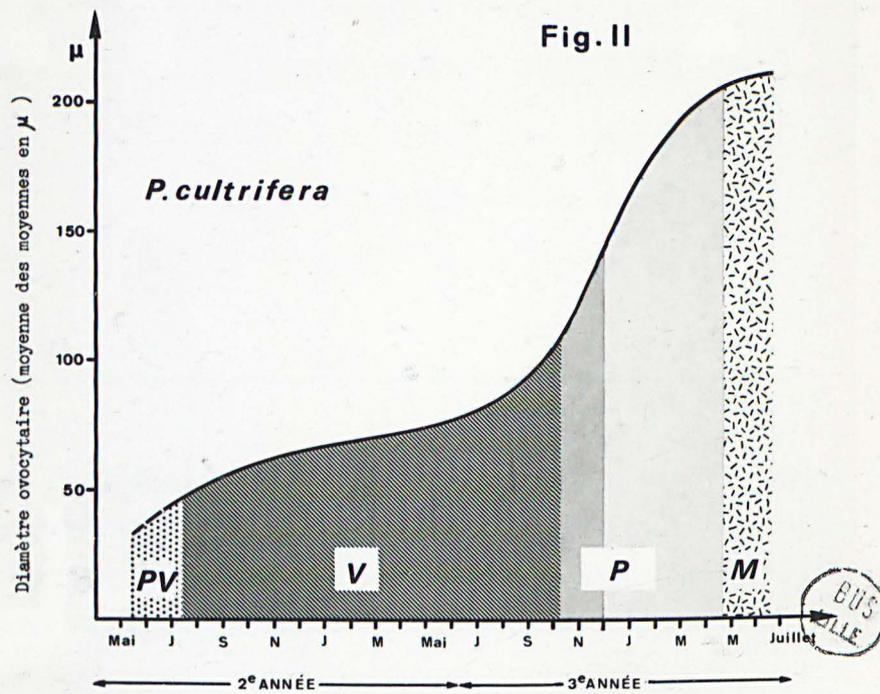
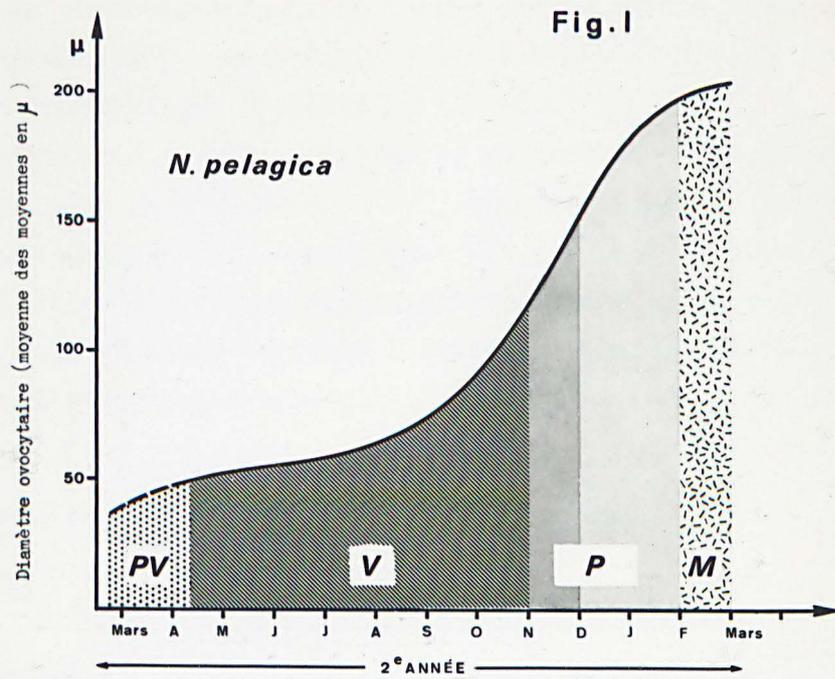
Comme dans le cas de N. pelagica, le diamètre ovocytaire double durant les mois d'hiver. Les ovocytes matures atteignent une taille variant entre 210 et 250 μ , la période de ponte s'échelonne depuis la fin Mai à la mi-Juillet (HERPIN, 1925).

Les planches hors-texte sont numérotées en chiffres arabes. Les figures insérées dans le texte sont numérotées en chiffres romains.

Fig. I - Evolution cytologique des ovocytes de N. pelagica en fonction de leur courbe de croissance (cycle de vie de N. pelagica : 2 ans).

Fig. II - Evolution cytologique des ovocytes de P. cultrifera en fonction de leur courbe de croissance (cycle de vie de P. cultrifera : 3 ans).





-  PV : Prévitellogénèse
-  V : Vitellogénèse protéique
-  P : Polysaccharides neutres
-  P : Mucopolysaccharides acides
-  M : Maturation

BUS
ELLE

2 - Evolution du rapport nucléoplasmique (Fig. III)

Les variations du rapport nucléoplasmique (N/P) sont considérées comme caractéristiques de l'état physiologique d'une cellule. Il nous a semblé intéressant d'en connaître les valeurs et d'en déterminer les fluctuations en fonction des périodes de l'année.

Les résultats obtenus (Tableau 1) montrent que les ovocytes de 1 et 2 ans ont toujours le même rapport N/P. Ces deux types d'ovocytes évoluent par conséquent de manière très comparable. Les produits génitaux de 3 ans présentent de Août à Mars des rapports inférieurs à ceux enregistrés chez les individus de 2 ans. Pour ces cellules l'accroissement cytoplasmique domine nettement la croissance nucléaire.

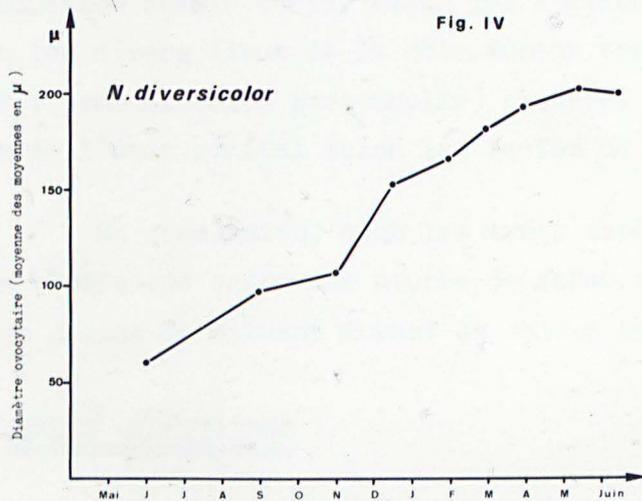
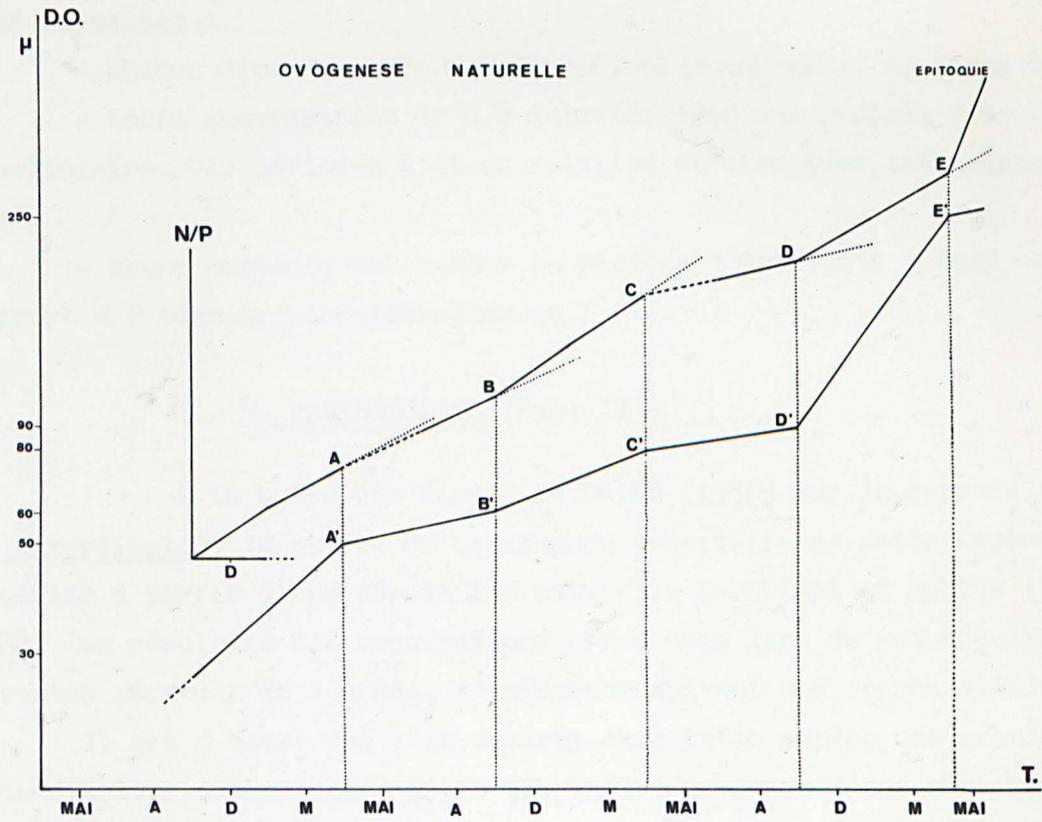
Tableau 1 - Variations du rapport N/P en fonction des saisons.

Age de l'animal	1ère année	2ème année	3ème année
Août Septembre	-	0,54	0,226
Décembre	0,638	0,638	0,459
Mars	0,586	0,586	0,478
Mai Juin (Epitoque)	-	?	2,45

Par contre, lors de l'épitoque, quand la croissance cytoplasmique est achevée, nous constatons une reprise importante de l'activité nucléaire ; le rapport N/P se trouve quintuplé en l'espace de 2 mois. La maturation ovocytaire semble donc résulter de deux processus successifs : d'abord un accroissement cytoplasmique, puis un accroissement nucléaire.

La figure III établie en coordonnées semi-logarithmiques retrace à la fois l'évolution de la croissance ovocytaire totale et celle du rapport nucléo-cytoplasmique (N/P). La courbe d'accroissement du diamètre ovocytaire en fonction du temps montre que la croissance est discontinue. Elle présente

Fig. III



(d'après Clark et Ruston, 1963)



Fig. III - P. cultrifera. Comparaison entre la croissance ovocytaire totale (A' E') et le rapport nucléoplasmique N/P (d'après PORCHET, 1969).

L'échelle des temps (T) est la même pour les deux courbes. Les périodes de "repos" sont superposables : A' B' et AB ainsi que C' D' et CD pour la saison chaude. Il en est de même pour les périodes d'activité : B' C' et BC ainsi que D' E' et DE pendant la saison froide (Automne et hiver).

D.O. : diamètre ovocytaire (en valeurs logarithmiques)

A : Août - D : Décembre - M : Mars.

Fig. IV - Courbe de croissance des ovocytes de N. diversicolor (d'après CLARK et RUSTON, 1963).



des phases de repos relatif (printemps-été) alternant avec des phases d'activité (automne, hiver). D'autre part, la superposition des courbes de la croissance ovocytaire totale et du rapport N/P permet de déduire les constatations suivantes :

- chaque diminution de N/P correspond à une phase de repos relatif.
- toute augmentation de N/P coïncide avec une période d'accroissement cellulaire. Ces périodes sont en relation étroite avec les saisons froides.
- cette harmonie est rompue en période d'épitoque ; dans ce cas le rapport N/P augmente considérablement.

C - N. DIVERSICOLOR (Fig. IV)

A la suite des études de DALES (1950) sur la reproduction de N. diversicolor, la courbe de croissance ovocytaire de cette espèce a été établie à partir d'une population naturelle par CLARK et RUSTON (1963, Fig. IV). Les résultats des mensurations effectuées lors de nos récoltes, à différentes périodes de l'année, s'intègrent suivant une courbe similaire.

Il est à noter que l'on observe chez cette espèce une grande variation du diamètre des ovocytes selon les individus issus d'une même récolte. Ce décalage dans l'évolution germinale est dû en particulier à la longue période pendant laquelle s'échelonne la ponte (Février à Avril-Mai) ; les individus examinés sont à des stades très différents de leur maturité sexuelle. D'autre part, à Cherbourg, HERPIN (1925) note que la période de reproduction semble varier selon les stations et pourrait s'échelonner, selon les divers lieux de la côte, durant toute l'année. De même GLAÇON (1962 ; communication personnelle) observe, dans le Boulonnais, des variations de l'état génital selon les faciès de récolte.

En conclusion, dans les trois espèces étudiées la croissance ovocytaire s'effectue selon une courbe de forme sigmoïde ; la période d'accroissement rapide se situant durant la saison hivernale.

II - STADES OVOCYTAIRES

Ces stades ont été déterminés d'après les caractéristiques cytologiques les plus marquantes des différentes phases de l'évolution ovocytaire : apparition du vitellus protéique, élaboration des polysaccharides.

A - N. PELAGICA ET P. CULTRIFERA

Ces deux espèces peuvent être étudiées conjointement par suite de leur évolution ovocytaire comparable. Cette dernière peut, dans ses grandes lignes, se subdiviser en 4 stades principaux :

1 - Stade I : prévitellogenèse

L'origine des cellules germinales est mal connue chez les Néréidiens. Dès le stade ovogonie, ces cellules évoluent librement dans le liquide coelomique. Elles sont alors associées en des massifs groupant de dix à vingt éléments parmi lesquels on distingue à la fois des ovogonies et des ovocytes en prophase de méiose.

- Les ovogonies, d'un diamètre de 10 μ environ, possèdent un noyau volumineux et un cytoplasme basophile restreint. Les figures de divisions goniales y sont fréquentes (Pl. 1, fig. c).

- Les ovocytes en prophase de méiose (Pl. 1, fig. a et b)

La dernière division goniale est suivie d'une période de repos. Après cette interphase durant laquelle s'effectuent les synthèses d'ADN ovocytaire, se déroulent les stades de la prophase de méiose. Le stade diplotène est suivi d'une diminution de la coloration de la chromatine après réaction de Feulgen. Cette dernière devient complètement négative au début du stade dictyotène. Le cytoplasme présente alors un accroissement très net par rapport au volume nucléaire ; la phase de grand accroissement ovocytaire commence.

2 - Stade II : l'élaboration du vitellus protéique

Chez N. pelagica, ce stade correspond aux ovocytes d'un diamètre compris entre 40 et 90 μ ; Chez P. cultrifera, il s'étend depuis 40 μ environ jusque 130 μ . Durant cette période, le cytoplasme, très basophile, est fortement coloré par la pyronine (coloration de Brachet) et par le bleu de toluidine à pH 4,6. La digestion par l'ARNase confirme l'abondance des ribonucléoprotéines.

Les lobules vitellins sont mis en évidence par les réactions signalétiques des protides (Ninhydrine-Schiff ; Millon ; bleu de bromophénol). Les lipides, colorés par le noir Soudan et le sulfate de bleu de Nil

apparaissent très tôt chez N. pelagica ; par contre chez P. cultrifera, ils ne représentent une proportion notable des inclusions cytoplasmiques que lorsque l'ovocyte atteint un diamètre de 60 μ (Pl. 1, fig. e). Durant cette période, une intense activité nucléolaire se manifeste et les émissions de matériel nucléaire vers le cytoplasme sont extrêmement abondantes.

3 - Stade III : l'élaboration des polysaccharides

Ce processus se déroule en deux étapes.

1 - Apparition d'un matériel PAS positif, résistant à l'action de l'amylase salivaire. Ce matériel, disséminé entre les lobules vitellins et lipidiques présente une intense métachromasie par le bleu de toluidine à pH 4,6 et 2,2 mais il n'est pas coloré par le bleu alcian. Sa présence se situe entre 100 et 150 μ pour les ovocytes de N. pelagica et entre 130 et 180 μ pour ceux de P. cultrifera (Pl. 1, fig. f).

2 - Formation de mucopolysaccharides à caractère acide (Pl. 1, fig. g et h). Leur étude histochimique détaillée sera abordée dans le chapitre VII.

4 - Stade IV : la maturation ovocytaire (ovocyte d'un diamètre supérieur à 200 μ)

Ce stade correspond aux modifications morphologiques les plus marquantes de l'épitoque : développement des lamelles parapodiales et apparition des soies hétéronéréidiennes.

Le cytoplasme présente une répartition caractéristique de ses éléments (Pl. 1, fig. i). On distingue en allant du noyau vers le cortex :

- une auréole basophile périnucléaire, riche en ARN ; (la colorabilité par la pyronine et le bleu de toluidine disparaît après action de l'ARNase). Cette zone se colore également par le vert solide selon la technique d'ALFERT et GESSCHWIND après hydrolyse acide des acides nucléiques. Elle semble donc renfermer des protéines basiques liées aux ARN.

- des lobules lipidiques. Ils sont peu nombreux mais très volumineux dans les ovocytes de N. pelagica par suite de la fusion des éléments lipidiques disséminés dans le cytoplasme aux stades antérieurs.

- les lobules de vitellus protéiques

- les mucopolysaccharides, condensés en une couche corticale d'environ 15 à 20 μ d'épaisseur. La double coloration PAS - Bleu Alcian selon

VIALLI révèle que les polysaccharides les plus internes sont uniquement réactifs au PAS et ne présentent pas de réaction alcianophile.

5 - Relation entre les stades cytologiques et les courbes de croissance ovocytaire (Fig. I et II).

Les processus de vitellogenèse (St. II) s'effectuent en majeure partie durant la période de croissance peu accentuée des ovocytes. Pour N. pelagica, ce stade correspond aux mois d'été et d'automne. Il est très long chez P. cultrifera puisqu'il s'échelonne du mois de Mars de la première année au mois de Septembre de l'année suivante.

L'élaboration des polysaccharides (St. III) s'effectue dans les deux espèces durant les mois d'hiver. Elle correspond à la période de croissance rapide pendant laquelle les ovocytes doublent de volume ; à ce moment les ovocytes acquièrent une coloration bleu-verdâtre caractéristique.

La ségrégation des éléments cytoplasmiques (St. IV) correspond au dernier palier de la courbe. A ce moment, le diamètre ovocytaire n'augmente plus que très légèrement ; seul le noyau subit un dernier accroissement de volume (Fig. I et II).

B - NEREIS DIVERSICOLOR

L'évolution ovocytaire de N. diversicolor ne présente pas de stades aussi diversifiés et caractéristiques que chez N. pelagica et P. cultrifera.

Après un stade de prévitellogenèse analogue au stade I des deux espèces précédentes, débute une très longue période d'accroissement (Stade II). Le cytoplasme très basophile renferme de nombreux lobules lipidiques et vitellins. L'étude histochimique de ces derniers sera abordée dans le chapitre de la vitellogenèse (Chapitre VI). A partir d'un diamètre ovocytaire de 150 à 170 μ (Stade III), des formations de glycogène apparaissent dans le cytoplasme. On note également à ce moment, l'élaboration de granules métachromatiques colorés par le bleu Alcian. Toutefois ces formations corticales sont relativement peu développées et restent localisées à proximité de l'enveloppe ovocytaire.

Lors de la maturation, aucun remaniement cytoplasmique n'intervient ; l'ovocyte conserve une morphologie analogue à celle du stade précédent.

* Pl. 1, fig. d.

En résumé, l'évolution ovocytaire de N. diversicolor est caractérisée par son homogénéité, un développement restreint des formations mucopolysaccharidiques et l'absence de remaniements cytoplasmiques importants à l'approche de la maturation.

CONCLUSION

- L'étude a porté sur trois Néréidiens :
 - . N. pelagica et P. cultrifera, espèces se reproduisant sous une forme épitoque et dont le cycle de vie est respectivement de deux et trois ans.
 - . N. diversicolor, espèce dont la reproduction, qui survient au bout de deux ans, ne s'accompagne pas des modifications morphologiques de l'épitoque.
 - La croissance du diamètre ovocytaire s'effectue selon une courbe sigmoïde.
 - Chez N. pelagica et P. cultrifera, l'évolution cytologique peut être subdivisée en 4 stades : prévitellogénèse, élaboration du vitellus protéique, élaboration des polysaccharides, maturation. Ce dernier stade est caractérisé par une ségrégation des constituants cytoplasmiques en quatre zones : auréole périnucléaire basophile, lobules lipidiques, vitellus protéiques, couche corticale de mucopolysaccharides.
- Les processus de vitellogénèse s'effectuent durant la période de croissance ralentie des ovocytes. L'élaboration des mucopolysaccharides survient dans les mois d'hiver, elle correspond à la période la plus rapide de la croissance ovocytaire.
- Chez N. diversicolor, l'évolution ovocytaire est caractérisée par son homogénéité, un développement restreint des formations mucopolysaccharidiques et l'absence de remaniements cytoplasmiques importants à l'approche de la maturation.

CHAPITRE II

ETUDE DU METABOLISME OVOCYTAIRE

INTRODUCTION

Ce problème a été abordé par la technique autoradiographique, méthode cytochimique permettant, selon la définition de FICQ (1961), de localiser au sein des tissus et des cellules les radioéléments introduits sous forme de molécules radioactives. Cette technique, par l'incorporation de précurseurs spécifiques, permet à la fois de préciser le site et la vitesse des synthèses de molécules complexes (ADN, ARN, protéines) et de suivre la migration éventuelle de ces composés à l'intérieur de la cellule.

Dans notre étude du métabolisme ovocytaire, nous avons abordé l'étude de trois types de synthèses : ARN, protéines, ADN. Les résultats concernant les synthèses d'ADN seront envisagés dans le chapitre III, consacré au noyau.

En ce qui concerne les synthèses d'ARN et de protéines, nous nous sommes attachés plus particulièrement à une étude cinétique de l'incorporation des précurseurs radioactifs, de façon à comparer, pour un stade cytologique donné, l'importance et le déroulement des processus métaboliques. L'expérimentation a porté essentiellement sur des femelles de N. diversicolor d'un diamètre compris entre 80 et 120 μ .

L'uridine tritiée (Uridine ^3H -5, 20 Ci/mM), injectée à la dose de 20 μ Ci par gramme de poids frais, a été utilisée comme précurseur des synthèses d'ARN. Le développement considérable du nucléole laissait en effet présager l'importance du métabolisme des ribonucléoprotéines ainsi que cela a été constaté dans divers ovocytes d'Invertébrés : Echinodermes (FICQ, 1955 et 1961 ; GEUSKENS, 1963), Batraciens (FICQ, 1961), Annélides (ALLEN, 1966 ; TWEDELL, 1966), Insectes (Van den BROEK et TATES, 1961 ; ZALOKAR, 1965).

L'étude des synthèses de protéines a été entreprise, d'une part dans le but de suivre le mode d'élaboration de lobules de vitellus protéique, d'autre part, dans celui de préciser le cycle des protéines basiques.

L'importance de ces dernières dans le métabolisme cellulaire est bien connue, particulièrement en ce qui concerne leur rôle dans la régulation des synthèses d'acides nucléiques (HUANG et BONNER, 1962 ; ALLFREY et al., 1963).

La leucine (L-Leucine ^3H , 145 m Ci/mM) à la dose de 15 μCi par gramme de poids frais a été utilisée comme précurseur des synthèses de protéines totales.

L'arginine (L-Arginine ^3H -4, 1 Ci/mM) et la lysine (L-Lysine ^3H -4, 1 Ci/mM) ont été employées pour l'étude de la synthèse des protéines basiques à la dose de 50 μCi par gramme de poids frais (les produits radioactifs utilisés dans cette étude ont été délivrés par le C.E.A.).

Les fixations sont effectuées par le liquide de Carnoy (incorporation d'uridine ^3H) ou par le formol à 10 % dans l'eau de mer à des temps variés d'évolution s'étendant de une demi-heure à 5 jours après l'injection.

I - INCORPORATION D'URIDINE ^3H (Tableau 2)

Pour les temps courts d'incorporation (1/2 heure et 1 heure), le marquage est localisé uniquement au niveau du nucléole. 3 à 6 heures après l'injection le marquage apparaît dans le nucléoplasme (Pl. 2, fig. a) ; il ne gagne le cytoplasme qu'après une durée approximative de 24 heures. Dans le cas de certains nucléoles dont le centre est occupé par une vacuole de grande taille, la radioactivité est étroitement localisée à la zone corticale du nucléole (Pl. 2, fig. b et c).

Après 48 heures d'incorporation, le marquage reste important dans le nucléoplasme et surtout dans le nucléole. Au 5ème jour, il diminue fortement dans le noyau ; corrélativement il s'élève dans le cytoplasme.

Contrôle

L'action de la RNase sur coupes fixées au Carnoy n'entraîne qu'une disparition incomplète du marquage après une digestion de 3 heures. Sur le même matériel SCHROEDER (1969) fait agir cette enzyme pendant une période excessivement longue (17 heures) pour obtenir la disparition du marquage. Il semble que l'action de la RNase s'exerce difficilement après fixation des pièces.

Par contre l'acide trichloro-acétique 1 N à 60° C pendant 3 heures fait disparaître toute trace de radioactivité. Le TCA chaud détruisant les

Tableau 2 - Marquage des sites cellulaires après des durées variables d'incorporation d'uridine ^3H (N. diversicolor).

Temps d'incorporation	Nucléole	Nucléoplasme	Cytoplasme	Vitellus (protéique)
1/2 h	quelques grains	-	-	-
1 h	++	-	-	-
6 h	+++	+	quelques grains	-
24 h	++++	++	+	-
48 h	++++	++	++	-
5 jours	++	+	++++	-

Légende : - pas de marquage
 + marquage
 +++ marquage intense

acides nucléiques, nous pouvons considérer que l'uridine tritiée s'est bien incorporé à l'ARN, étant donné qu'aucune synthèse d'ADN ne survient durant cette période.

II - INCORPORATION DE LEUCINE ^3H (TABLEAU 3) (N. DIVERSICOLOR)

Chez N. diversicolor pour des temps d'incorporation, de l'ordre d'une demi-heure; le marquage est localisé essentiellement au niveau du nucléole (Pl. 2, fig. e). Dans le cytoplasme, les grains d'argent, peu nombreux, sont répartis préférentiellement dans la zone corticale. Le marquage du nucléoplasme apparaît entre 1 et 3 heures (Pl. 2, fig. f et g).

24 heures après l'injection, la radioactivité baisse légèrement

au niveau du nucléole tandis qu'une concentration de grains d'argent est notée au niveau de certains petits lobules vitellins. Cette évolution s'accroît pour les périodes d'incorporation de plus longue durée (48 heures et plus) (Pl. 2, fig. h). Il est à noter qu'un taux notable de marquage persiste, même après 4 jours d'évolution, au niveau des travées du cytoplasme.

Des résultats similaires ont été constatés dans les ovocytes de N. pelagica, le marquage des lobules vitellins est cependant moins important. Cette particularité est vraisemblablement due au fait que le développement du vitellus est plus restreint dans cette espèce que chez N. diversicolor. D'autre part, chez N. pelagica les synthèses de protéines nucléolaires sont particulièrement importantes durant la phase d'élaboration des mucopolysaccharides cytoplasmiques.

Tableau 3 - Marquage des différents sites cellulaires après des durées variables d'incorporation de leucine ^3H (N. diversicolor)

Temps d'incorporation	Nucléole	Nucléoplasme	Cytoplasme	Vitellus (protéique)
1 h	++	+	+	-
6 h	+++	+	+	-
24 h	++	++	++	++
48 h	+	+	++	+++
4 jours	+	+	++	+++

III - INCORPORATION DE LYSINE ³H ET D'ARGININE ³H

a) Lysine (Tableau 4)

Pendant les 6 premières heures d'incorporation, on constate une élévation progressive de la radioactivité dans tous les sites cellulaires, sauf dans le vitellus où aucun marquage n'est enregistré. La répartition des grains d'argent est assez diffuse avec cependant une prépondérance nette au niveau du nucléole.

24 heures après l'injection, le marquage du noyau et du nucléole reste généralement élevé, quoique présentant des différences notables selon les vers en expérimentation. Comme dans le cas de la leucine ³H, on note une augmentation de la radioactivité du cytoplasme ; celle-ci est localisée en majeure partie au niveau des lobules vitellins (Pl. 3, fig. a). La chasse du précurseur marqué par une solution froide de lysine à la 6^{ème} heure est suivie, après une évolution totale de 24 heures, d'une concentration plus nette que dans l'expérience précédente de la radioactivité au niveau des lobules vitellins. Par contre, le marquage nucléaire ne présente pas de modifications.

dans ce cas

Tableau 4 - Cinétique d'incorporation de la lysine ³H (N. diversicolor)

Temps d'incorporation	Nucléole	Nucléoplasme	Cytoplasme	Vitellus protéique
1/2 h	++	+	+	-
1 h 30	+++	++	++	-
3 h	++++	++	++	-
6 h	++++	++	++	-
24 h	+++	++	++++	+++
48 h	+++	++	++++	++++
5 jours	++	+	++	++++

b) Arginine (Tableau 5)

L'incorporation de l'arginine semble plus lente que celle de la lysine mais on retrouve l'augmentation progressive de la radioactivité dans l'ensemble de la cellule ainsi que la prépondérance du marquage du nucléole (Pl. 3, fig. c).

Le nucléoplasme et le nucléole voient leur radioactivité diminuer sensiblement 24 heures après l'injection tandis que celle du cytoplasme augmente nettement.

Après des temps plus longs d'incorporation (48 heures à 5 jours), le nucléole et le noyau sont pratiquement indemnes de tout marquage. La radioactivité est très importante au niveau des granules vitellins les plus petits ; corrélativement, elle devient insignifiante dans les travées cytoplasmiques (Pl. 3, fig. d).

La chasse du précurseur accélère la concentration des grains d'argent au niveau des lobules vitellins (Pl. 3, fig. e).

Tableau 5 - Cinétique d'incorporation de l'arginine ^3H (N. diversicolor)

Temps d'incorporation	Nucléole	Nucléoplasme	Cytoplasme	Vitellus protéique
1 h	+	qq grains	qq grains	-
2 h	++	qq grains	qq grains	-
3 h	+++	+	+	-
6 h	++++	++	+	-
24 h	++	++	+++	+
48 h	+	+	+	+++
5 jours	qq grains	qq grains	qq grains	++++

Contrôles

De préférence aux digestions enzymatiques (l'action des protéases est assez aléatoire sur tissus fixés), nous avons utilisé des méthodes chimiques. Les protéines basiques étant sensibles à l'action des acides minéraux dilués, les coupes sont soumises à l'action de l'HCl 0,2 N ou de l'acide sulfurique à 5 % (concentration de la réaction différentielle de Millon (LISON, 1961). Après ce traitement les coupes ne présentent pratiquement plus aucun marquage (Pl. 3, fig. b).

IV - DISCUSSION

1 - Métabolisme de l'ARN

Dans les ovocytes de Néréidiens, l'étude cinétique de l'incorporation d'uridine ^3H suggère que les synthèses d'ARN s'effectuent dans le nucléole et que ces acides nucléiques migrent ensuite dans le nucléoplasme puis le cytoplasme. Le rôle du nucléole dans les synthèses d'ARN ainsi que l'existence d'un transfert de matériel vers le cytoplasme constituent maintenant des données bien établies à la suite de nombreuses études biochimiques (PERRY, 1965 et 1969) autoradiographiques (AMANO et IEBLOND, 1960) et expérimentales : irradiation du nucléole par les U.V. (PERRY et ERRERA, 1960 ; SIDDEBOTTOM et HARRIS, 1969) ; implantation de noyaux préalablement radioactifs (CRAIG et GOLDSTEIN, 1969).

Dans les ovocytes, le métabolisme nucléolaire et les échanges nucléocytoplasmiques sont particulièrement actifs comme l'ont montré les études autoradiographiques effectuées en microscopie photonique chez les Echinodermes (FICQ, 1955 et 1961 ; GEUSKENS, 1963), les Batraciens (FICQ, 1961), les Insectes (VAN DEN BROEK et TATES, 1961 ; ZALOKAR, 1965) et les Annélides (DHAINAUT, 1964 ; ALLEN, 1966 ; TWEDELL, 1966 ; GOULD et SCHROEDER, 1969).

La nature de l'ARN synthétisé au niveau du nucléole a pu être précisé par des travaux biochimiques. Dans les cellules Hela de Mammifères, WEINBERG et al. (1967), PERRY (1969) ont montré que la transcription et la méthylation des grandes molécules précurseurs de l'ARN ribosomal (ARN 45 S) s'effectuent au niveau des cistrons de l'ADN nucléolaire. Ce précurseur se fragmente ensuite en molécules d'ARN 18 S et 32 S avec perte de la portion non méthylée. Le transfert des produits nucléolaires vers le cytoplasme

s'effectue sous la forme d'ARN 18 S et 28 S, liés à des protéines.

Dans les ovocytes d'Amphibiens (BROWN et LITTNA, 1964 ; DAVIDSON et al., 1964) et d'Echinodermes (PIATIGORSKY et TYLER, 1967) des résultats similaires montrent que l'ARN ribosomal 18 S et 28 S représente la majeure partie des ARN synthétisés. Cependant l'ARN messenger, de sédimentation hétérologue, constitue une fraction notable des produits de synthèse. Cet ARN messenger étant stocké en grande partie sous une forme inactive dans le cytoplasme, jusqu'à la fécondation (SPIRIN, 1966).

Chez les Néréidiens, GOULD-SOMERO et SCHROEDER (1969) ont signalé récemment la présence d'ARN 45 S et 30 S dans les ovocytes de N. grubei. Chez cette espèce, les fractions obtenues en gradient de sucrose suggèrent que les synthèses d'ARN ribosomal sont prépondérantes et pourraient s'effectuer à tous les stades de l'évolution ovocytaire.

Il semble donc qu'à la suite d'une injection d'uridine ^3H , la majeure partie de la radioactivité visualisée en autoradiographie soit liée à des ARN de nature ribosomale.

2 - Métabolisme des protéines totales

a) Métabolisme nucléaire

Chez N. diversicolor et N. pelagica, le métabolisme protéique du nucléole est très intense. Peu de temps après l'injection de leucine ^3H , le marquage de cet organite tranche nettement sur celui des autres sites cellulaires. Si pour certains auteurs tel PERRY (1969) le problème de l'origine des protéines nucléolaires et nucléaires est encore discuté, il semble cependant que dans certains types cellulaires, l'existence de synthèses protéiques au niveau du nucléole soit désormais acquise. ALLFREY et al. (1964) ont démontré l'incorporation "in vitro" d'acides aminés dans des noyaux de thymus isolés. TIXIER-VIDAL et al. (1965), DROZ et al. (1968, cités par BERNHARD et GRANBOULAN, 1968) ont montré par ailleurs en autoradiographie à haute résolution que le marquage du nucléole résulte bien d'une synthèse "in situ" et non d'une migration de protéines cytoplasmiques.

Le rôle de ces protéines reste encore controversé (BERNHARD et GRANBOULAN, 1968). Pour VINCENT (1965), elles pourraient jouer un rôle protecteur pour l'ARN messenger ; pour BIRNSTIEL et al. (1963) elles s'associeraient à l'ARN ribosomal pour donner naissance aux ribonucléoprotéines.

La persistance d'un taux notable de radioactivité nucléolaire semble indiquer que toutes les protéines ne seraient pas transférées vers le cytoplasme. Certaines d'entre elles peuvent persister "in situ" même après chasse du précurseur ; elles semblent jouer le rôle de protéines de structure.

b) Métabolisme du cytoplasme

En ce qui concerne le marquage du cytoplasme, le problème est particulièrement complexe. Une synthèse de protéines semble s'effectuer précocement au niveau des ribosomes de la zone corticale de l'ovocyte (voir Chapitre VI : vitellogenèse). Ces protéines, après remaniement au niveau de l'appareil de Golgi, seraient intégrées dans le vitellus protéique. Ce processus métabolique serait analogue à celui démontré dans les cellules à sécrétion exocrines (CARO et PALADE, 1964 ; DROZ, 1966a ; JAMIESON et PALADE, 1967 a et b).

D'autre part, une partie des protéines nucléolaires semblent migrer vers le cytoplasme comme en témoigne la chute de radioactivité constatée au niveau de cet organite. Il est possible que ces protéines fassent partie du "pool" protéique nucléolaire envisagé par PERRY (1969) et qu'elles puissent gagner le cytoplasme sous forme de ribonucléoprotéines après leur association avec l'ARN ribosomal (BIRNSTIEL et al., 1964). Ce processus permettrait d'expliquer la persistance d'un marquage au niveau des zones cytoplasmiques riches en ARN, alors que les protéines synthétisées initialement à ce niveau se sont incorporées dans les éléments vitellins.

3 - Métabolisme des protéines basiques

a) Protéines basiques nucléaires

L'autoradiographie, après injection de lysine et d'arginine tritiées permet de considérer le nucléole de l'ovocyte de N. diversicolor comme un site important de la synthèse des protéines basiques.

Dans le cas de l'arginine, le marquage disparaît presque totalement du nucléole après 5 jours d'incorporation ; la plus grande partie de la radioactivité se trouve alors localisée dans le cytoplasme. La chasse du précurseur aboutit au même résultat d'une façon plus rapide. Ces résultats sont en faveur d'une migration nucléo-cytoplasmique des protéines riches en arginine

synthétisées par le nucléole. Ce processus est beaucoup moins net en ce qui concerne les protéines riches en lysine. Cette particularité pourrait résulter de l'existence de plusieurs fractions de protéines, ainsi que cela a été envisagé par un certain nombre d'auteurs (ALLFREY et al., 1964). Il reste néanmoins difficile de préciser le rôle exact des protéines basiques au cours de l'ovogenèse. Les travaux de SUSKIND (1965) sur le nucléole des cellules Hela ont démontré l'existence d'une relation métabolique et structurale entre l'ARN et les protéines incorporant activement les acides aminés basiques ; cet ARN serait de nature ribosomale comme le montre l'action sélective de l'actinomycine D à basse concentration.

On peut donc envisager qu'une partie des protéines basiques pourrait s'associer au niveau du nucléole à l'ARN ribosomal dont nous connaissons par ailleurs l'importance des synthèses.

b) Protéines basiques cytoplasmiques

L'éventualité d'une association protéines basiques-ARN ribosomal se repose au niveau du cytoplasme. Dans ce dernier, les sites riches en ARN sont marqués intensément après une incorporation d'acides aminés basiques. Cette observation concorde avec une série d'études cytochimiques montrant qu'au niveau des ribosomes, les protéines basiques sont associées à l'ARN : BACKSTROM, 1965 (oeuf d'Oursin) ; DAVENPORT et DAVENPORT, 1965, 1966 (ovocytes de plusieurs espèces animales) ; COWDEN, 1966 (ribosomes isolés de bactéries et de cellules hépatiques). Cette association a été démontrée expérimentalement "in vitro" par MAGGIO et al. (1965) qui obtiennent l'activation d'oeufs vierges d'Oursin en faisant agir la trypsine, enzyme dont l'action s'exerce particulièrement sur les protéines basiques.

Au cours de l'évolution naturelle, des études cytochimiques quantitatives sur les ovocytes indiquent que le complexe ARN ribosomal - protéines basiques se dissocie au cours de la vitellogenèse pour "libérer" des ribosomes actifs (COWDEN, 1966, 1967 ; LECHENAULT, 1967). Ces protéines pourraient donc jouer un rôle de régulateur des synthèses protéiques au niveau des ribosomes, au cours de l'ovogenèse (BACKSTROM, 1966 ; COWDEN, 1967). Chez la plupart des espèces étudiées par ces auteurs, les synthèses d'ARN se déroulent surtout pendant la prévitellogenèse. Au cours de la vitellogenèse, l'ARN maintenu sous une forme bloquée par les protéines basiques, est progressivement libéré ; corrélativement on constate une diminution de la teneur

en ARN du cytoplasme et une augmentation du taux des protéines basiques. Chez N. diversicolor, à la différence des ovocytes d'Echinodermes et de Tuniciers étudiés par les auteurs précédemment cités, la détection des protéines basiques dans le cytoplasme reste négative ; d'autre part dans les ovocytes de Néréidiens, les synthèses d'ARN restent très actives durant toute la vitellogenèse. Il est possible que dans cette espèce, la dissociation du complexe ARN-protéines basiques soit très rapide, ce qui permettrait d'expliquer l'impossibilité de détecter cytochimiquement les protéines basiques du cytoplasme.

c) Problème des protéines basiques du vitellus

Les techniques cytochimiques de mise en évidence des protéines basiques sont constamment positives au niveau de lobules de vitellus protéique, où l'autoradiographie révèle par ailleurs une accumulation importante de grains d'argent après l'injection d'acides aminés basiques.

Une telle concentration de protéines basiques au niveau du vitellus est signalée en fin d'ovogenèse chez Lineus ruber (LECHENAULT, 1967) et chez Littorina zincae (COWDEN, 1966). En autoradiographie, SANCHEZ (1969) montre que l'incorporation de lysine se fait d'abord dans les régions basophiles riches en ARN puis dans les îlots de vitellus en formation (ovocytes d'Amphibiens).

Néanmoins, étant donné les réserves faites à propos de la spécificité de la coloration des lobules vitellins par le vert solide alcalin (DAVENPORT, 1967) il est difficile de préciser la signification du marquage des éléments vitellins de N. diversicolor après l'injection des acides aminés basiques. L'existence de radioactivité à ce niveau peut résulter, soit de la synthèse des phosphoprotéines et des lipoprotéines à partir des acides aminés basiques, soit d'une incorporation directe des protéines basiques du cytoplasme, après leur dissociation du complexe ARN-protéines basiques.

CONCLUSION

L'étude du métabolisme des ovocytes de N. diversicolor a porté sur les cinétiques d'incorporation des précurseurs d'ARN (uridine ^3H) des protéines totales (leucine ^3H) et des protéines basiques (lysine ^3H et arginine ^3H).

Les ARN sont synthétisés initialement et très activement au niveau du nucléole. La majeure partie de ces ARN est vraisemblablement de nature ribosomale. Les ARN, après leur transfert dans le nucléoplasme, migrent dans le cytoplasme où ils s'accumulent dans les travées basophiles.

Les protéines totales sont synthétisées à la fois au niveau du nucléole et dans la zone corticale du cytoplasme. Pour de longues durées d'incorporation (24 à 48 heures), on constate l'apparition d'un marquage important dans certains lobules de vitellus protéique et une diminution du taux de la radioactivité du nucléole.

L'hypothèse de deux voies métaboliques dans la synthèse des protéines est envisagée. La première serait en relation avec l'édification du vitellus protéique à partir des protéines synthétisées par le cytoplasme (Chapitre VI); la deuxième concernerait^{la} migration des protéines nucléolaires vers le cytoplasme, vraisemblablement après leur association avec l'ARN ribosomal. Ces protéines liées seraient responsables de la persistance du marquage au niveau des travées basophiles de l' cytoplasme.

L'incorporation des précurseurs de protéines basiques est suivie d'un marquage au niveau du nucléole, d'une concentration de grains d'argent dans la zone basique du cytoplasme puis dans les lobules vitellins. La signification de ce marquage est discutée en fonction des données cytochimiques.

En résumé, chez N. diversicolor le métabolisme ovocytaire durant la phase de grand accroissement est caractérisé d'une part, par l'importance des synthèses nucléolaires. L'ARN élaboré à ce niveau pourrait être associé, lors de son transfert dans le cytoplasme à des protéines de nature variée. D'autre part, les protéines d'origine cytoplasmique interviennent dans l'édification du vitellus, de même, éventuellement, qu'une partie des protéines d'origine nucléaire.

CHAPITRE III

LE NOYAU

INTRODUCTION

A la suite des divisions goniales, l'ovocyte entre en prophase de méiose. A la fin de la prophase, la chromatine cesse d'être visualisée par les réactions histochimiques. Ce phénomène persiste durant toute la période de l'accroissement du cytoplasme. Ce n'est qu'après la fécondation qu'intervient la métaphase et que la méiose se poursuit par l'émission des globules polaires.

En dehors des recherches sur le nucléole qui feront l'objet d'un chapitre distinct, deux aspects de l'évolution nucléaire retiendront notre attention :

- Celui de la prophase méiotique qui sera étudié à la fois sous l'angle cytologique et par rapport aux synthèses d'ADN.
- Le stade de l'apparition des inclusions et des lamelles annelées intra-nucléaires à l'approche de la maturité sexuelle.

I - EVOLUTION NUCLEAIRE DES OVOGONIES ET DES JEUNES OVOCYTES

Dès le stade ovogonie, les cellules germinales évoluent librement dans le milieu coelomique. Ces cellules sont alors assemblées en des amas de 10 à 20 éléments parvenus à des stades cytologiques variés : certains sont encore au stade gonie tandis que les plus évolués sont en début de phase d'accroissement.

Nous envisagerons successivement les modifications cytologiques nucléaires, puis, en fonction de ces dernières, la période durant laquelle s'effectuent les synthèses d'ADN ovocytaire.

A - ETUDE CYTOLOGIQUE DES OVOGONIES ET DES OVOCYTES EN PROPHASE DE MEIOSE (Fig. V).

Cette étude a été effectuée essentiellement en microscopie optique ; les techniques de microscopie électronique ayant donné des résultats assez décevants dans la fixation des chromosomes.

- Les ovogonies

Ces cellules sont caractérisées par la prépondérance du volume nucléaire sur celui du cytoplasme. Les chromosomes, bien individualisés, se colorent fortement par les techniques cytologiques classiques (Réaction de FEULGEN ; hématoxyline ferrique de HEIDENHAIN). Les divisions goniales se poursuivent activement dans les massifs cellulaires coelomiques comme le démontrent les nombreuses figures de mitoses observées à leur niveau. La télophase de la dernière division des cellules goniales est suivie d'une despiralisation progressive des chromosomes : la chromatine forme alors un réseau diffus analogue à celui des cellules somatiques en interphase. Un nucléole de petite taille apparaît.

Cette période de repos précède le début de la prophase de méiose. A partir de ce stade, les cellules germinales prennent l'appellation d'ovocytes primaires.

- Stade leptotène

Il est caractérisé par l'individualisation des chromosomes qui se présentent sous l'aspect de filaments grêles, très contournés, orientés selon une direction sensiblement parallèle.

- Stade zygotène

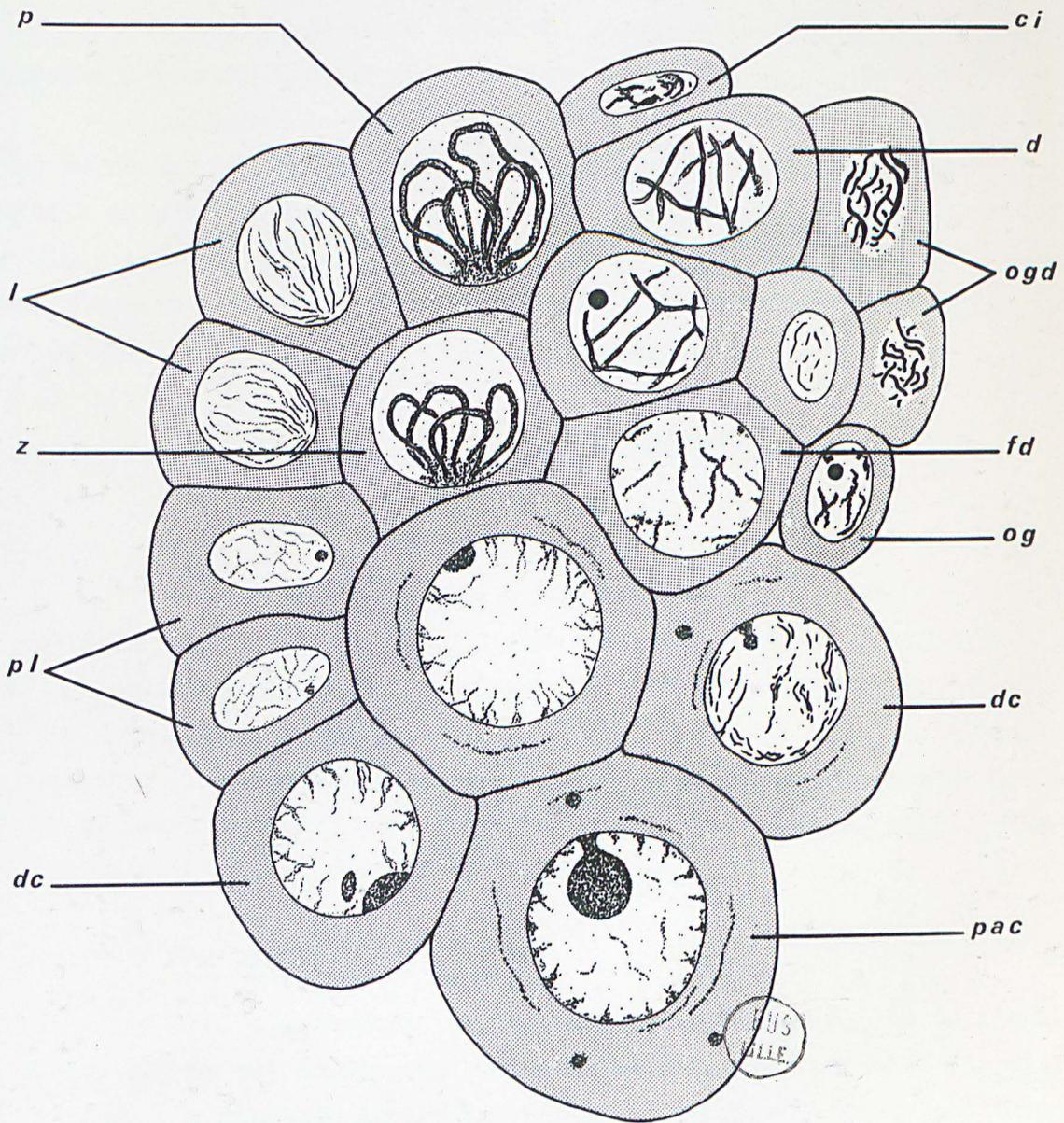
Le nucléole a maintenant disparu ; vu la taille restreinte des cellules germinales, l'appariement des chromosomes est difficilement visible. Par contre, une contraction très nette des chromosomes est observée à la fin de ce stade (stade synizesis). Tous les chromosomes se tassent à un pôle de la cellule en une masse très colorable par les colorants nucléaires.

Fig. V - Représentation semi-schématique d'un flot de cellules germinales de N. pelagica (ovogonies et ovocytes en prophase de méiose).

- og : ovogonie
- ogd : divisions de cellules goniales
- pl : ovocytes au stade préleptotène (interphase précédant la prophase de méiose)
- l : ovocytes au stade leptotène
- z : stade zygotène (contraction des chromosomes : phase synizesis)
- p : stade pachytène
- d : stade diplotène
- fd : fin du stade diplotène
- dc : début du stade dictyotène : dispersion de la chromatine ;
édification du nucléole
- pac : début de la phase d'accroissement du cytoplasme
- ci : cellule intercalaire.



Fig. V



- Stade pachytène

Les chromosomes très épaissis apparaissent groupés en bouquet. Ils forment des anses dont la courbure est orientée vers le centre du noyau. Peu à peu la polarité des chromosomes s'atténue et ceux-ci se dispersent dans le nucléoplasme.

- Stade diplotène et stade de diffusion (début du stade dictyotène)

Les chromosomes après une courte phase de spiralisation se dispersent à nouveau dans le nucléoplasme en un réticulum assez diffus.

Le nucléole apparaît à proximité de l'enveloppe nucléaire. A ce stade, le réseau de chromatine tend à localiser^{se} uniquement dans la zone corticale du nucléoplasme. L'intensité de la réaction de Feulgen diminue puis finit par devenir complètement négative. Le noyau entre alors en période de repos tandis que le volume du cytoplasme s'accroît considérablement : la phase de grand accroissement du cytoplasme commence.

B - ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE DES SYNTHÈSES D'ADN

1 - Etude "in vitro"

Cette étude a porté sur N. diversicolor. Le milieu de culture est additionné de thymidine ^3H (3 Ci/mM. CEA) à la dose de 2 $\mu\text{C}/\text{ml}$. Les parapodes des cellules germinales sont associés à des prostomiums pour rester dans les conditions hormonales analogues à celles de l'ovogenèse naturelle. Les fixations, effectuées au Carnoy, ont porté sur plusieurs séries de culture groupant au total une cinquantaine d'explants. Elles sont échelonnées quotidiennement pendant une période de 12 jours.

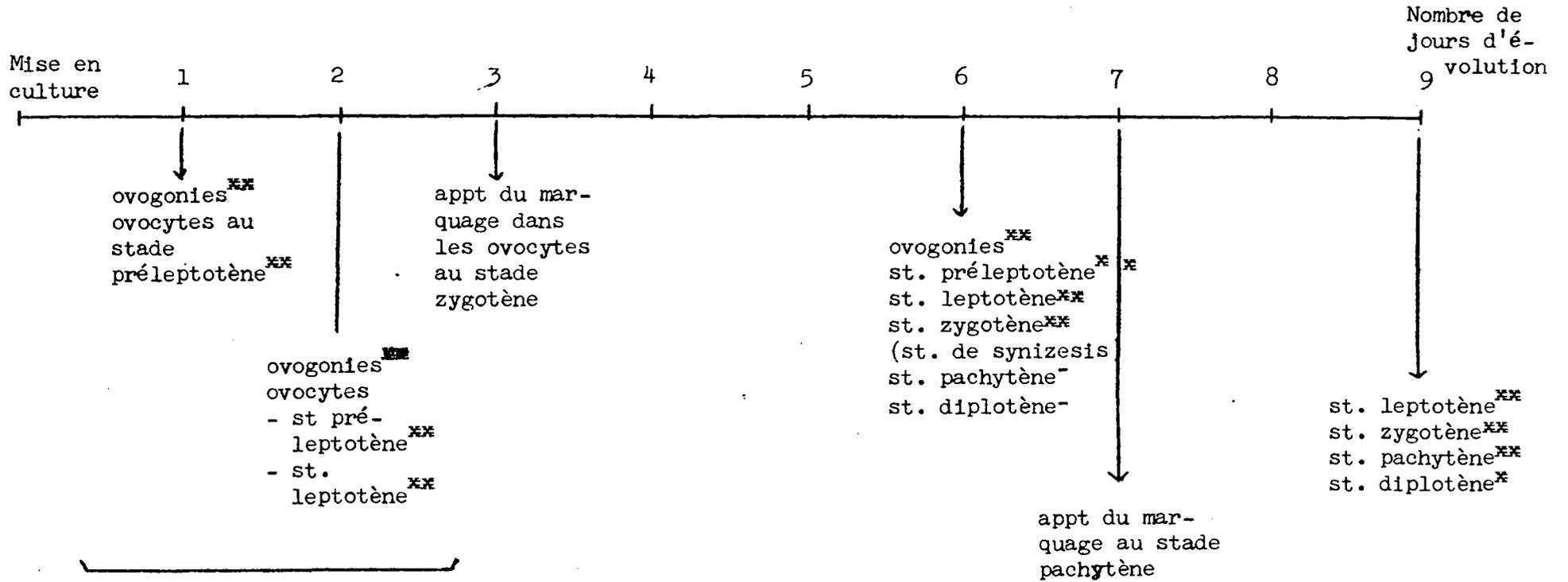
- Résultats

a) L'incorporation de thymidine est très élevée au niveau des ovogonies, ce qui confirme l'existence de divisions goniales "in vitro". D'autre part, le marquage apparaît précocement au niveau de ces cellules (24 heures de culture), ce qui traduit un rythme de division rapide.

b) En dehors des ovogonies, les seules cellules germinales marquées après 24 heures de culture sont au stade préleptotène. Il semble donc que les synthèses d'ADN s'effectuent pendant l'interphase qui suit la dernière division goniale.

Tableau 6

Tableau relatif à l'apparition de la radioactivité au niveau
des stades de la prophase de méiose en fonction du temps



Les autres stades ovocytaires
ne sont pas marqués.

c) Le temps qui s'écoule avant l'apparition du marquage au niveau des divers stades de la prophase de méiose donne des indications sur la vitesse de déroulement de cette dernière. Ces données sont regroupées dans le tableau 6.

Le stade leptotène est assez rapide et ne doit guère s'étendre au delà d'une journée (Pl. 74, fig. h). Par contre, le stade zygotène, et en particulier, la phase de contraction des chromosomes (stade synizesis) dure très longtemps (environ 3 à 4 jours) puisque la radioactivité n'apparaît dans les éléments parvenus au stade pachytène qu'après 7 jours de culture. La durée totale de la prophase de méiose, en culture organotypique, s'échelonne environ sur une dizaine de jours.

2 - Etude "in vivo"

Les jeunes femelles de N. diversicolor conservées au laboratoire à la température de 15° C ont reçu une injection intra-coelomique de 20 µC de thymidine ³H. Les animaux sont fixés après 24 heures d'incorporation.

L'examen des autoradiogrammes montre, pour ce temps d'incorporation, que seules les ovogonies et les ovocytes en inter-phase préméiotique présentent du marquage.

Dans les ovocytes en phase d'accroissement, aucun marquage significatif n'a pu être décelé, tant au niveau du noyau que du cytoplasme, à quelque stade que ce soit.

C - DISCUSSION

L'examen cytologique effectué soit sur coupes histologiques, soit à la suite de ponction coelomique révèle, dans les trois espèces étudiées (N. diversicolor, N. pelagica et P. cultrifera), la présence d'flots de cellules goniales dans des vers renfermant par ailleurs des ovocytes plus âgés ; ces derniers peuvent en certains cas atteindre un diamètre de l'ordre de 100 µ. Il semble donc que plusieurs poussées de proliférations ovogoniales puissent s'effectuer au cours de l'ovogenèse.

Chez N. grubei, SCHROEDER (1970) signale un phénomène similaire. Il constate que les proliférations goniales sont particulièrement intenses à deux stades de l'ovogenèse: quand les ovocytes les plus âgés sont parvenus respectivement à un diamètre de 35 et de 75 µ.

Dans les ovocytes, la prophase de méiose se trouve séparée de la métaphase par une longue période de repos qui correspond à la phase de grand accroissement. Cette particularité des cellules génitales femelles ne semble guère présenter d'exception dans l'ensemble du règne des métazoaires (RAVEN, 1961).

Chez les Polychètes, le déroulement de la prophase de méiose s'effectue sans particularité cytologique notable, tout au plus, peut-on signaler, la forte contraction des chromosomes au stade synzesis ; DEHORNE (1911), chez Sabellaria, avait mentionné un processus semblable.

L'examen cytologique ne montre aucune différence entre les cellules germinales ayant évolué "in vitro" et celles issues de l'ovogenèse naturelle. Aucun signe de dégénérescence n'a jamais été constaté dans les cellules en culture. La méthode de culture organotypique présente par contre l'avantage de pouvoir suivre l'évolution d'une même souche de cellules sexuelles ; d'autre part, la possibilité de cultiver un grand nombre d'explants autorise des fixations nombreuses, condition indispensable pour l'établissement d'une cinétique.

Les résultats fournis par l'autoradiographie permettent de situer la période de la synthèse de l'ADN ovocytaire durant le stade préleptotène et peut être au début du stade leptotène (la distinction cytologique de ces deux stades est assez délicate). Différentes études portant sur ce problème ont été réalisées chez les Echinodermes (HOLLAND et GIESE, 1965), les Insectes (HEINONEN et HALKKA, 1964), les Amphibiens (FICQ, 1968), les Oiseaux (CALLEBAULT, 1967) et les Mammifères (LIMA de FARIA et BORUM, 1962 ; PETERS et CRONE, 1968). Il ressort, de l'ensemble de ces travaux, que d'une façon générale, la synthèse de l'ADN ovocytaire est réalisée durant l'interphase préméiotique et parfois durant le stade leptotène.

Chez les Annélides, TWEEDELL (1966) dans son étude sur Pectinaria gouldii arrive à des conclusions similaires en ce qui concerne l'incorporation nucléaire de la thymidine ³H. Cet auteur constate en outre, une incorporation abondante de ce précurseur dans l'ooplasmе. Nous n'avons pas constaté, en ce qui nous concerne, de phénomènes analogues chez les Néréidiens.

II- LAMELLES ANNELEES ET INCLUSIONS INTRA-NUCLEAIRES

Les formations intra-nucléaires n'ont été observées que dans des ovocytes proches de la maturité sexuelle, d'un diamètre moyen d'environ 170 μ pour N. diversicolor et 190 μ pour N. pelagica. Le noyau, à ce stade, présente une forme arrondie ; sa taille se situe aux environs de 30 à 40 μ . En microscopie photonique, le nucléoplasme manifeste une affinité pour les colorants acides.

L'enveloppe nucléaire ne présente pas de particularités notables. Elle est constituée de deux membranes d'environ 75 Å séparées par un espace périnucléaire variant entre 300 et 500 Å. Les pores nucléaires sont distribués à intervalles réguliers et leur diamètre, vu de profil, se situe aux environs de 750 Å. La membrane externe de l'enveloppe nucléaire présente parfois des expansions lamellaires en direction du cytoplasme (Pl. 63, fig. a). De tels aspects peuvent également être observés au niveau de la membrane interne (même figure) mais ils sont beaucoup moins fréquents. Par contre, on note fréquemment, à proximité de cette membrane, la présence de vésicules aplaties d'un diamètre variant entre 200 et 400 Å (Pl. 61, fig. c et Pl. 63, fig. b).

Au cours de l'ovogenèse naturelle, la présence de lamelles annelées intra-nucléaires n'a été constatée que chez N. pelagica. Les ovocytes de N. diversicolor renferment un type particulier d'inclusions nucléaires qui sera étudié séparément.

A - LES LAMELLES ANNELEES INTRA-NUCLEAIRES (N. PELAGICA)

Leur présence a été observée d'une façon constante dans tous les ovocytes matures examinés (Pl. 14, fig. a et Pl. 60, fig. a). Ces éléments sont toujours situés à proximité de l'enveloppe nucléaire ; ils sont fréquemment en contact avec les fragments nucléolaires abondants dans cette zone à ce stade ovocytaire. Les lamelles intra-nucléaires sont le plus souvent isolées mais elles forment parfois des associations de quelques éléments séparés par un matériel dense (Pl. 60, fig. a). D'une façon générale, la fréquence des pores annulaires de ces éléments est moins élevée qu'au niveau de l'enveloppe nucléaire.

B - LES VESICULES INTRA-NUCLEAIRES (N. DIVERSICOLOR)

Ces inclusions se présentent sous l'aspect de vésicules sensiblement sphériques d'une taille d'environ 600 m μ (Pl. 62, fig. a). La membrane de leur paroi peut se replier et former des invaginations plus ou moins accentuées. Les vésicules renferment généralement 2 à 3 granules dont le contenu très dense se trouve séparé de la membrane granulaire par une auréole plus claire.

Les inclusions intra-nucléaires sont localisées dans une zone nucléoplasmique d'environ 2 μ , sous jacente à l'enveloppe nucléaire ; leur présence n'a jamais été constatée plus profondément à l'intérieur du noyau. Par contre, leur répartition tout autour de la vésicule germinative est plus irrégulière ; certains secteurs en sont pratiquement dépourvus.

Chez N. diversicolor, l'existence de systèmes lamellaires (annelés ou non) n'a été que très rarement constatée au cours de l'ovogenèse naturelle. Les inclusions intra-nucléaires persistent "in situ" dans l'ovocyte jusque la fécondation. La destinée de ces formations lors de la rupture de la vésicule germinative n'a pu être déterminée avec précision.

Le mode de formation et la signification physiologique des éléments intra-nucléaires ^{seront} envisagés au cours de la deuxième partie de notre travail, dans le chapitre consacré à l'évolution de ces organites en l'absence de l'hormone cérébrale (chapitre XII).

CONCLUSION

A la suite des divisions goniales, l'ovocyte entre en prophase de méiose. L'incorporation de thymidine ³H "in vitro" montre que les synthèses d'ADN de l'ovocyte surviennent durant l'interphase précédent le stade leptotène.

La fixation d'explants à des temps variés de culture a permis d'évaluer la vitesse du déroulement des stades de la prophase de méiose, soit environ 24 heures pour le stade leptotène, 3 à 4 jours pour le zygotène, 2 jours pour le pachytène. La durée totale de la prophase de méiose s'échelonne sur une dizaine de jours.

A la fin de la prophase de méiose, l'ADN cesse d'être décelable par les techniques cytochimiques. Ce stade marque le début de la phase de grand accroissement du cytoplasme.

A l'approche de la maturité sexuelle, on observe de façon constante l'apparition de lamelles annelées intra-nucléaires dans les ovocytes de N. pelagica et de vésicules intra-nucléaires dans ceux de N. diversicolor. Le mode de formation et la signification physiologique de ces éléments seront envisagés conjointement à l'évolution de ces structures en l'absence d'hormone dans le chapitre XII.

CHAPITRE IV

LE NUCLEOLE

I - ETUDE AU MICROSCOPE PHOTONIQUE

. Techniques

Cette étude a été effectuée à la fois sur des coupes à la paraffine et sur coupes minces d'épon. Dans le cas des inclusions à la paraffine, les fixations ont été réalisées soit au Carnoy, soit au formol neutralisé. Nous avons également utilisé le Zenker-formol suivi d'une post-chromisation à froid de 4 ou 5 jours.

Les coupes semi-fines d'épon ont été effectuées sur des pièces fixées par la glutaraldéhyde et l'osmium ; ces coupes ont été examinées soit au microscope à contraste de phase, soit après coloration au bleu de toluidine.

. Résultats

1 - N. pelagica

Le nucléole se reconstitue à la fin de la prophase de méiose, au stade diplotène. Initialement situé à proximité de l'enveloppe nucléaire (Pl. 4, fig. a), il gagne le centre du noyau quand les structures chromosomiques s'estompent c'est à dire au début de la phase d'accroissement (Pl. 4, fig. b). A ce stade, l'examen des coupes semi-fines révèle que la structure nucléolaire, jusqu'alors compacte, se transforme en un réseau de formations lamellaires rattachées à des éléments plus massifs (Pl. 4, fig. c). Les structures nucléolaires sont caractérisées par une teneur élevée en ARN comme le démontre la coloration intense par la pyronine ou le bleu de toluidine à pH 4,6 et les contrôles correspondants à la ribonucléase. Après coloration par le Mann-Dominici le nucléole apparaît sous l'aspect d'une masse hétérogène dans laquelle on décèle, à l'intérieur d'une masse à caractère acidophile, des éléments très basophiles de forme sphérique.

Vers la fin de la vitellogenèse, la structure en réseau du nucléole semble se disloquer (Pl. 4, fig. 5). Lors de l'apparition des polysaccharides cytoplasmiques, il ne persiste dans le nucléoplasme que 3 à 4 éléments nucléolaires d'aspect assez compact. Ces éléments augmentent de volume par suite d'un bourgeonnement de formations d'aspect lobulé (Pl. 4, fig. e et f). Ce processus conduit à l'édification de plusieurs complexes nucléolaires comportant chacun un ou plusieurs éléments sphériques à caractère basophile entourés par un réseau lamellaire à réaction acidophile (Pl. 4, fig. g). A partir de ce moment l'affinité du nucléole pour la pyronine ou le bleu de toluidine décroît considérablement. Il devient difficile d'interpréter la morphologie du nucléole à l'aide de ces seules techniques.

La fin de l'élaboration des mucopolysaccharides est marquée par une nouvelle phase de dissociation de l'appareil nucléolaire (Pl. 4, fig. h). Dans le noyau des ovocytes proches de la maturité, les fragments nucléolaires se localisent en deux zones distinctes. La zone sous-jacente à l'enveloppe nucléaire est encombrée de nombreux granules acidophiles de forme arrondie (Pl. 4, fig. i). Ces éléments disparaissent peu de temps avant la fécondation. Au centre du nucléoplasme par contre on observe la persistance de fragments nucléolaires de structure diffuse (Pl. 4, fig. j).

Les observations effectuées en microscopie optique montrent donc que l'évolution nucléolaire se caractérise par une succession de phases de bourgeonnement alternant avec des phases de dissociation qui libèrent dans le nucléoplasme de nombreux fragments nucléolaires. La signification précise de cette évolution sera envisagée par l'examen de ces structures au microscope électronique.

2 - Nereis diversicolor

Le cycle évolutif du nucléole est beaucoup plus simple que celui de N. pelagica. Durant la majeure partie de l'ovogenèse, un seul nucléole de forme sphérique est observé (Pl. 2 et 3). Après coloration au bleu de toluidine (pH : 4,6), celui-ci présente soit une teinte uniforme, soit une zone corticale plus colorée. Dans ce cas, la zone corticale présente le plus souvent un caractère basophile après coloration au Mann-Domici tandis que la zone centrale est acidophile. Certains nucléoles

renferment d'autre part une ou plusieurs vacuoles de grande taille.

A l'approche de la maturation, le nucléole présente des phénomènes de vacuolisation et de bourgeonnement complexes tandis que sa partie basophile disparaît progressivement. Ce stade peut être précédé en certains cas par une séparation du nucléole en deux hémisphères : l'un basophile et l'autre acidophile. Comme au cours de l'ovogenèse de N. pelagica, une dissociation du nucléole s'opère alors. Elle s'accompagne de l'apparition de fragments nucléolaires acidophiles à proximité de l'enveloppe nucléaire.

II - ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

Cette étude sera restreinte au nucléole de N. pelagica, espèce où le cycle nucléolaire atteint sa complexité maximum et par le fait même rend nécessaire une description relativement détaillée des structures nucléolaires et de leur évolution.

A - STADE DE PREVITELLOGENESE

1 - Reconstitution du nucléole

L'examen du noyau au stade diplotène montre que les chromosomes sont encore bien individualisés. Fréquemment situés à proximité de l'enveloppe nucléaire, ils forment une sorte de réseau dans le nucléoplasme (Pl. 5, fig. a).

Le nucléole apparaît sous l'aspect d'une masse assez aplatie, accolé à l'enveloppe nucléaire. L'examen à plus fort grossissement (Pl. 5, fig. b) montre qu'il est constitué en majeure partie par un matériel de nature fibrillaire. Ce dernier englobe de petits massifs (environ 70 μ) d'aspect granuleux entourés par une auréole de plus faible densité. Le constituant granulaire, peu développé, est disposé le plus souvent à la périphérie du matériel fibrillaire ; il est parfois intriqué à l'intérieur de ce dernier.

La zone corticale du nucléole est fréquemment en relation avec des formations de chromatine d'une densité électronique très voisine, dans les ovocytes de Néréidiens, de celle des constituants nucléolaires ; sa détection éventuelle à l'intérieur du nucléole s'avère pour cette raison très délicate.

2 - Edification du massif nucléolaire

Au début du stade dictyosome^{cène}, les formations de chromatine s'amenuisent progressivement, elles ne persistent dans le nucléoplasme que sous forme de petits amas accolés à l'enveloppe nucléaire (Pl. 6, fig. a). Le nucléole augmente de volume par rapport au stade précédent, il acquiert une forme arrondie et tend à migrer vers le centre du noyau. Dans certains cas, il reste cependant en contact avec l'enveloppe nucléaire par l'intermédiaire d'une sorte de pédoncule (Pl. 6, fig. a). Le matériel fibrillaire englobe un réseau de petites vacuoles de densité variable dont certaines renferment un matériel lâchement organisé d'aspect granuleux (Pl. 6, fig. b).

Parallèlement à l'augmentation de taille de l'ovocyte, le nucléole acquiert un aspect beaucoup moins compact. Ce processus résulte en particulier du développement du réseau vacuolaire dont l'accroissement a pour conséquence de déterminer un agencement en travées du matériel fibrillaire. Le constituant granulaire s'accroît et se rassemble à la périphérie du matériel fibrillaire en de petits massifs nettement individualisés formant des hernies dans le nucléoplasme (Pl. 6, fig. b).

Cette évolution conduit à l'édification de la structure complexe du nucléole telle qu'elle se présente lors de l'apparition de la vitello-genèse.

3 - Structure du massif nucléolaire

Le diamètre du nucléole se situe à ce moment aux alentours de 5 μ , soit environ la moitié de celui du noyau.

La morphologie du nucléole se caractérise par la présence d'un réseau de formations lamellaires reliant entre eux deux catégories d'éléments : les premiers de structure granulaire ont un aspect spongieux, les seconds, beaucoup plus homogènes, sont de nature fibrillaire.

Pour faciliter la description du nucléole, au cours de son évolution, nous adopterons le terme de massif pour désigner les éléments volumineux et arrondis de structure granulaire. Le terme de bloc sera réservé aux masses plus compactes de nature fibrillaire. Les travées du réseau seront désignées sous le nom de lames par suite de leur épaisseur constante (environ 130 m μ). L'examen à fort grossissement, permet de préciser la structure fine de ces constituants nucléolaires.

a) Le matériel de structure granulaire (Pl. 7 et Pl. 8)

Les grains ont un diamètre variant entre 150 et 180 Å. Leur contour se détache nettement sur un matériel de structure amorphe et de faible densité qui représente vraisemblablement la matrice protéique. Des fibrilles, d'un diamètre d'environ 50 Å sont parfois dispersées entre les granules.

Dans les massifs, les grains sont disposés le plus souvent en une sorte de réseau, dont l'agencement assez lâche est responsable de l'aspect spongieux de ces éléments lors de l'examen à faible grossissement. Les granules, en dehors des massifs, apparaissent également localisés en certaines zones des lames fibrillaires ; on en observe également de petits groupes insérés entre les fibrilles des blocs nucléolaires (Pl. 8).

Les massifs granulaires ont une position variable. Situés dans certains cas au centre de vacuoles intra-nucléolaires, ils sont localisés le plus souvent dans la zone corticale du nucléole (Pl. 7). Ces derniers éléments sont entourés de nombreuses granulations qui se dispersent en éventail dans le nucléoplasme. D'une taille variant entre 400 et 600 Å, les granulations nucléoplasmiques renferment 3 à 4 granules d'environ 100 Å, englobés dans un matériel dense assez amorphe (Pl. 8 et Pl. 18, fig. a et c).

b) Le matériel de structure fibrillaire

Il est constitué d'une substance fondamentale amorphe de densité électronique élevée. Cette matrice protéique, digérée par la pepsine (0,2 % dans HCl 0,1 N) après inclusion du GMA, renferme des fibrilles d'un diamètre d'environ 50 Å, disposées en certaines zones en un feutrage très dense (Pl. 8). La présence de quelques granules d'un diamètre d'environ 90 à 100 Å paraît correspondre, soit à la section de faisceaux de fibrilles étroitement accolées, soit à des structures intermédiaires entre les fibrilles et les granules de 150 Å.

Une certaine hétérogénéité de densité caractérise le constituant fibrillaire du nucléole. Celui-ci présente un aspect très dense au niveau des lames et dans la zone externe des blocs nucléolaires, par contre, la zone interne de ces derniers est fréquemment occupée par des lacunes bordées par un matériel de plus faible densité.

c) Les vacuoles intra-nucléolaires

Délimitées indifféremment par les constituants fibrillaires ou granulaires, mais toujours en contact, au moins partiellement, avec des éléments fibrillaires, les vacuoles sont disposées en un réseau très circonvoqué à l'intérieur du nucléole. Examiné à faible grossissement, leur matériel présente une densité légèrement inférieure à celui du nucléoplasme (Pl. 7). Il se différencie nettement de ce dernier par l'absence de granulations. L'examen plus détaillé n'apporte que peu de renseignements sur la structure fine des vacuoles qui renferment un matériel diffus d'aspect flocculeux (Pl. 8).

B - EVOLUTION NUCLEOLAIRE AU COURS DE LA VITELLOGENESE

1 - Phase d'accroissement du nucléole

Le nucléole augmente de volume au cours de la vitellogenèse. Cet accroissement semble résulter d'un double processus :

- développement du réseau vacuolaire
- élongation des lames de matériel fibrillaire.

Le nucléole acquiert un aspect extrêmement anastomosé (Pl. 9, fig. a). Les lames d'une longueur d'environ 3 à 4 μ forment un réseau aux mailles lâchement serrées dont les points d'intersection sont occupés par les éléments plus volumineux (massifs granulaires ou blocs fibrillaires).

2 - Dissociation du nucléole

Ce phénomène a été observé le plus souvent dans des ovocytes d'un diamètre moyen de 100 μ ; toutefois, il ne semble pas exister de corrélations strictes entre ce stade de l'évolution nucléolaire et le diamètre ovocytaire.

La dissociation du nucléole résulte de la rupture des lames ; elle n'intéresse tout d'abord qu'une région du complexe nucléolaire (Pl. 9, fig. b) puis s'étend à l'ensemble de ce dernier (Pl. 9, fig. c). On observe alors à l'emplacement initial du nucléole une mosaïque constituée par les massifs granulaires et les blocs fibrillaires ; ces éléments restant associés à des fragments de lames de longueur variée.

Le stade final de cette évolution est observé dans des ovocytes dont le nucléoplasme est rempli par de très nombreux fragments nucléolaires. Les structures lamellaires ont maintenant quasi complètement disparu (Pl. 10, fig. a). Les massifs granulaires sont encore identifiables mais leur taille a regressé considérablement ; d'autre part le contour irrégulier et l'aspect déchiqueté de ces éléments suggèrent qu'ils sont en voie de dissociation.

A ce stade, le nucléoplasme est encombré par une multitude de granulations d'environ 500 Å, rassemblées en majeure partie à proximité de l'enveloppe nucléaire.

Dans certains ovocytes, cette phase de dislocation est suivie d'un bourgeonnement d'éléments granulaires à partir des massifs fibrillaires persistants (Pl. 10, fig. b et c). Ce processus semble cependant limité quant à son importance. Au stade ultime de ce premier cycle de l'évolution nucléolaire, tous les éléments granulaires du nucléole ont disparu ; il ne persiste que des blocs fibrillaires à partir desquels va se reconstituer un appareil nucléolaire complexe.

C - STADE D'ELABORATION DES MUCOPOLYSACCHARIDES

1 - Reconstitution de l'appareil nucléolaire

Cette phase se situe approximativement lors de l'apparition du matériel polysaccharidique dans l'ovocyte, c'est-à-dire vers 140 - 150 μ. A ce moment la densité électronique du nucléoplasme s'accroît. Cette variation se traduit en microscopie photonique par une augmentation de l'affinité tinctoriale du noyau pour les colorants acides et les réactions des protéines.

Le noyau renferme 3 à 4 blocs fibrillaires de grande taille (environ 6 à 8 μ) d'aspect très compact. Ces blocs émettent dans le nucléoplasme à la fois des bourgeons massifs et des lames d'une épaisseur d'environ 1800 Å (Pl. 11, fig. a et b). Le composant granulaire se reconstitue à partir des lames de nature fibrillaire et l'accumulation des granules d'environ 150 Å conduit à l'édification de massifs de forme sphérique.

2 - Structure de l'appareil nucléolaire

L'appareil nucléolaire atteint maintenant sa complexité maximum. Alors que durant la vitellogenèse, il n'existait qu'un unique nucléole très anastomosé, nous observons maintenant la présence de 3 ou 4 systèmes nucléolaires à l'intérieur du noyau. Dans les grandes lignes, chacun de ces ensembles est constitué par deux ou trois massifs granulaires rattachés par un réseau de lames aux blocs de structure fibrillaire (Pl. 11, fig. c). Les massifs granulaires sub-sphériques atteignent un diamètre d'environ 2 à 3 μ (rappelons que la dimension de ces éléments ne dépassait guère 1 μ au cours de la vitellogenèse). Les granules d'environ 150 Å de diamètre sont assez lâchement dispersés dans une matrice de densité peu élevée. Ils ne sont plus disposés en réseau, ce qui confère aux massifs un aspect homogène. Les blocs fibrillaires, par contre, après la réapparition d'un système lacunaire, réacquièrent un aspect semblable à celui de la première phase de l'ovogenèse. Les lames ont une épaisseur constante d'environ 1800 Å. Cette dimension est assez comparable à celle mentionnée antérieurement. La structure des lames et des massifs est représentée par un feutrage de fibrilles d'environ 50 Å de diamètre, difficilement discernable de la matrice dense qui les englobe (Pl. 11, fig. c).

Les nucléoles renferment deux types de cavités (Pl. 12). Les premières résultent vraisemblablement d'intrications du nucléoplasme ; leur densité est analogue à celle de ce dernier. Les secondes sont représentées par des vacuoles de très faible densité électronique. Ces vacuoles entourées en majeure partie par le composant fibrillaire renferment un matériel finement filamenteux de structure très lâche.

3 - Dislocation de l'appareil nucléolaire

Comme après la phase de vitellogenèse, l'achèvement des synthèses de mucopolysaccharides est marqué par l'effondrement de l'édifice nucléolaire complexe que nous venons de décrire. Nous retrouvons un processus de dislocation assez comparable à celui observé lors de la première phase de dissociation. La rupture des lames entraîne la libération des massifs granulaires. Certains de ces éléments acquièrent un aspect déchiqueté et se fragmentent en une poussière de granulations qui envahissent le cytoplasme (Pl. 12).

Le terme ultime de l'évolution nucléolaire sera étudié dans les ovocytes proches de la maturité sexuelle.

D - STADE DE LA MATURATION SEXUELLE

La dislocation du nucléole est suivie d'une migration des massifs granulaires dans la zone corticale du noyau (Pl. 13, fig. a). Au centre de ce dernier, seuls persistent les éléments fibrillaires. Ils sont constitués par des blocs auxquels se rattachent en une disposition rayonnante les lames nucléolaires. Celles-ci se fragmentent à partir de leur extrémité libre en de petits tronçons dont le morcellement se poursuit dans le nucléoplasme (Pl. 13, fig. b).

Les massifs granulaires, proches de l'enveloppe nucléaire, sont fréquemment accolés aux lamelles annelées intra-nucléaires (Pl. 13, fig. a et Pl. 14, fig. a). Comme nous l'avons signalé en microscopie optique leur nombre est extrêmement considérable (de l'ordre de 30 à 40 par section de noyau). Ces éléments, dans les ovocytes dont la maturité n'est pas achevée, présentent encore une structure granulaire assez typique (Pl. 13, fig. a) ; les granules sont toutefois très dispersés au sein d'une matrice de faible densité. Dans les ovocytes plus évolués, les granules ne persistent, en nombre restreint que dans la zone corticale des massifs (Pl. 14, fig. a). Ces granules, dont le diamètre se situe maintenant aux environs de 100 \AA , sont entourés par un matériel dense, de structure finement fibrillaire. Enfin dans d'autres ovocytes, les granules ont complètement disparu. Il ne persiste à leur emplacement qu'un matériel fibrillaire dense (Pl. 14, fig. b).

Certains ovocytes prêts à être fécondés sont dépourvus de massifs dans la zone corticale du noyau. Il semble que l'involution de ces éléments s'effectue selon un processus rapide car il nous a été impossible de suivre, en microscopie électronique, les stades intermédiaires de cette évolution.

III - DISCUSSION

1 - Relations entre les observations réalisées au microscope photonique et au microscope électronique

Dans les ovocytes en phase de prévitellogenèse, la distinction des composants nucléaires en microscopie photonique s'avère délicate par suite de la petite taille et de l'intrication de ces éléments. Au cours

de la vitellogenèse et surtout dans la deuxième phase de l'évolution nucléolaire, les éléments granulaires forment des massifs arrondis de taille assez considérable (1 à 3 μ). Ils se caractérisent alors par une réaction nettement basophile. Le composant fibrillaire montre au contraire une affinité plus nette pour les colorants acides (éosine du Mann-Dominici). Cette propriété est due vraisemblablement à la teneur élevée en protéines de la matrice (six fois plus importante que pour la zone granulaire, HAY, 1968). Ces protéines basiques, d'une nature peut-être différente de celles des histones (BIRNSTEL et al., 1964) pourraient être responsables de la densité électronique élevée de la zone fibrillaire du nucléole (JACOB et SIRLIN, 1964). Une affinité analogue des composants nucléolaires vis à vis des colorants a été signalée par PASTEELS dans son étude de l'amphinucléole des ovocytes de Barnea candida (1965).

2 - Edification du complexe nucléolaire

L'étude de l'ovogenèse nous a permis d'assister à deux reprises à l'édification des structures nucléolaires. La première se situe à la fin de la prophase de méiose, la deuxième, plus tardive, survient après la vitellogenèse. A chaque fois, la reconstitution du nucléole est caractérisée par un double processus : bourgeonnement d'éléments granulaires et développement d'un réseau lamellaire.

a) Bourgeonnement des éléments granulaires

Les granules d'un diamètre variant entre 150 et 180 Å se différencient au sein du matériel fibrillaire. Le plus souvent ils ne forment pas un revêtement continu mais restent localisés, soit en plusieurs petits massifs (Pl. 6, fig. b), soit en une sorte de coiffe accolée au matériel fibrillaire (Pl. 10, fig. b).

De nombreuses observations portant sur divers types cellulaires et résultant de méthodes expérimentales variées montrent que le matériel fibrillaire représente le constituant primordial et fondamental du nucléole :

- Au cours de l'embryogenèse des Batraciens (KARASAKI, 1965) et des Echinodermes (MILLONIG, 1966 et 1968), les nucléoles des cellules de la gastrula ne renferment que des fibrilles ; les granules n'apparaissent que secondairement et se répartissent alors en un cortex périphérique.

- Un choc thermique (une heure à 43° C) entraîne la disparition du matériel granulaire des nucléoles de cellules de Mammifères en culture (SIMARD et BERNHARD, 1967). Lorsque ces dernières sont reportées à 37° C (phase de récupération) on assiste à la reconstitution des éléments granulaires qui forment une coiffe à un pôle du nucléole.

- Les résultats de l'autoradiographie à haute résolution démontrent que l'incorporation des précurseurs d'ARN s'effectue initialement au niveau de la partie fibrillaire (GRANBOULAN et GRANBOULAN, 1965 ; KARASAKI, 1965 et 1968 ; GAUDECKER, 1967). Après chasse du précurseur, le marquage se localise uniquement sur la zone granulaire. Les fibrilles nucléolaires sont donc à l'origine des granules de ribonucléoprotéines de 150 à 200 Å (BERNHARD et GRANBOULAN, 1968) ; cette transformation pourrait s'effectuer par un processus d'enroulement des fibrilles (MARINOZZI et BERNHARD, 1963).

b) Edification du réseau lamellaire

Les descriptions de nucléoles à structure lamellaire sont relativement peu nombreuses dans la littérature. Dans les ovocytes, de tels agencements ont été signalés chez la Chatte (MORATO, 1964) et le Scolopendre (BEAMS et SEKHON, 1968). L'exemple le plus spectaculaire est fourni par les ovocytes du Grillon (FAVARD-SERENO, 1968) ; dans ce cas, l'édification des lames résulte d'un processus de clivage du matériel fibrillaire. Par contre, pour BEAMS et SEKHON les lames, de structure granulaire, se formeraient par l'écoulement en travée du matériel cortical du nucléole, lors de la rotation de ce dernier. Aucun de ces deux processus n'a été constaté lors de notre étude. Il semble que dans les ovocytes de N. pelagica, les lames résultent à la fois d'un bourgeonnement du matériel fibrillaire et d'un étirement de ce dernier consécutif au développement des vacuoles.

c) Signification de l'accroissement du volume nucléolaire

Dans son étude consacrée au nucléole de l'ovocyte de Grillon, FAVARD-SERENO (1968) souligne le fait qu'il semble exister un rapport significatif entre la complexité du nucléole et les besoins de la cellule en ARN ribosomal, que ce soit pour une utilisation immédiate ou pour le stockage. Comme le mentionne par ailleurs cet auteur, il est certain d'autre part que tout accroissement de volume entraîne une augmentation de la surface d'échange entre le nucléole et le nucléoplasme.

L'hypertrophie du nucléole semble avoir une double signification :

- Stockage d'un important matériel ribonucléoprotéique. Cette hypothèse est confirmée par les données autoradiographiques (Chapitre II).

- Augmentation de la surface d'échange en rapport avec le transfert du matériel nucléolaire vers le cytoplasme.

3 - Evolution structurale des constituants nucléolaires au cours de l'ovogenèse

a) Le matériel fibrillaire

Au cours de l'évolution nucléolaire, le constituant fibrillaire ne subit que peu de modifications structurales. Tout au plus peut-on noter que les blocs fibrillaires présentent un aspect beaucoup plus compact et sont pratiquement dépourvus de lacunes dans les phases de quiescence relative du nucléole (absence d'éléments granulaires).

b) Les vacuoles intra-nucléolaires

Les vacuoles renferment, comme les lacunes, un matériel d'aspect fibreux mais beaucoup plus lâchement organisé. En fait, il ne semble pas qu'une distinction cytologique formelle oppose ces deux types d'éléments. Le terme de vacuole a été utilisé essentiellement pour caractériser les espaces intra-nucléolaires de grande taille.

Les vacuoles intra-nucléolaires représentent à ce jour le composant du nucléole dont la signification physiologique demeure la plus mal connue (Conclusions du Symposium International consacré à la structure et aux fonctions du nucléole ; Montévidéo, 1966). Les seuls apports récents à ce problème sont fournis par les travaux de JOHNSON (1969). Dans les cellules du tabac, la présence de vacuoles dans certains nucléoles est corrélative d'une synthèse d'ARN plus élevée. L'actinomycine D entraîne à la fois l'arrêt de ces synthèses et la disparition des vacuoles. JOHNSON pense que la présence de vacuoles pourrait être liée au métabolisme nucléolaire des ARN. Il semble difficile pour l'instant d'émettre à ce sujet une hypothèse en ce qui concerne notre matériel. Nous envisageons de soumettre prochainement des ovocytes de Néréidiens à l'action de l'actinomycine D, pour suivre en particulier les modifications des structures nucléolaires sous l'influence de cette substance.

c) Le matériel granulaire

Au cours de l'ovogenèse, les massifs granulaires se dissocient pour donner naissance à des granulations nucléoplasmiques. Ce processus est particulièrement net lors de la phase de dislocation du nucléole ; à ce moment, tous les éléments granulaires disparaissent. D'autre part, à l'approche de la maturité sexuelle, la migration des massifs granulaires à la périphérie du nucléoplasme s'accompagne de modifications structurales importantes. Ces deux aspects de l'évolution du composant granulaire seront envisagés tour à tour.

- Formations des granulations nucléoplasmiques

L'hypothèse, basée sur des observations morphologiques, d'une dissociation du composant granulaire a pu être étayée chez N. pelagica par une étude autoradiographique à haute résolution (voir chapitre suivant). Lors d'une injection d'uridine ^3H , un marquage important de la zone granulaire du nucléole est constaté après une durée d'incorporation de quatre heures ; à ce moment l'absence de grains d'argent est presque totale dans le nucléoplasme. Par contre, après douze heures d'évolution la radioactivité du nucléoplasme s'accroît fortement ; sa répartition coïncide avec celle des granulations nucléoplasmiques.

D'une façon générale, la forme granulaire du nucléole semble représenter le support morphologique du transport de l'ARN nucléolaire vers le cytoplasme. Sa disparition ou sa dénaturation par la chaleur entraîne un blocage du transfert de l'ARN vers les ribosomes (SIMARD et BERNHARD, 1967). Après action de l'actinomycine D, la ségrégation des constituants du nucléole est suivie de la disparition des éléments granulaires qui migrent dans le cytoplasme (SCHOEFL, 1964). Les nucléoles des cellules d'embryons mutants d'Amphibiens sont agranulaires, or ces cellules ne synthétisent pas de ribosomes (JONES, 1965).

En résumé, la dissociation des massifs granulaires semble être à l'origine de la formation de la majeure partie des granulations nucléoplasmiques. Ces dernières représenteraient le support morphologique d'un transfert d'ARN en direction du cytoplasme.

- Evolution des massifs granulaires à la maturité sexuelle

A l'approche de la maturité, la dislocation du complexe nucléolaire est suivie d'une migration des massifs granulaires dans la zone corticale du noyau. Corrélativement il semble que ces éléments subissent une dégranulation progressive. On constate d'autre part une nette diminution de leur colorabilité par le bleu de toluidine et la pyronine, ce qui indique une baisse notable de la teneur en ARN. Dans ces fragments nucléolaires, seule semble persister en fin d'évolution, la matrice protéique.

Des nucléoles d'une morphologie analogue ont été décrits dans l'oeuf d'Oursin mature par AFZELIUS (1957) qui les désigne sous le terme de "minor nucleoli". MILLONIG (1968) signale que ces éléments ne se colorent plus par le bleu de toluidine mais conservent une structure très dense à l'examen au contraste de phase. De même SZOLLOSI (1965) mentionne la pauvreté en ARN et la richesse en protéines des extrusions nucléolaires du pronuclei de rat dans lesquels la structure granulaire est absente.

La signification de la baisse de la teneur en ARN des nucléoles à la fin de l'ovogenèse n'est pas claire. Il ne semble pas s'agir, cependant, de cas isolés, puisque, outre les Néréidiens et les Echinodermes des observations cytochimiques analogues ont été effectuées chez les Poissons (COWDEN, 1963 ; MALONE et al., 1963). Il est possible que dans les ovocytes matures, cette évolution corresponde à une forme de dégénérescence des fragments nucléolaires. Dans les cellules en autolyse TRUMP et al. (1965) constatent en effet que les granules nucléolaires disparaissent et que seule persiste la matrice protéique.

4 - Signification physiologique du cycle évolutif des nucléoles

Le nucléole de N. pelagica présente un cycle complexe caractérisé à la fin de la vitellogenèse par une phase de dislocation, qui est suivie de la reconstitution d'un nouvel édifice nucléolaire. Deux questions se posent à ce sujet :

- La dissociation du nucléole correspond-t-elle uniquement à une phase de libération massive d'ARN ribosomal

- Existe-t-il une corrélation entre les cycles d'activité nucléolaire et les étapes de l'évolution cytologique de l'ovocyte ?

Au cours de la vitellogenèse nous avons vu que la majeure partie du matériel exporté vers le cytoplasme provient d'un effritement progressif des massifs granulaires. Par contre, lors de la dislocation du nucléole, la disparition des massifs granulaires s'accompagne également de celle des lames fibrillaires et d'une dispersion du contenu des vacuoles. Notre connaissance imparfaite de la nature chimique de ces derniers constituants rend délicate toute interprétation. Il semble cependant plausible de considérer qu'un type particulier d'acides nucléiques ou de protéines puisse être libéré dans le noyau à cette occasion.

A ce moment l'acidophilie et la densité électronique du nucléoplasme augmentent et le matériel des extrusions nucléaires acquiert une structure amorphe. Ces caractères semblent indiquer que, dans le noyau, la teneur en protéines s'élève fortement. D'autre part, le nouvel édifice nucléolaire se reconstitue selon un modèle différent de l'ancien.

La dislocation du nucléole semble donc lié non seulement à une libération de matériel, mais encore à une reconversion structurale du nucléole, en rapport vraisemblablement avec une nouvelle orientation de ses activités métaboliques.

Cette hypothèse s'accorde assez bien avec nos connaissances sur l'activité physiologique de l'ovocyte. Au cours de la phase de vitellogenèse, le cytoplasme se trouve engagé dans d'actives synthèses protéiques. D'autre part, le nombre de ribosomes augmente considérablement ce qui laisse supposer un besoin important en ARN ribosomal.

La seconde étape de l'ovogenèse est orientée par contre dans la synthèse des polysaccharides et s'accompagne, à l'approche de la maturité, d'un enrichissement progressif du cytoplasme en protéines basiques.

Cette évolution s'effectue vraisemblablement sous l'influence d'un contrôle nucléaire. Corrélativement, il est plausible que des informations cytoplasmiques soient émises en direction du noyau. Non seulement de tels échanges ont été démontrés par GURDON et BROWN (1965) mais ces auteurs constatent que le cytoplasme influence l'activité nucléaire en ce qui concerne les synthèses d'ARN ; il régit de ce fait la structure du nucléole.

5 - Le problème de l'ADN intra-nucléolaire

Les travaux biochimiques ont démontré qu'une matrice d'ADN est indispensable à toute synthèse d'ARN. L'actinomycine D en se moulant sur la matrice d'ADN bloque la transcription des grandes molécules d'ARN précurseur (ARN 45 S) et subséquentement celle des molécules d'ARN 32 S et 18 S (PERRY, 1969). D'autre part, il a été démontré que l'inactivation du nucléole entraîne l'arrêt des synthèses d'ARN (PERRY et ERRERA, 1960 ; SIDDEBOTTOM et HARRIS, 1969). Les résultats biochimiques et autoradiographiques permettent de considérer le nucléole comme la source de l'ARN ribosomal (BERNHARD et GRANBOULAN, 1968 ; PERRY, 1969).

Dans les cellules de Mammifères, la localisation de l'ADN intra-nucléolaire ressort d'études ultrastructurales basées sur les digestions enzymatiques (GRANBOULAN et GRANBOULAN, 1964 ; MARINOZZI, 1964). L'autoradiographie à haute résolution montre que les synthèses d'ARN nucléolaire s'effectuent initialement au niveau de la chromatine (GRANBOULAN et GRANBOULAN, 1965). Cette technique complétée par l'utilisation de l'actinomycine (GEUSKENS et BERNHARD, 1966) a permis d'établir que les fibrilles d'ARN nucléolaire associées à la chromatine sont à l'origine des granules de ribonucléoprotéines de 150 à 200 Å, ce qui se trouve résumé par le schéma proposé par BERNHARD et GRANBOULAN (1968)

ADN nucléolaire \longrightarrow zone fibrillaire \longrightarrow zone granulaire

Dans les ovocytes, si l'ADN est morphologiquement décelable dans certaines espèces (Insectes, Batraciens), dans d'autres, comme les Néréidiens, la chromatine, **durant** la phase d'accroissement, ne peut être mise en évidence ni par les réactions cytochimiques habituelles (Feulgen), ni par les observations ultrastructurales. Cette particularité est à rapprocher de ce que l'on observe dans certains Sporozoaires, tels les Grégarines.

Diverses hypothèses ont été proposées à ce sujet ; la plus fréquemment émise repose sur la possibilité d'une dilution extrême de l'ADN dans tout le nucléoplasme (voir RAVEN, 1961). En fait, à la lumière des données métaboliques envisagées précédemment une telle localisation semble peu vraisemblable ; les synthèses d'ARN étant non pas diffuses dans le noyau mais localisées au niveau du nucléole. On est donc amené à envisager l'éventualité d'une intrication structurale tellement étroite entre le matériel

nucléolaire et l'ADN que celui-ci en deviendrait indétectable par les méthodes d'observations électroniques usuelles.

Dans les ovocytes d'Amphibiens, les micro-nucléoles situés dans la zone corticale du noyau sont constitués d'une zone centrale fibrillaire entourée par un cortex granulaire. Ces nucléoles incorporent activement les précurseurs d'ARN (MAC GREGOR, 1967 ; LANE, 1967). Or l'utilisation à l'échelle ultrastructurale, de la ADNase (MILLER, 1965 ; MAC GREGOR, 1968 ; VAN GANSEN et SCHRAM, 1968), et la détection de l'ADN par l'actinomycine tritiée (EBSTEIN, 1969) ont permis de montrer que le centre de ces nucléoles renferme une quantité notable d'ADN au contact duquel s'effectuent les transcriptions d'ARN.

Nous avons utilisé en ce qui concerne notre matériel une technique, qui basée sur l'action d'agents chélateurs, donne une coloration préférentielle à certaines structures cellulaires (PALEKAR et BERNHARD, 1968 ; BERNHARD, 1969). En particulier, un contraste élevé caractérise le matériel riche en ARN tandis que les desoxyribonucléoprotéines perdent fortement leur coloration. Les micrographies de la planche 15, fig. a et b montrent que les massifs granulaires sont fortement colorés. Par contre, on constate une diminution très nette de la densité électronique des blocs et des lames de structure fibrillaire, ce qui semble indiquer la présence d'une quantité notable d'ADN à leur niveau. Une telle localisation de la chromatine serait pleinement en accord avec les données précédemment exposées concernant le métabolisme nucléolaire.

BERNHARD (1969) insiste cependant sur le fait que cette coloration est préférentielle, mais non entièrement spécifique. Nos résultats basés sur cette technique doivent donc être considérés comme une étape préliminaire dans la détection des ADN intra-nucléolaires. Nous envisageons dans un proche avenir d'approfondir ce problème par deux méthodes différentes d'investigation :

- Digestions enzymatiques sur coupes de GMA.
- Détection de l'ADN par l'actinomycine tritiée.

CONCLUSION

Au cours de la phase de grand accroissement de l'ovocyte, le cycle nucléolaire de N. pelagica peut-être décomposé en plusieurs étapes :

- A la fin de la prophase de méiose, au stade diplotène, le nucléole se reconstitue à proximité de l'enveloppe ~~cytotaxaire~~ nucléaire

- Le développement simultané d'un réseau de vacuoles et de lamelles de structure fibrillaire confère rapidement au nucléole un aspect extrêmement anastomosé.

En dehors des lames, le matériel fibrillaire est assemblé en des amas d'aspect compact. Le matériel granulaire, bien séparé du constituant fibrillaire est groupé en des massifs de forme arrondie.

- Vers la fin de la vitellogenèse, la fragmentation des lames du réseau entraîne la dislocation du complexe nucléolaire. Les massifs granulaires se dissocient et finalement tout le matériel granulaire disparaît.

- A partir du matériel fibrillaire persistant se reconstitue alors par bourgeonnement un ensemble nucléolaire dans lequel on retrouve une structure en réseau et la ségrégation des composants granulaire et fibrillaire. Cette morphologie du nucléole persiste durant la phase d'élaboration des mucopolysaccharides.

- La dislocation finale de l'édifice nucléolaire survient à l'approche de la maturation sexuelle. Dans l'oeuf mature, il ne persiste au centre du nucléoplasme que des formations de structure fibrillaire d'aspect étoilé. Accolés à l'enveloppe nucléaire, sont répartis de très nombreux éléments sphériques, vestiges des massifs granulaires, mais qui ne renferment plus qu'un nombre réduit de granules.

- L'hypertrophie du nucléole est envisagée en fonction du rôle joué par cet organite dans les synthèses d'ARN ribosomal. La dissociation progressive des composants granulaires représenterait la forme de libération de ces ribonucléoprotéines avant leur transport vers le cytoplasme.

- Les relations entre les remaniements structuraux du nucléole et l'activité physiologique du cytoplasme (arrêt de la vitellogenèse, élaboration des mucopolysaccharides) sont discutées, de même que les sites éventuels de la localisation de l'ADN au niveau du nucléole.

CHAPITRE V

EVOLUTION DES EXTRUSIONS NUCLEAIRES DANS LE CYTOPLASME

Les données autoradiographiques sur l'activité métabolique du nucléole, de même que l'étude ultrastructurale de ce dernier suggèrent l'existence d'importants échanges nucléocytoplasmiques.

L'examen morphologique couplé à l'autoradiographie à haute résolution a permis de suivre dans le cytoplasme le rejet d'extrusions nucléaires visualisées sous la forme d'agrégats fibrillo-granulaires de densité électronique élevée.

Ce processus sera étudié chez N. pelagica au cours des stades où les échanges sont les plus actifs (prévitellogenèse et vitellogenèse). Nous envisagerons ensuite plus succinctement la phase finale de l'ovogenèse et nous établirons une brève comparaison avec les phénomènes observés au cours de l'ovogenèse de N. diversicolor et P. cultrifera.

I - OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES

A - Nereis pelagica

1 - Période de prévitellogenèse et de vitellogenèse

a) Formation des agrégats cytoplasmiques

L'étude du nucléole nous a montré que la zone externe des massifs granulaires apparaît fréquemment entourée par de nombreuses granulations dispersées en éventail dans le nucléoplasme. Ces granulations sensiblement sphériques ont une taille variant entre 400 et 600 Å. Elles renferment trois à quatre granules d'environ 100 Å englobés dans un matériel dense assez amorphe (Pl. 16, fig. a et Pl. 17, fig. a). Dans certains cas, les massifs granulaires semblent se disloquer en des fragments de taille variée dans lesquels la structure granulaire typique persiste (Pl. 21, fig. c).

Les particules nucléaires tendent à s'accumuler dans la zone marginale du nucléoplasme, parfois sous forme d'agglomérats. Toutefois, nous

n'en n'avons jamais observé en relation étroite ni en contiguité avec les pores de l'enveloppe nucléaire.

Lors des phases d'extrusion nucléolaire, les pores renferment un contenu de structure finement fibrillaire, d'une densité inférieure à celle du nucléole et des granulations nucléoplasmiques (Pl. 16, fig. b et c et Pl. 17, fig. c). Ce matériel s'épanche dans le cytoplasme en de petits massifs d'aspect diffus, légèrement plus denses que le contenu des pores. Il se prolonge parfois en des travées grossièrement cylindriques orientées perpendiculairement à l'enveloppe nucléaire (Pl. 16, fig. a et Pl. 17, fig. a).

D'une façon générale, dans les ovocytes examinés la bande de cytoplasme qui entoure le noyau sur une largeur d'environ 2 μ renferme un abondant matériel fibreux, d'aspect floconneux dispersé entre le réticulum endoplasmique et les ribosomes libres (Pl. 16, fig. b et Pl. 17, fig. a).

Les agrégats cytoplasmiques situés à proximité de l'enveloppe nucléaire ont une forme arrondie et atteignent une taille de 0,5 à 1 μ . Par suite de leur densité élevée, ils tranchent nettement sur le cytoplasme environnant (Pl. 16, fig. a et Pl. 17, fig. a et b). Ces éléments en formation ne sont jamais accolés directement à l'enveloppe nucléaire, mais en sont éloignés d'une distance minimale d'environ 1 μ . Ils apparaissent entourés par le matériel fibreux exsudé par les pores nucléaires. Examiné à plus fort grossissement, celui-ci semble se connecter avec les agrégats par l'intermédiaire de minces filaments (Pl. 17, fig. b).

Les agrégats sont constitués par un feutrage dense de fibrilles entourant de fins granules d'un diamètre d'environ 30 Å (Pl. 17, fig. b). Ces granules semblent constituer, dans les ovocytes les plus jeunes, les sous-unités d'éléments granulaires plus importants, d'une taille proche de celle des ribosomes. Après flottage des coupes sur tampon de Mc Ilvaine, selon la technique de PALEKAR et BERNHARD (1968), BERNHARD (1969), les agrégats présentent un vif contraste, supérieur à celui des ribosomes et analogue à celui des formations nucléaires (Pl. 21, fig. d). Par contre, la digestion par la pepsine de coupes ultrafines d'ovocytes inclus en épon n'entraîne, après oxydation préalable par l'acide periodique (MONNERON et BERNHARD, 1966), aucune altération morphologique au niveau des extrusions nucléaires alors que les lobules vitellins, riches en protéines, sont entièrement digérés. Il semble donc que les agrégats cytoplasmiques soient constitués essentiellement par des ribonucléoprotéines.

Dans les ovocytes en fin de prophase méiotique, outre les extrusions nucléaires précédemment décrites, des granulations, d'une structure analogue aux éléments nucléoplasmiques, apparaissent disposées en quinconce au milieu d'un réseau de réticulum endoplasmique. Cette association se désagrège rapidement et sa signification, encore énigmatique, pourrait être celle d'un noyau vitellin (Pl. 18, fig. b).

b) Evolution des agrégats cytoplasmiques

Après l'apparition de la vitellogenèse, les agrégats persistent dans le cytoplasme jusqu'à un stade ovocytaire d'environ 80 μ . Dans de tels ovocytes, la micrographie de la Pl. 19, fig. c, montre que la taille de ces organites cytoplasmiques semble s'accroître en fonction de leur éloignement de la zone nucléaire ; corrélativement leur densité électronique paraît régresser.

Ces éléments, d'une densité inférieure à celle des ribosomes, sont disséminés dans tout le cytoplasme et apparaissent fréquemment dans la zone ovocytaire corticale. Certains sont entourés par des mitochondries, contrairement aux agrégats en formation qui ne montrent jamais de telles associations.

L'évolution des agrégats cytoplasmiques semble se traduire par une dissociation du réseau fibrillaire (Pl. 19, fig. a et b). Celui-ci apparaît de plus en plus lâchement organisé dans les éléments en voie de régression. En même temps, les particules granulaires s'estompent et finissent par disparaître complètement.

A la périphérie de tels éléments, les ribosomes sont beaucoup moins abondants que dans le reste du cytoplasme. Dans cette zone un abondant matériel d'aspect amorphe semble se disperser à partir des agrégats suivant une disposition radiaire (Pl. 19, fig. a). L'examen à fort grossissement de ce matériel permet d'y déceler la présence de fines fibrilles entre lesquelles apparaissent des petites particules d'aspect fibrillo-granulaire, dont le diamètre, assez variable, se situe le plus souvent aux environs de 90 Å (Pl. 19, fig. b).

2 - Phase d'élaboration des mucopolysaccharides et maturation ovocytaire

La présence d'extrusions nucléaires est très rarement observée au cours de la phase active des synthèses mucopolysaccharidiques du cytoplasme.

Dans les ovocytes submatures, lorsque survient la dislocation ultime du complexe nucléolaire, des amas considérables de granulations nucléoplasmiques envahissent la zone corticale du noyau. On constate alors l'apparition d'agrégats cytoplasmiques d'une taille n'excédant pas 0,5 μ . Ces éléments, beaucoup plus rares qu'au cours de la vitellogenèse, restent localisés à proximité de l'enveloppe nucléaire. Ils se caractérisent par l'aspect amorphe de leur matériel, qui rapidement semble se dissocier et se disséminer entre les ribosomes du cytoplasme.

B - P. CULTRIFERA ET N. DIVERSICOLOR

Chez P. cultrifera, les agrégats cytoplasmiques d'une structure analogue à ceux des ovocytes de N. pelagica atteignent une taille nettement plus considérable (de l'ordre de 2 à 3 μ). Les extrusions nucléaires se prolongent durant la première partie de la vitellogenèse (ovocytes d'un diamètre variant entre 40 et 80 μ) et sont particulièrement abondantes, dans les échantillons récoltés en été. Initialement situés à proximité de l'enveloppe nucléaire, ces agrégats semblent ensuite migrer vers la zone corticale du cytoplasme. Ils paraissent alors se dissocier suivant le processus décrit précédemment.

Chez N. diversicolor, l'importance des extrusions est assez restreinte. La présence de ces éléments dont la taille ne dépasse guère 0,8 μ , n'a pas été constatée au delà du stade d'apparition de la vitellogenèse.

II - RESULTATS AUTORADIOGRAPHIQUES

Cette étude a été effectuée chez N. pelagica au stade de l'ovogenèse où les échanges nucléo-cytoplasmiques sont les plus actifs (période de prévitellogenèse et de vitellogenèse).

Après avoir reçu une injection unique de 100 μ Ci/g uridine 3 H,

(Uridine ^3H -5 ; 18,5 Ci/mM) les animaux ont été fixés après des temps d'incorporation de 4, 12 et 60 heures.

a) 4 heures après l'injection

Le marquage est localisé en majeure partie au niveau des massifs granulaires du nucléole (Pl. 20, fig. a). Le nucléoplasme n'apparaît que très faiblement marqué. Le cytoplasme ne présente qu'une radioactivité quasi-nulle, peu différente de celle du bruit de fond de la préparation (environ 0,1 grain par μ^2).

Par suite de la défection de la série expérimentale portant sur les temps d'incorporation de très faible durée (1 heure), il ne nous est pas possible de préciser la zone du nucléole où apparaît initialement le marquage.

b) 12 heures d'incorporation

Dans la plupart des ovocytes examinés le marquage reste élevé au niveau du constituant granulaire du nucléole, sauf dans le cas de certains jeunes ovocytes en phase de prévitellogenèse où il diminue légèrement (Pl. 20, fig. b).

Une radioactivité importante est observée au niveau du nucléoplasme. Sa répartition semble coïncider avec celle des granulations nucléaires ; comme ces dernières, elle apparaît localisée essentiellement dans la zone marginale du noyau (Pl. 21, fig. a et b). Des grains d'argent sont fréquemment observés au niveau de l'enveloppe nucléaire (Pl. 21, fig. b), leur taille cependant ne permet pas d'établir avec certitude une relation avec les pores nucléaires.

Contrairement au noyau, le cytoplasme ne présente qu'un marquage très faible (Tableau 7). Les grains d'argent présents à ce niveau sont situés en majeure partie à proximité immédiate de l'enveloppe nucléaire ; les autres, beaucoup moins nombreux, sont disséminés dans l'ensemble de l'ooplasme, en particulier au niveau des mitochondries. Le taux d'incorporation des agrégats cytoplasmiques est très faible (Pl. 21, fig. a et b) ; il est sensiblement analogue à celui du cytoplasme environnant.

Dans le cas de quelques ovocytes, un marquage a été constaté dans la zone corticale du cytoplasme à proximité du chorion ovocytaire.

Temps d'incorporation	Nucléoplasme	Cytoplasme	Lobules de vitellus et de lipides
12 heures	$7,3 \pm 3,2$	$1,7 \pm 0,9$	$0,2 \pm 0,01$
60 heures	$9,7 \pm 6,7$	$12,9 \pm 4,6$	$0,5 \pm 0,02$

Tableau 7 - Concentration de la radioactivité dans les différentes zones de l'ovocyte en fonction du temps d'incorporation * (exprimée en nombre de grains d'argent pour $10 \mu^2$).

* Le dénombrement des grains a été effectué sur des sections de 12 ovocytes. Les surfaces mesurées s'étendent de part et d'autre de l'enveloppe nucléaire, respectivement sur une largeur de 3μ pour le nucléoplasme et de 6μ pour le cytoplasme.

c) 60 heures d'incorporation

L'intensité du marquage reste élevée dans le nucléoplasme proche de l'enveloppe nucléaire, de même qu'au niveau de cette dernière (Pl. 22, fig. b et c).

Le taux de la radioactivité s'élève considérablement dans le cytoplasme par rapport au temps d'incorporation précédent (Tableau 7). Il est particulièrement important dans une zone périnucléaire d'une largeur d'environ 2μ . Les agrégats cytoplasmiques présentent un marquage très net (Pl. 22, fig. a, b et c). Si l'on délimite ces éléments par un tracé englobant à leur périphérie une auréole cytoplasmique d'environ $0,2 \mu$, soit sensiblement la taille d'un grain d'argent, la radioactivité par μ^2 de surface apparaît à leur niveau en moyenne 5 fois plus élevée ($4,5 \text{ grains}/\mu^2$) que dans le cytoplasme environnant ($0,9 \text{ grains}/\mu^2$). Les grains d'argent sont généralement plus nombreux à la périphérie des agrégats que dans leur zone centrale.

Dans le reste du cytoplasme un marquage assez diffus est constaté au niveau des ribosomes libres et des agrégats de faible densité localisés dans la zone corticale. Le taux de radioactivité de ces derniers éléments

reste toutefois très inférieur à celui des extrusions à proximité de l'enveloppe nucléaire. Le marquage des inclusions lipidiques et protéiques est quasi nul (environ $0,05 \text{ grain}/\mu^2$).

III- DISCUSSION

La présence d'agrégats cytoplasmiques de nature granulaire ou fibrillaire a été signalée de façon quasi constante dans les ovocytes jeunes en phase de vitellogenèse (CLEROT, 1968 ; FAVARD-SERENO, 1969 ; GRESSON et THREAGOLD, 1968 ; MILLONIG et al., 1968 ; SCHARRER et WURZELMANN, 1969). Des formations analogues ont également été observées dans les cellules peu différenciées à caractère embryonnaire (LE MOIGNE, 1966 et 1967 ; MORITA et al., 1969 ; SAUZIN, 1968).

L'apparition de ces formations pose plusieurs problèmes. En premier lieu, celui du passage du matériel nucléolaire au niveau de l'enveloppe nucléaire. Deuxièmement, celui de l'évolution de ces extrusions au sein du cytoplasme.

1 - Passage du matériel nucléaire dans le cytoplasme

Chez les Néréidiens, le contenu des pores nucléaires présente un aspect finement fibrillaire de densité assez faible. Cette structure semble la plus couramment observée, dans de nombreuses espèces, lors des échanges nucléo-cytoplasmiques. Cependant un passage sous une forme fibrillo-granulaire a été décrit chez les Poissons (ZAND et PORTE, 1966 ; SCHARRER et WURZELMANN, 1969) et les Batraciens (HAY, 1968).

Morphologiquement, le matériel observé au niveau des pores diffère profondément de celui du nucléoplasme à prédominance granulaire. Il semble qu'une différenciation s'effectue à proximité immédiate de l'enveloppe nucléaire ou des pores, vraisemblablement sous l'action de facteurs spécifiques. Ces petites sous-unités seraient alors capables, comme l'ont suggéré KOPAK et MATEYKO (1964) de migrer à travers les pores, tandis que les granules de la dimension des ribosomes en seraient empêchés (BERNHARD, 1959). Cependant des transferts de matériel sous une forme granulaire ont été observés chez les Amphibiens (LANÈ, 1966). Par ailleurs, STEVENS et SWIFT (1966) ont décrit, dans les glandes salivaires de Chironome, le passage au niveau des pores de granules de ribonucléoprotéines dont le diamètre se situe entre 150 et 200 Å.

TASHIRO et al. (1968) ont observé, dans les cellules séricigènes du Bombyx mori qu'une libération massive de matériel nucléaire dans le cytoplasme pouvait s'accompagner d'une rupture momentanée de l'enveloppe nucléaire. Des processus comparables d'extrusions nucléolaires, réalisés par une hernie suivie de rupture de l'enveloppe nucléaire ont été décrits dans les ovocytes de Thyone (KESSEL, 1964b-1966b) dans le pronucleus de l'oeuf de rat (SOTELO et PORTER, 1959 ; SZOLLOSI, 1965) et dans les blastocytes du lapin (HADEK et SWIFT, 1962).

Un autre processus intervenant lors des échanges pourrait être représenté par la libération dans le cytoplasme de vésicules issues d'un bourgeonnement de l'enveloppe nucléaire (voir KESSEL, 1966c). Selon SCHARRER et WURZELMANN (1969), ces vésicules permettraient le transfert de particules d'une dimension supérieure à 150 Å.

Peu d'hypothèses ont été émises au sujet des facteurs induisant l'agglomération dans le cytoplasme du matériel d'origine nucléaire. Dans certains ovocytes, tels ceux de Ciona (KESSEL, 1966c) ou de Rana (CIEROT, 1968), la grande quantité de matériel extrudé peut expliquer son accumulation à proximité de l'enveloppe nucléaire. KOULISH (1965), chez les Trématodes, invoque la présence d'un important système lamellaire qui tendrait à délimiter ces formations.

Dans le cadre de notre étude, nous n'avons jamais observé d'agrégats importants dans le cytoplasme contigu à l'enveloppe nucléaire. Par contre, on décèle dans cette zone, la dispersion d'un abondant matériel fibrillaire. Celui-ci pourrait être lié à la formation et à l'accroissement des agrégats, toutefois les facteurs induisant la condensation de ce matériel au sein du cytoplasme restent complètement inconnus.

2 - Structure et nature chimique des agrégats cytoplasmiques

La structure des agrégats cytoplasmiques apparaît assez variable suivant les espèces examinées. Dans les ovocytes de Trématodes (KOULISH, 1965) et du Grillon (FAVARD-SERENO, 1969) leur morphologie et leur structure fine miment celles du nucléole d'où le nom de "pseudo-nucléole" ou "nucleus like cytoplasmic bodies" décerné à ces formations.

Le plus souvent les agglomérats cytoplasmiques forment des masses sensiblement sphériques, situées à proximité de l'enveloppe nucléaire. Ils peuvent être constitués de particules identiques aux ribosomes (IZQUIERDO

et VIAL, 1962 ; KESSEL et BEAMS, 1963 ; FAVARD-SERENO, 1968) ou d'agrégats de fibres (SZOLLOSI, 1965). Dans les ovocytes d'Arbacia et de Paracentrotus, MILLONIG et al. (1968) distinguent deux catégories d'agrégats cytoplasmiques, les uns formés par des fibrilles d'environ 80 Å, les autres par des granules de 300 à 400 Å. Des particules de cette dimension ont été rarement signalées, à ce sujet, dans la littérature ; par contre, les associations fibrillo-granulaires semblent fréquentes. Dans ce cas, les granules sont généralement d'une taille très inférieure à celle des ribosomes (MORITA et al., 1969). Cette structure est assez proche de celle observée dans le cadre de notre étude. Toutefois, il convient de noter que l'aspect granulaire peut être dû à des sections de fibrilles étroitement accolées, ce qui oblige à une certaine réserve dans l'interprétation.

La nature cytochimique des agrégats cytoplasmiques a surtout été envisagée à l'échelle de la microscopie optique. La basophilie de ces éléments et leur sensibilité à l'ARNase semblent indiquer, dans beaucoup d'espèces, une teneur élevée en ribonucléoprotéines (GRESSON et THREAGOLD, 1962 ; ANDERSON, 1964 ; KESSEL, 1966c ; ALLEN et CAVE, 1968). En microscopie électronique, par digestions enzymatiques, STEVENS et SWIFT (1966) ont abouti à des conclusions similaires en ce qui concerne les extrusions nucléaires des glandes salivaires de Chironome.

Chez les Néréidiens, la coloration du cytoplasme par la pyronine ou le bleu de toluidine à pH 4,6 disparaît après traitement préalable par la ribonucléase. En microscopie électronique les agrégats cytoplasmique de N. pelagica se colorent fortement par la technique de PALEKAR et BERNHARD (1968). La digestion par la pepsine de coupes ultrafines d'épon après oxydation par l'acide périodique (MONNERON et BERNHARD, 1966) n'entraîne aucune altération morphologique au niveau des extrusions nucléaires. Il semble donc que les agrégats cytoplasmiques soient constitués essentiellement par des ribonucléoprotéines.

CLEROT (1968) a démontré récemment, par digestion à la pronase et à la pepsine de coupes de GMA, la nature protéique des extrusions nucléaires des ovocytes et spermatocytes de grenouille. Il n'exclut pas, cependant, la possibilité d'une certaine teneur en ARN de ce matériel, dont la structure diffère par ailleurs profondément de celle observée dans les jeunes ovocytes de Néréidiens.

Au cours de la maturation ovocytaire de N. pelagica les extrusions

nucléaires se caractérisent par l'aspect amorphe de leur matériel. La cytochimie ultrastructurale de ces éléments n'a pas été établie, cependant les données de la microscopie optique permettent d'envisager une teneur relativement élevée de ces éléments en protéines.

3 - Evolution des extrusions nucléaires dans le cytoplasme

Dans la majorité des espèces, les agrégats cytoplasmiques disparaissent précocement, le plus souvent lors de l'apparition du vitellus. L'hypothèse de leur transformation progressive en ribosomes a été assez fréquemment émise. Les arguments sont basés sur l'accroissement de la basophilie du cytoplasme à ce stade et l'augmentation brutale du nombre de ribosomes. Dans les ovocytes d'oursins, VERHEY et MOYER (1967) ont estimé que cette augmentation est de l'ordre de 100 fois, tandis que par des méthodes différentes MILLONIG et al. (1968) la situent entre 4000 et 6000.

Peut-être par suite de la rapidité du processus, peu d'observations morphologiques ont permis d'illustrer l'évolution des agrégats cytoplasmiques. KESSEL (1966 a et b) chez Ciona et Thyone constate que la réduction de taille de ces éléments est liée à une association plus lâche et à une fragmentation des composants granulaires.

Dans les ovocytes de N. pelagica, les agrégats cytoplasmiques présentent de profondes variations morphologiques suivant leur taille et leur situation dans le cytoplasme. Il semble exister un cycle évolutif reliant les petits éléments denses, proches de l'enveloppe nucléaire, aux agglomérats de grande taille et de faible densité disséminés dans le cytoplasme. Ces derniers éléments sont fréquemment entourés d'une auréole de matériel fibrillaire dans lequel apparaissent disséminés des ribosomes. De tels aspects, particulièrement fréquents dans les ovocytes les plus âgés, correspondent peut-être à une phase d'involution des agglomérats. La désintégration structurale se traduirait alors par une texture plus lâche et pourrait être accompagnée de la libération dans le cytoplasme d'un matériel fibreux riche en ARN. Chez Xenopus (THOMAS, 1968), l'ARN du cytoplasme des jeunes ovocytes est représenté uniquement par des fibrilles et des granules d'environ 10 à 20 Å. Les particules ribosomales d'environ 200 Å n'apparaissent qu'au début de la vitellogenèse. Cette évolution structurale suggère que l'édification des ribosomes pourrait se faire dans le cytoplasme à partir du matériel fibrillaire.

Ces données sont peut-être à rapprocher de certaines de nos observations montrant la présence de particules d'un diamètre moyen de 90 \AA dans le matériel fibrillaire entourant les agrégats en phase d'involution. Ces particules représentent peut-être une étape intermédiaire de la différenciation des ribosomes.

4 - Etude cinétique des transferts de matériel nucléaire

Après 12 heures d'incorporation d'uridine ^3H , la radioactivité ovocytaire reste localisée en quasi-totalité au niveau du noyau. Un marquage important est constaté au niveau des granulations nucléoplasmiques issues du constituant granulaire du nucléole. La relation entre ces éléments a été discutée dans le chapitre précédent.

La lenteur de l'apparition d'un taux notable de radioactivité au niveau du cytoplasme constitue un fait marquant de l'étude autoradiographique. Il semble que l'enveloppe nucléaire constitue une sorte de barrière s'opposant à la diffusion rapide des substances synthétisées dans le noyau. Des constatations analogues ont été effectuées dans de nombreux ovocytes d'Invertébrés à la suite d'études autoradiographiques en microscopie optique (GEUSKENS, 1963 ; TWEDELL, 1966 ; ALLEN, 1967). Ce décalage de l'apparition du marquage cytoplasmique par rapport à celui du noyau est peut-être lié à la différenciation structurale subie par le matériel nucléaire lors de son passage au niveau des pores.

Pour des temps d'incorporation de longue durée (60 heures) la radioactivité du cytoplasme s'élève considérablement, surtout dans une zone s'étendant sur une largeur d'environ 2μ autour du noyau. Le marquage est particulièrement intense au niveau des agrégats cytoplasmiques. L'estimation de la radioactivité par la méthode du comptage des grains montre que celle-ci est en moyenne 5 fois plus élevée à leur niveau que dans le cytoplasme environnant (Tableau 7). Si l'on envisage le fait, que dans cette région du cytoplasme, une partie du matériel d'origine nucléaire se trouve dispersée en un réseau diffus, ce rapport paraît significatif. Il semble indiquer que les agrégats constituent des zones de condensation de l'ARN nucléaire.

Nous avons observé par ailleurs que le nombre de grains d'argent est en général plus élevé à la périphérie des extrusions nucléaires que dans leur zone centrale. Cette disposition semble indiquer que l'accroissement de

ces éléments pourrait s'effectuer par l'adjonction progressive d'un matériel visualisé morphologiquement sous l'aspect de fines fibrilles.

CONCLUSION

Dans les ovocytes de Néréidiens le métabolisme nucléolaire est particulièrement actif comme l'ont montré les résultats de l'autoradiographie au microscope optique.

La majeure partie de l'ARN synthétisé au niveau du nucléole est vraisemblablement de nature ribosomale si l'on se réfère aux études biochimiques effectuées chez les Annélides (GOULD-SOMERO et SCHRÖEDER, 1969).

La dissociation du nucléole en granulations nucléoplasmiques semble donc liée à un processus de libération des ribonucléoprotéines destinées à être exportées vers le cytoplasme. Ce transfert est visualisé au niveau des pores de l'enveloppe nucléaire par la présence d'un matériel de structure fibrillaire. Dans le cytoplasme, les extrusions nucléaires se condensent sous forme d'agrégats cytoplasmiques, dont la cytochimie ultrastructurale révèle la teneur élevée en RNP.

L'étude cinétique de ce transfert a pu être suivie en autoradiographie à haute résolution après injection d'uridine ^3H . Le marquage localisé initialement au niveau du nucléole, près du nucléoplasme n'apparaît que tardivement dans les agrégats cytoplasmiques. Le taux de radioactivité de ces éléments est alors 5 fois plus élevé que celui du cytoplasme environnant.

Les agrégats cytoplasmiques migrent ensuite dans la zone corticale du cytoplasme. Ils semblent se dissocier en un matériel fibrillaire dans lequel apparaissent des granulations de petite taille (80 à 100 Å). Ces particules représentent peut-être un stade intermédiaire de la formation des ribosomes cytoplasmiques ; le nombre de ces derniers augmente en effet considérablement durant cette période de l'ovogenèse.

CHAPITRE VI

LES PROCESSUS DE VITELLOGENESE

INTRODUCTION

Selon la définition de RAVEN (1961), le vitellus ou deutoplasme constitue une réserve de substances nutritives utilisées par l'embryon au début de sa croissance. Au cours de l'ovogenèse des Néréidiens, le cytoplasme renferme trois catégories d'inclusions de nature cytochimique différente : lipides, protéines, polysaccharides.

Les polysaccharides sont représentés en majeure partie par les mucopolysaccharides qui constituent les alvéoles corticaux. Ces éléments, dont le mode de formation sera étudié au chapitre suivant sont rejetés en dehors de l'oeuf lors de la fécondation. Ils ne constituent donc pas des substances de réserves et le terme de vitellus ne peut leur être appliqué.

Les données fournies par la microscopie électronique sont assez décevantes, d'une façon générale en ce qui concerne les processus de formation des lipides. Le problème du vitellus lipidique pour cette raison ne sera abordé que brièvement. Notre étude sera centrée essentiellement sur la vitellogénèse protéique. En fait le terme de vitellus tend, dans les travaux cytologiques récents, à être employé uniquement pour désigner les réserves protéiques ; c'est dans ce sens que nous l'emploierons usuellement.

I - STRUCTURE DU CYTOPLASME AU COURS DU STADE DE PREVITELLOGENESE

La phase de prévitellogénèse commence immédiatement après la prophase de méiose ; elle coïncide donc avec le début de la phase d'accroissement. Le volume du cytoplasme s'accroît par rapport à celui du noyau. Les ribosomes libres persistent en grand nombre mais leur association en polysomes devient beaucoup plus rare que dans les ovogonies et les ovocytes en prophase méiotique. Les formations de réticulum subissent par contre un accroissement marqué. Elles sont représentées chez N. pelagica par des citernes ergastoplasmiques très allongées, orientées parallèlement à l'enveloppe

nucléaire (Pl. 23). Chez N. diversicolor, le réticulum agranulaire reste l'élément dominant ; de forme irrégulière, le plus souvent sphérique, il apparaît disséminé dans tout le cytoplasme (Pl. 24, fig. a).

L'appareil de Golgi est représenté par quelques dictyosomes de petite taille. Ces derniers, constitués de saccules présentant un aspect dilaté, restent localisés à proximité de l'enveloppe nucléaire. Dans cette zone, on observe la présence de nombreux agrégats cytoplasmiques formés par une extrusion de matériel nucléaire.

II - STADES D'APPARITION DU VITELLUS

Les premiers lobules vitellins sont décelés dans les ovocytes de N. diversicolor quand ceux-ci ont atteint un diamètre d'environ 30 μ ; ils apparaissent un peu plus tardivement dans les ovocytes de N. pelagica et P. cultrifera (40 μ environ).

A ce stade, la structure du cytoplasme ne montre que peu de variations par rapport aux stades précédents : les ribosomes libres persistent toujours en nombre très élevé.

Chez N. diversicolor, les lobules vitellins en formation ont un diamètre d'environ 1 μ . La membrane qui les entoure englobe une matrice dense assez homogène et de nombreuses vésicules (Pl. 24, fig. b ; Pl. 25, fig. a et b). Les dictyosomes restent localisés à proximité de l'enveloppe nucléaire. Ils sont entourés par de nombreuses vésicules élaborées par un processus de bourgeonnement à l'extrémité des saccules. Des vacuoles golgiennes, de taille variable et de contour irrégulier renferment un contenu de même structure que celui des petits lobules vitellins protéiques (Pl. 15, fig. a) ; comme ces derniers les vacuoles paraissent s'accroître par incorporation de vésicules. Le matériel vitellin protéique semble donc résulter d'une différenciation des sécrétions golgiennes (Fig. VI).

En certaines zones du cytoplasme, on observe parfois des accumulations de vésicules non limitées par une membrane (Pl. 24, fig. b). Il est difficile dans ce cas de préciser si ces observations correspondent à la périphérie d'une zone golgienne ou à un site d'élaboration du vitellus.

Chez N. diversicolor, il apparaît en outre à ce stade de petits lobules qui semblent résulter d'une accumulation d'un matériel de faible densité à l'intérieur des citernes du réticulum endoplasmique. La taille de ces lobules peut atteindre environ 0,7 μ ; leur contenu à ce moment est

caractérisé par l'existence d'une zone interne de très faible densité électronique (Pl. 26, fig. c).

La nature cytochimique de ce matériel n'a pu être déterminée avec précision en microscopie optique par suite de la faible dimension et de la dispersion de ces organites. En microscopie électronique, la coloration par le mélange acide chromique phosphotungstique selon RAMBOURG donne une réaction positive dans la zone centrale de ces éléments, ce qui traduirait la présence de glycoprotéines.

Chez N. pelagica, divers organites cytoplasmiques sont caractérisés par une structure multivésiculaire (Pl. 26, fig. a et a'). Les uns d'un diamètre d'environ 300 m μ , renferment un contenu finement granuleux et présentent en section une douzaine de vésicules de 30 à 35 m μ de diamètre. D'autres d'un diamètre de l'ordre de 400 à 500 m μ se signalent par leur densité électronique élevée et la présence d'une ou plusieurs vacuoles claires. La membrane de ces dernières et celle qui limite ces corps denses ont la même épaisseur. Des vésicules d'une trentaine de m μ , d'une densité équivalente à celle de la matrice y sont également décelables.

Ces corps, vraisemblablement d'origine golgienne, présentent ici encore une structure proche de celle des lobules vitellins et pourraient constituer le stade initial de la formation de ces derniers.

III- LA VITELLOGENESE AU COURS DE LA PHASE DE GRAND ACCROISSEMENT

A - ETUDE MORPHOLOGIQUE

Dans ces ovocytes, les ribosomes libres sont toujours, comme dans les stades précédents, extrêmement nombreux. Chez N. diversicolor, les formations de réticulum sont assez abondantes dans la zone corticale du cytoplasme. De forme allongée, elles sont orientées le plus souvent perpendiculairement à l'enveloppe ovocytaire (Pl. 27, fig. a et Pl. 29, fig. a). Le nombre de ribosomes attachés à ces formations membranaires est assez irrégulier ; il est généralement peu élevé. Cette répartition des ribosomes permet de considérer le réticulum ovocytaire comme un type intermédiaire entre le réticulum lisse et l'ergastoplasme.

Chez N. pelagica et P. cultrifera, le réticulum présente les mêmes caractéristiques que chez N. diversicolor, mais son développement est beaucoup plus restreint.

L'appareil de Golgi occupe dans les ovocytes des trois espèces étudiées une position identique (Pl. 27). Il est disposé parallèlement à l'enveloppe ovocytaire, à une distance d'environ 2μ de cette dernière. Il est intéressant de noter que cette distance correspond chez N. diversicolor à la zone du cytoplasme où le réticulum endoplasmique présente son développement maximum. Durant les processus de vitellogenèse, la longueur des dictyosomes se situe aux alentours de 2 à 3μ chez N. pelagica et P. cultrifera ; elle atteint environ 4 à 5μ chez N. diversicolor.

A ce stade, la polarité de l'appareil de Golgi est assez nettement déterminée. Les saccules de la zone externe, ou, selon la terminologie de GRASSE (1957) de la face proximale, présentent un aspect dilaté et renferment un contenu de faible densité. Ces saccules à aspect fenestré sont parfois remplacés par une rangée de vésicules d'un diamètre équivalent. Les saccules de la face distale ou face interne ont un diamètre assez régulier, analogue à celui des saccules de la région moyenne. Le plus souvent la face externe des dictyosomes est située du côté de l'enveloppe ovocytaire ; toutefois, dans un certain nombre de cas, nous avons observé une polarité inversée.

La présence de citernes de réticulum orientées parallèlement aux saccules de la face externe n'a été que très rarement constatée chez N. pelagica et P. cultrifera. Cette disposition est plus fréquente dans les ovocytes de N. diversicolor ; toutefois, contrairement aux observations réalisées dans d'autres types cellulaires, l'élaboration de vésicules par l'ergastoplasme n'a été que très rarement observée.

Les rapports existant entre l'appareil de Golgi et les processus de vitellogenèse sont de deux ordres. Ils impliquent d'une part l'étude de la néoformation des lobules vitellins au cours de l'ovogenèse d'autre part celle de leurs modalités d'accroissement.

1 - Formation des nouveaux lobules de vitellus protéique

Le processus est assez comparable à celui décrit lors de l'apparition des premiers lobules vitellins. Des éléments de petites tailles se différencient à proximité des saccules de la face distale, ils ^{se} caractérisent par l'aspect ondulé de leur membrane et par un contenu de densité moins élevé que celui des lobules vitellins matures (Pl. 27, fig. b et c). Dans certains cas, une relation très nette a pu être établie entre les lobules

vitellins en formation et les saccules golgiens partiellement détachés de l'ensemble du dictyosome (Pl. 27, fig. a). Ces derniers paraissent donc contribuer directement à la formation des nouvelles plaquettes vitellines.

2 - Processus d'accroissement des lobules vitellins

a) Structure et cytochimie des lobules vitellins

Les lobules vitellins, denses aux électrons, sont de forme sphérique ; leur diamètre est d'environ 2 à 3 μ . Ceux dont la croissance est achevée, ont une membrane limitante lisse et la structure du vitellus est assez homogène.

L'ensemble des réactions histochimiques concernant les lobules vitellins de N. diversicolor est résumé dans le tableau 8.

Tableau 8 - Cytochimie des lobules vitellins de N. diversicolor

Réaction	Mise en évidence	Résultat
Millon trichloroacétique	Protéines totales	++
Bleu de Bromophénol	-	++
Tétrazoréaction (Danielli)	Protéines sulfhydrilées	++
FAST GREEN (pH 8,2) (Après T.C.A.)	Protéines basiques	+
Id. sans T.C.A.	Protéines basiques non liées aux Acides nucléiques	+
FAST GREEN (pH 2,2) (acidophilie totale)	Groupements NH ² libres	++
PAS	Polysaccharides	+

Ces résultats indiquent une teneur élevée du vitellus en protéines. Celles-ci renferment également des groupements sulfhydrilés et des fonctions à caractère basique. La réaction du PAS révèle en outre que ces protéines pourraient être associées à des éléments glucidiques.

Le vitellus de N. pelagica et P. cultrifera est également très riche en protéines. Toutefois, la réaction au PAS est variable selon les stades chez P. cultrifera : elle est toujours négative chez N. pelagica. Dans les deux espèces enfin, les réactions des protéines basiques ne sont que très faiblement positives.

Chez N. pelagica, l'étude au microscope électronique a montré que la digestion par la pepsine (0,2 % HCl 0,1 M) sur coupes ultra-fines d'épon, selon la technique de MONNERON et BERNHARD (1966), entraîne la digestion totale des protéines du vitellus (Pl. 26, fig. b).

b) Accroissement des lobules vitellins

La zone corticale des lobules en formation est souvent caractérisée par la présence de vésicules d'un diamètre sensiblement constant (50 m μ) (Pl. 28, fig. a). Chez N. pelagica ces vésicules sont partiellement englobées dans la matrice vitelline ; par contre, chez N. diversicolor, une partie importante du matériel vitellin présente une structure vésiculaire (Pl. 28, fig. b). Les vésicules intervenant dans l'édification du vitellus sont comparables en densité à celles élaborées à l'extrémité des saccules golgiens par un processus de bourgeonnement (Pl. 28, fig. a). Leur diamètre toutefois semble légèrement inférieur à celui des vésicules golgiennes, ce qui pourrait être dû à une condensation dans le cytoplasme du matériel de ces dernières.

La pénétration des vésicules dans les lobules vitellins semble être réalisée selon deux processus (Fig.VI). Dans le premier cas, un bourgeonnement de la membrane vitelline s'établit au contact d'une vésicule cytoplasmique (Pl. 28, fig. d), il est suivi d'une fusion des membranes et d'une incorporation de la vésicule. La matrice vitelline conserve le plus souvent une structure homogène. Dans le deuxième cas, la membrane entourant le lobule vitellin est interrompue en certaines zones (Pl. 28, fig. e), ce qui permet d'expliquer la pénétration directe et sans modification de structure des vésicules cytoplasmiques à l'intérieur du lobule.

Fig. VI - Schéma récapitulatif de l'élaboration du vitellus protéique.

A - Stade d'apparition des lobules vitellins. Différenciation des premiers lobules à partir des vacuoles golgiennes.

B - Morphologie du dictyosome (ovocyte en phase de vitellogenèse)
Les vacuoles golgiennes, libérées par fragmentation des saccules de la face distale (FD) sont à l'origine des lobules vitellins néoformés. (FP : face proximale)

C, D, E - Croissance des lobules vitellins.

Cette croissance est réalisée selon plusieurs processus :

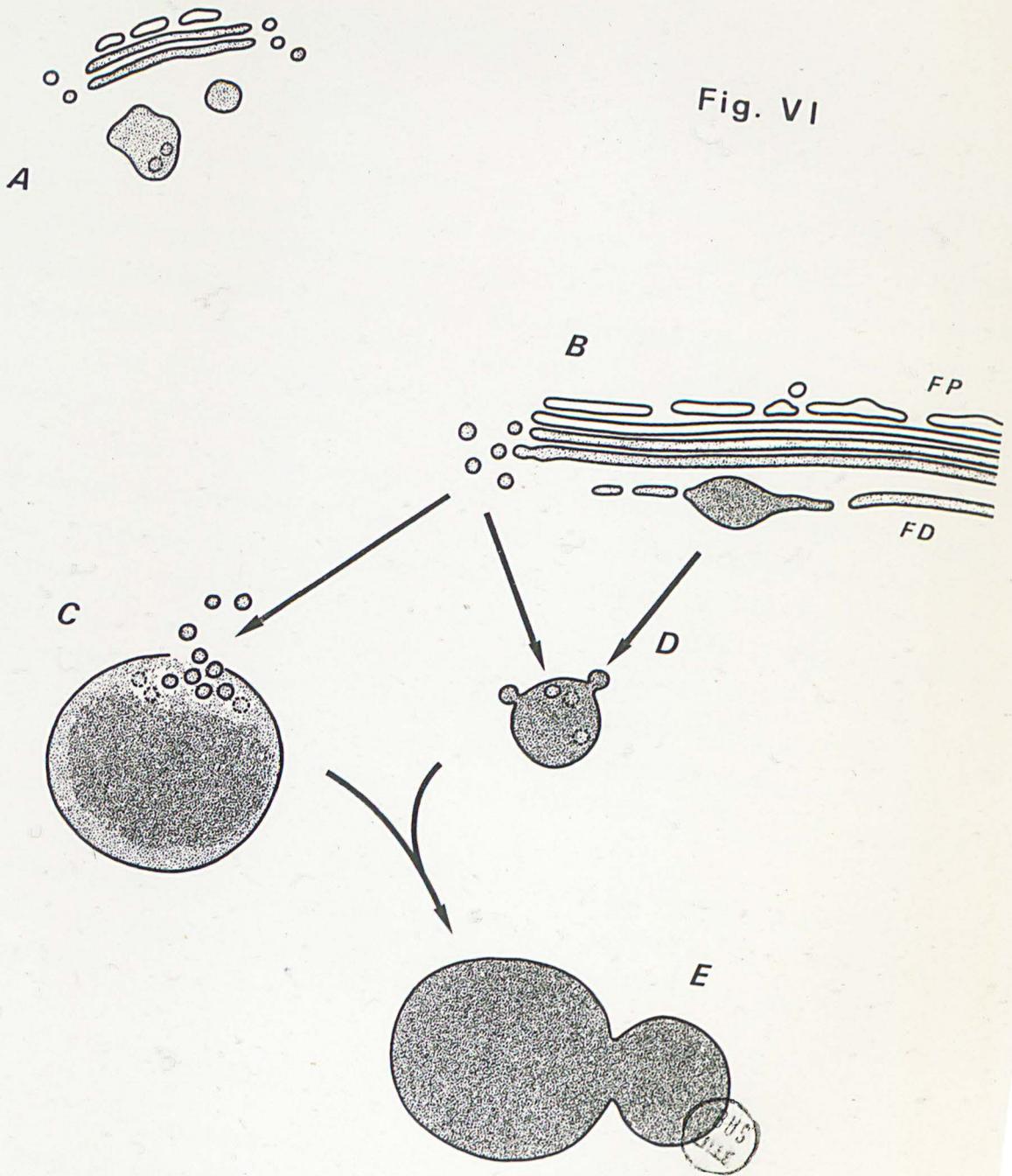
C - Pénétration directe des vésicules golgiennes dans le lobule protéique par une interruption de la paroi.

D - Capture des vésicules par la membrane du lobule vitellin.

E - Fusion des lobules de vitellus.



Fig. VI



Des images suggérant la fusion d'éléments vitellins en croissance ont été assez fréquemment observées (Pl. 28, fig. c). Ce processus semble intervenir pour une part assez importante dans l'accroissement de la taille des lobules vitellins.

B - ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE

1 - Techniques

Cette étude réalisée en microscopie électronique a été effectuée en majeure partie sur des ovocytes de N. diversicolor. Le précurseur utilisé pour l'étude des synthèses protéiques a été la leucine tritiée. Des études préliminaires, effectuées en microscopie optique avaient montré l'incorporation importante de cette substance au niveau des lobules vitellins.

Pour l'étude effectuée en autoradiographie à haute résolution, plusieurs protocoles expérimentaux ont été réalisés :

- pour les temps courts, l'incorporation est effectuée "in vitro" ce qui permet d'augmenter la dose de précurseur. Les ovocytes séjournent pendant 45 minutes dans des salières contenant 200 μC de leucine ^3H (L -leucine ^3H 200 mCi/mM-CEA) par ml. d'eau de mer stérilisée. La fixation est effectuée à la paraformaldéhyde pour éliminer au maximum les acides aminés non incorporés. Elle est suivie d'une post-fixation à l'osmium.

- certains animaux reçoivent par injection intra-coelomique une dose unique de 100 $\mu\text{C/g}$ de leucine ^3H . Ils sont fixés 3, 6, 24 et 48 heures après l'injection.

- dans d'autre cas, après une période d'incorporation de 50 minutes, le précurseur marqué est chassé par une nouvelle injection de leucine non radioactive. Ces vers ont été fixés après une durée totale d'évolution de trois heures.

2 - Résultats

- 45 minutes d'incorporation. Le marquage est localisé essentiellement dans la zone cytoplasmique corticale où le réticulum endoplasmique présente son développement maximum. Les lobules vitellins ne présentent pratiquement aucune trace de radioactivité, de même que les corps de Golgi (Pl. 29, fig. b).

- 3 à 6 heures après l'injection, le complexe golgien présente un marquage considérable. Les grains d'argent s'observent au niveau des saccules et à l'extrémité de ces derniers, dans la zone de formation des vésicules (Pl. 30, fig. a). Le marquage du vitellus reste très faible, sauf au niveau des lobules vitellins en formation, accolés aux saccules des dictyosomes ; ces éléments présentent une radioactivité particulièrement intense (Pl. 31, fig. b).

- Cette distribution du marquage est particulièrement nette après chasse du précurseur. Dans ce cas, après une évolution totale d'une durée de 3 heures, toute la radioactivité est pratiquement concentrée au niveau de l'appareil de Golgi (Pl. 30, fig. b et Pl. 31, fig. a).

- 24 à 48 heures d'incorporation. Le taux de la radioactivité régresse considérablement au niveau des éléments golgiens (Pl. 32, fig. a). On observe par contre un marquage intense au niveau de certains lobules vitellins ; ces derniers sont caractérisés par une structure vésiculaire et sont situés généralement à proximité des dictyosomes (Pl. 32, fig. b).

- Par contre, les lobules vitellins de structure homogène ne présentent pas de radioactivité particulière. Il semble logique de considérer que les apports de matériel protéique ont cessé dans ces éléments ayant achevé leur maturation.

Chez N. pelagica, l'incorporation de leucine ^3H se traduit également, 24 à 48 heures après l'injection par l'apparition de radioactivité au sein de certains lobules vitellins.

Dans le cas d'ovocytes d'un diamètre d'environ 170 μ , stade qui correspond aux synthèses actives des mucopolysaccharides, on constate que certains petits lobules vitellins, situés à proximité des dictyosomes, présentent un marquage important (Pl. 38, fig. b). La dualité des processus de synthèses réalisées à ce stade par l'appareil de Golgi, sera envisagée dans le chapitre VII.

IV - DISCUSSION

A - ETUDE COMPARATIVE DES PROCESSUS DE VITELLOGENÈSE

Les très nombreuses études consacrées au problème de la vitellogenèse ont montré que l'origine du vitellus est extrêmement variée. Elle peut résulter, soit d'un apport de matériel extracellulaire, soit d'une élaboration endogène.

1 - Origine exogène

Chez les Insectes, il apparaît que la majeure partie du vitellus est absorbée par l'ovocyte par l'intermédiaire de vésicules de pinocytose dont la fusion progressive à l'intérieur de l'ooplasme conduit à l'édification des lobules vitellins matures (ANDERSON, 1964 ; FAVARD-SERENO, 1964 ; ROTH et PORTER, 1964 ; BEAMS et KESSEL, 1969). A un degré moindre, il semble qu'une partie des protéines vitellines puissent également avoir une origine extra-ovocytaire dans le cas des Amphibiens (PANGE et KESSEL, 1967), des Oiseaux (SCHJEIDE et Al., 1963) et des Mammifères (MANCINI et Al., 1963). Dans certaines espèces d'Annélides, telle Ophryotrocha labronica, une continuité a pu être observée entre le cytoplasme des ovocytes et celui des cellules folliculeuses (EMANUELSSON, 1969). Un transfert de matériel réalisé à partir de ces cellules pourrait constituer un élément précurseur des protéines du vitellus.

2 - Origine endogène

Plusieurs organites cytoplasmiques ont été impliqués dans l'élaboration du vitellus. Nous les mentionnerons rapidement.

. Les mitochondries

La plupart de ces observations ont été réalisées chez les Amphibiens (BALINSKY et DEVIS, 1963 ; WARD, 1962 ; SENTEIN et HUMEAU, 1963). Le matériel vitellin s'accumule soit dans les crêtes, soit entre les membranes internes et externes des mitochondries. Le vitellus présente fréquemment dans ce cas une structure para-cristalline. Des processus similaires ont été observés au cours de la vitellogenèse de Planorbe (FAVARD et CARASSO, 1958) et de certains Poissons (SENTEIN et REBOULIN, 1969). Actuellement les connaissances restent limitées en ce qui concerne l'origine du matériel s'accumulant

dans cet organite.

• L'ergastoplasme

Ce type de vitellogenèse a été observé essentiellement chez les Crustacés (KESSEL, 1968c), chez l'Ecrevisse (BEAMS et KESSEL, 1963), Le matériel vitellin est élaboré dans les citernes ergastoplasmiques ; il s'accumule secondairement dans la partie agranulaire du réticulum. Il est à noter que chez les Poissons une partie du vitellus semble être élaborée directement à l'intérieur des citernes ergastoplasmiques (DROLLER et ROTH, 1966 ; ULRICH, 1969).

• Le Golgi

A la suite des travaux d'AFZELIUS (1956) chez l'Oursin, le rôle de l'appareil de Golgi dans l'élaboration du vitellus a été signalé chez les Tuniciers (HSU, 1962 ; KESSEL, 1966a et b), les Mollusques (WORLEY et MORIBER, 1961 ; BEAMS et SEKHON, 1966) et les Annélides (SICHEL, 1966 ; DHAINAUT, 1966c, 1967 ; SAWADA et Al., 1968). Chez la Limule (DUMONT et ANDERSON, 1967) et certains Poissons (DROLLER et ROTH, 1966) des observations analogues ont été effectuées.

3 - Origine mixte

Il faut se garder toutefois de schématiser les processus de vitellogenèse ; les lobules vitellins peuvent résulter de la fusion de matériels issus d'organites cytoplasmiques distincts : ergastoplasme, Golgi, vésicules de pinocytoses (DROLLER et ROTH, 1966 ; ULRICH, 1969 ; HINCH et CONE, 1969) ou de l'élaboration par des organites différents suivant les stades de la vitellogenèse (DUMONT et ANDERSON, 1967).

Chez les Néréidiens, nous n'avons observé que rarement la présence de vésicules de pinocytose au cours des stades de vitellogenèse. L'apport de matériel réalisé par ce processus paraît assez négligeable.

D'origine essentiellement endogène, le vitellus semble résulter d'une différenciation des sécrétions golgiennes. Le rôle de cet organite sera envisagé plus particulièrement en ce qui concerne la genèse du vitellus.

B - FORMATION DU VITELLUS CHEZ LES NEREIDIENS

Le stade initial de la formation du vitellus semble être représenté chez N. pelagica, de même que chez Ciona (KESSEL, 1966a) et chez l'Anodonte (BEAMS et SEKHON, 1966) par l'apparition de corps multivésiculaires résultant d'une association de vésicules d'origine golgienne. Fréquemment, on observe comme chez N. diversicolor, la présence à proximité des dictyosomes, de vacuoles d'un contenu similaire à celui des lobules vitellins. KESSEL (1968b) chez la Méduse de l'Hydrozoaire Trachilina a magnifiquement illustré la filiation unissant les saccules golgiens et les vacuoles. Ces dernières, ainsi que cela a été décrit dans d'autres types cellulaires (LOCKE et COLLINS, 1965) s'accroissent par incorporation de vésicules. Ces vésicules, "précurseurs du vitellus", selon la terminologie de BEAMS et SEKHON (1966) ne se fusionnent parfois que tardivement à la matrice protéique des lobules vitellins. Il en résulte une structure vésiculaire particulièrement caractéristique des ovocytes de N. diversicolor

C - LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES

Les résultats obtenus par autoradiographie à haute résolution montrent, que dans ses grandes lignes, la synthèse des protéines du vitellus s'effectue selon un schéma analogue à celui des cellules à sécrétion exocrine. Dans ces cellules, la première étape du cycle sécrétoire peut être visualisée par l'incorporation d'acides aminés. Ce processus s'effectue au niveau des ribosomes de l'ergastoplasme (SIEKEVITZ et PALADE, 1960 ; REDMAN, SIEKEVITZ et PALADE, 1966). Les sécrétions protéiques localisées dans les citernes du réticulum (REDMAN et al., 1966 ; REDMAN et SABATINI, 1966) sont ensuite transférées dans les saccules golgiens par l'intermédiaire de petites vésicules. L'appareil de Golgi représenterait un lieu de stockage et de remaniement des protéines synthétisées (CARO et PALADE, 1964 ; JAMIESON et PALADE, 1967 a et b ; DROZ, 1966a) avant leur libération sous forme de vésicules ou de vacuoles. Un certain nombre d'auteurs ont attiré l'attention sur l'importance de l'appareil de Golgi en tant que site de formation de membranes (SJOSTRAND, 1962). Il résulte en effet d'observations à la fois morphologiques et expérimentales que le complexe golgien pourrait être engagé activement dans l'assemblage des éléments phospholipidiques membranaires (COHN et BENSON, 1965 ; MORRE et VAN DER-WOUDE, 1966). Ces derniers

représenteraient en outre le support de la "machinerie" enzymatique intervenant dans la concentration des produits de sécrétion (SJOSTRAND).

Cependant un certain nombre de différences séparent les synthèses protéiques des ovocytes de celles des cellules exocrines. Dans ces dernières, les produits de sécrétion sont, contrairement au vitellus, appelés à être rejetés hors de la cellule ; d'autre part, le cycle sécrétoire s'effectue à un rythme rapide, de l'ordre de quelques heures. Dans les ovocytes, par contre, les processus de vitellogenèse s'échelonnent sur plusieurs mois et ne concernent, pour une période donnée, que quelques lobules vitellins. Enfin, dans les cellules exocrines, l'ergastoplasme est toujours extrêmement développé, tandis que dans les ovocytes, les ribosomes sont, en majeure partie, libres dans l'ooplasme. Ceci nous amène à considérer le problème de la synthèse des protéines du vitellus sous deux angles : celui du site initial de ces synthèses, et celui de l'origine des substances précurseurs intervenant à leur niveau.

Les temps d'incorporation de faible durée montrent que le marquage se situe initialement dans la zone corticale de l'ooplasme : zone groupant à la fois de nombreux ribosomes libres et des ribosomes attachés aux membranes du réticulum. Le pouvoir de résolution ne permet pas de déterminer avec précision la structure des ribosomes impliqués dans les synthèses. Il semble admis que l'incorporation des acides aminés pourrait s'effectuer à la fois au niveau des ribosomes libres et associés (PORTER, 1961) ; cependant les synthèses seraient plus rapides au niveau des ribosomes attachés aux membranes (SIEKEVITZ et PALADE, 1960). BIRBECK et MERCER (1961) notent que, d'une façon générale, les cellules qui n'exportent pas leur produit de sécrétion protéique, mais les accumulent à l'intérieur de leur membrane (cellules embryonnaires, ovocytaires ou tumorales), renferment essentiellement des ribosomes libres. La structure particulière de ces cellules est peut-être une conséquence de la lenteur relative de leur processus de synthèse. Ceci expliquerait également, dans le cas de notre matériel, l'absence de relations morphologiques classiques entre le réticulum et l'appareil de Golgi.

Il faut remarquer cependant que l'apparition de la radioactivité dans la zone corticale du cytoplasme coïncide avec la zone où les citernes de réticulum sont les plus nombreuses. Il semblerait donc, qu'il existe une relation entre les synthèses et les membranes du réticulum, même si ces

dernières ne sont associées qu'à un nombre restreint de ribosomes. A ce sujet KESSEL (1968a) dans son étude sur Ophioderma, envisage l'éventualité d'un renouvellement constant des ribosomes en relation avec les membranes. Selon cet auteur, ceci impliquerait, pour les ribosomes activés, la possibilité d'une migration en direction du réticulum puis, d'un retour sous une forme libre, une fois les synthèses effectuées.

Quel que soit le processus exact intervenant au niveau des ribosomes, deux questions toutefois se doivent encore d'être posées.

- Quelle est l'origine des acides aminés pénétrant dans l'ovocyte ?
- Les protéines synthétisées au niveau des ribosomes constituent-elles la seule source de matériel vitellin ?

En réponse à la première question, il est connu par des études réalisées chez les Echinodermes (MONROY et TOLIS, 1964) et les Amphibiens (MERRIAM, 1969) que la pénétration des acides aminés s'effectue librement dans les ovocytes. Dans le cas des Polychètes, les acides aminés impliqués dans la synthèse des protéines semblent avoir pour origine le liquide coelomique où la teneur en acides aminés libres peut atteindre 150 mg/100 ml (M.E. CLARK, 1968).

Un apport de matériel extracellulaire, effectué sous la forme de protéines complexes peut également être envisagé. Certes les vésicules de micropinocytose n'ont jamais été observées en nombre très élevé ; cependant les éléocytes manifestent au cours de la gamétogenèse un métabolisme protéique assez intense ; leur relation éventuelle avec les ovocytes sera discutée dans le chapitre IX.

Enfin, les études réalisées en autoradiographie optique ont montré (Chapitre II) qu'une quantité importante de protéines était synthétisée au niveau du nucléole. La diminution du marquage de cet organite en fonction du temps semble indiquer qu'une partie de ces protéines est transférée vers le cytoplasme. Dans quelle mesure, celles-ci sont-elles reprises dans les processus d'édification du vitellus ? Les techniques utilisées ne permettent pas actuellement de séparer clairement ces deux voies métaboliques. L'utilisation d'anti-métaboliques à faible dose permettra peut-être, par un blocage sélectif des synthèses protéiques, d'aborder efficacement l'étude de ce problème.

CONCLUSION

Chez N. diversicolor, les premiers lobules vitellins apparaissant dans le cytoplasme résultent de la différenciation de vacuoles golgiennes à contenu dense. Des corps de structure multivésiculaires semblent représenter chez N. pelagica, le stade initial de la formation du vitellus.

Au cours de la vitellogenèse, l'appareil de Golgi est situé, chez les trois espèces étudiées, à proximité de l'enveloppe ovocytaire ; sa polarité est nettement déterminée. Les lobules de vitellus élaborés au cours de ce stade ovocytaire résultent d'une accumulation de matériel dans les saccules de la face distale des dictyosomes ; leur libération est corrélative d'une rupture de ces saccules.

L'examen morphologique révèle, dans les lobules vitellins en croissance, la présence de nombreuses vésicules d'une structure analogue à celle des vésicules formées à l'extrémité des saccules golgiens. Ces vésicules représenteraient le processus par lequel s'effectuerait le transport de matériel protéique.

L'étude autoradiographique effectuée chez N. diversicolor montre, qu'à la suite d'une incorporation de leucine ^3H , le marquage est localisé initialement dans la zone ovocytaire corticale. 3 à 6 heures après l'injection, les grains d'argent sont situés essentiellement au niveau du complexe golgien. La radioactivité régresse fortement à ce niveau après 24 à 48 heures d'évolution. A ce moment, le marquage est localisé au niveau de certains lobules vitellins caractérisés par leur structure vésiculaire.

Ces résultats autoradiographiques montrent que les synthèses protéiques de la vitellogenèse s'effectuent selon un schéma comparable à celui établi dans les cellules à sécrétion protéique exocrine (CARO et PALADE, 1964 ; JAMIESON et PALADE, 1967 ; DROZ, 1966). Ils soulignent d'autre part le rôle de l'appareil de Golgi dans l'édification du vitellus.

CHAPITRE VII

LES PROCESSUS D'ELABORATION DES MUCOPOLYSACCHARIDES ET LA MATURATION OVOCYTAIRE

INTRODUCTION

Chez les Néréidiens, pendant la première phase de l'accroissement ovocytaire, l'ooplasme ne renferme pratiquement que des inclusions lipidiques et protéiques. A partir d'un diamètre voisin de 120 μ chez P. cultrifera et de 110 μ chez N. pelagica, un abondant matériel PAS positif envahit progressivement tout le cytoplasme ovocytaire. L'affinité de ce matériel pour le bleu alcian augmente progressivement au cours de la maturation ovocytaire. Par suite de la similitude de l'évolution des ovocytes de ces deux espèces, leur étude sera envisagée conjointement. Nous préciserons dans un premier temps la nature cytochimique des composés polysaccharidiques formés, puis nous envisagerons leurs processus d'élaboration à la fois d'un point de vue morphologique et dynamique par incorporation de précurseurs radioactifs.

Chez N. diversicolor, dans les ovocytes d'un diamètre de 170 - 180 μ des granulations alcianophiles apparaissent progressivement dans la zone corticale de l'ooplasme ; leur nombre toutefois reste très restreint. D'autre part, chez cette espèce, l'étude au microscope électronique révèle deux types distincts de formations corticales. Cette particularité nous conduira à étudier séparément l'évolution de cet ovocyte.

I - NEREIS PELAGICA ET P. CULTRIFERA

A - LES FORMATIONS ALVEOLAIRES

1 - Etude cytochimique

Les résultats des réactions cytochimiques effectuées sur les formations glucidiques des ovocytes de P. cultrifera au cours de l'ovogenèse sont regroupés dans le tableau 9. Il ressort de l'examen de celui-ci que la nature du matériel glucidique varie au cours de la croissance ovocytaire.

Tableau 9 - Etude cytochimique des substances glucidiques en fonction de la croissance des ovocytes de P. cultrifera (PORCHET et DHAINAUT, 1969).

Colorations	Tailles ovocytaires			
	110 μ	120 à 150 μ	Sub-maturité 160 à 230 μ	Maturité 250 μ
Métachromasie (bleu de toluidine pH = 4,6).....	-	+	++	++
APS.....	-	+	+	-
APS dimédon.....	-	-	-	-
Bleu alcian.....	-	-	+	++
Muci-carmin.....	-	-	+	++
Aldéhyde-fuchsine.....	-	-	+	++
Hale (capture du fer).	-	-	+	++

Le cytoplasme des ovocytes de P. cultrifera, d'un diamètre compris entre 120 et 150 μ , est caractérisé par la présence de substances APS positives, non digérées par l'amylase salivaire et présentant une métachromasie très nette au bleu de toluidine à pH 4,6. La coloration par le bleu alcian est négative.

Chez N. pelagica, la présence d'un matériel de même nature a été constatée dans les ovocytes d'un diamètre compris entre 100 et 150 μ .

La nature chimique précise de ces composés glucidiques n'a pu être établie. Il ne semble pas qu'il s'agisse de mucopolysaccharides de type neutre, car un certain nombre de réactions correspondant à l'identification de ces substances ne concordent pas, en particulier en ce qui concerne la réaction métachromatique

A partir d'un diamètre ovocyttaire d'environ 150 μ chez N. pelagica et 160 μ chez P. cultrifera, la nature du matériel glucidique se transforme profondément (Tableau 9 et 10).

Tableau 10 - Réaction histochimique des mucopolysaccharides de l'ovocyte de N. pelagica (170 μ).

(PAS..... +	:	Réaction de capture du)
(PAS + amylase..... +	:	fer (Hale)..... ++)
(Muci-carmin..... ++	:	Capture du fer)
(Bleu Alcian..... ++	:	+ hyaluronidase..... ++)
(Bleu de Toluidine pH 2,2.... ++	:	Capture du fer)
(Id. + méthylation..... -	:	+ β glucoronidase..... -)
(Id. + méthylation +	:)
(saponification.... -	:)
(:)
(:)

Le résultat des réactions mentionnées dans le tableau 10 et en particulier la digestion par la β -glucuronidase, après oxydation par l'acide peracétique, selon la technique très sélective de FULLMER (1960) permet de conclure à la présence de mucopolysaccharides à caractères acides. Cette digestion enzymatique semble révéler en outre la présence d'acide glucuronique, ainsi que cela a été démontré dans une espèce voisine (Nereis japonica Izuka) par voie biochimique (ISHIMOTO et Al., 1968).

La persistance de la métachromasie à des pH très bas (2,2) ainsi que sa disparition après les réactions de méthylation et de saponification semble indiquer selon LISON (1960) que la métachromasie serait due à une liaison des polysaccharides à des radicaux du type ester-sulfurique.

2 - Etude morphologique

Dans les ovocytes de N. pelagica et P. cultrifera d'un diamètre d'environ 170 μ , l'examen ultrastructural à faible grossissement montre que les alvéoles de mucopolysaccharides sont disséminés dans tout le cytoplasme (Pl. 33, fig. a), jusque dans la zone périnucléaire. Ces lobules sont limités par une membrane et renferment un matériel de très faible densité électronique. Ils sont parcourus par un réseau de fibrilles d'environ 50 Å de diamètre, fréquemment enroulées et groupées en nodules (Pl. 34, fig. a et b). Les inclusions mucopolysaccharidiques sont séparées par de minces travées cytoplasmiques constituées par des ribosomes libres. La membrane limitant les alvéoles est parfois interrompue et il semble qu'une fusion soit susceptible de s'établir entre plusieurs formations contiguës.

B - PROCESSUS D'ELABORATION DU MATERIEL MUCOPOLYSACCHARIDIQUE

1 - Etude morphologique

Lors de l'apparition des mucopolysaccharides, l'appareil de Golgi présente des modifications morphologiques importantes par rapport à la phase de vitellogenèse. Il reste aligné parallèlement au chorion ovocytaire dans la zone corticale du cytoplasme, mais ses dimensions s'accroissent considérablement. La longueur des dictyosomes, antérieurement de l'ordre de 2 μ , se situe maintenant aux alentours de 5 à 6 μ .

La face proximale des dictyosomes est située ordinairement du côté de l'enveloppe ovocytaire. Dans son voisinage, on note de façon constante la présence de mitochondries de grande taille disposées parallèlement aux corps de Golgi.

Les saccules de la face proximale présentent le plus souvent un aspect dilaté ; leur taille est généralement inférieure à celle de la longueur totale des dictyosomes (Pl. 34, fig. a et c). Ils apparaissent parfois entourés par de petites citernes aplaties de réticulum ; le plus souvent, ces dernières sont remplacées par une série de vésicules de très faible densité électronique, d'une taille d'environ 800 à 1000 Å.

Les saccules de la région moyenne des dictyosomes sont en nombre élevé, une dizaine environ. Ils élaborent à leur extrémité, par un processus de bourgeonnement, des vésicules d'environ 750 Å, d'une densité supérieure aux précédentes.

Les saccules de la face distale sont caractérisés par un aspect irrégulier et dilaté. Leur contenu renferme un matériel de très faible densité électronique dans lequel on peut déceler une structure fibrillaire (Pl. 34, fig. a). Des vacuoles aplaties, d'un contenu similaire à celui des saccules, sont alignées parallèlement à l'ensemble du dictyosome. Elles résultent vraisemblablement d'une fragmentation des saccules distaux et paraissent établir une filiation entre ces derniers et les alvéoles mucopolysaccharidiques du cytoplasme.

Ces indices morphologiques d'une origine golgienne des mucopolysaccharides se sont trouvés confirmés par une étude en autoradiographie à haute résolution effectuée chez N. pelagica.

2 - Etude autoradiographique

Les vers utilisés dans cette étude ont été récoltés en Janvier et Février, c'est-à-dire à l'approche de leur maturité sexuelle. Deux types de manipulations ont été effectués.

a) Etude "in vitro"

Cette étude permettant une concentration élevée du précurseur radioactif a été entreprise pour déterminer le site initial de l'incorporation du précurseur. Les ovocytes, prélevés par ponction

coelomique, sont placés dans des salières contenant de l'eau de mer stérilisée, additionnée de glucose ^3H (D-Glucose-6-T ; 1340 mc/mM ; Radiochemical Centre-Amersham), à la dose de 200 $\mu\text{Ci/ml}$. Après fixation par la glutaraldéhyde, les ovocytes subissent un lavage soigné dans des solutions tamponnées à pH 7,4. Ils sont ensuite post-fixés dans l'osmium. Ce processus de fixation élimine les monosaccharides libres ; seuls persistent ceux qui se sont intégrés dans les synthèses d'hydrates de carbone complexes (NEUTRA et LEBLOND, 1966).

Après une période d'incorporation de 50 minutes, un marquage intense est observé au niveau de l'appareil de Golgi, et uniquement dans cette zone (Pl. 36). Les grains d'argent sont situés en majeure partie au niveau des saccules de la région moyenne ; un certain nombre sont observés au niveau des saccules de la face distale.

Le temps d'incorporation "in vitro" n'a pas été prolongé au delà d'une durée de 50 minutes afin d'éviter les risques d'une perturbation du métabolisme ovocytaire.

b) Etude "in vivo"

Les vers reçoivent une injection unique de 150 $\mu\text{Ci/g}$ de glucose tritié. Les temps d'incorporation, de durée variée, ont été échelonnés jusque 48 heures.

- Six heures après l'injection, la radioactivité apparaît localisée au niveau de l'appareil de Golgi, dans la zone ovocytaire corticale. Son intensité est particulièrement élevée au niveau des saccules distaux (Pl. 37, fig. a).

- Pour des temps d'incorporation de l'ordre de 9 heures, les vacuoles et certains lobules mucopolysaccharidiques proches des dictyosomes se trouvent marqués à leur tour (Pl. 37, fig. b).

- Enfin pour des temps longs (24 et 48 heures), la radioactivité régresse considérablement au niveau de l'appareil de Golgi ; elle devient par contre décelable au niveau des formations mucopolysaccharidiques situées à l'intérieur de l'ooplasme (Pl. 37, fig. c).

C - REMANIEMENT STRUCTURAL DU CYTOPLASME LORS DE LA MATURATION OVOCYTAIRE ET DE LA FECONDATION

Comme nous l'avons signalé dans le chapitre I, la maturation des ovocytes de N. pelagica et P. cultrifera est caractérisée par un remaniement topographique de la distribution des constituants du cytoplasme. Ces derniers se répartissent en quatre zones concentriques (Fig. VII). On distingue en allant du noyau vers le cortex :

- une auréole basophile péri-nucléaire
- les lobules lipidiques
- les lobules de vitellus protéique
- la zone corticale.

1 - L'auréole basophile péri-nucléaire

L'étude cytochimique montre que cette zone est riche en ARN et renferme des protéines basiques. Elle est constituée en majeure partie par des ribosomes libres, englobés dans un matériel de faible densité électronique, d'aspect amorphe. Cette zone contient également des lames de réticulum très allongées mais peu nombreuses (5 à 6 au maximum), orientées le plus souvent parallèlement à l'enveloppe nucléaire. Dans certains cas, une association plus étroite entre les citernes du réticulum s'accompagne de la différenciation de ces éléments en lamelles annelées cytoplasmiques. Toutefois ces formations annulaires sont assez rares au cours de l'ovogenèse naturelle et leur dimension ne dépasse guère 1 à 2 μ . Les mitochondries, localisées en majeure partie au stade précédent à proximité des dictyosomes, migrent dans la zone peri-nucléaire. Elles se juxtaposent en une couche d'une épaisseur d'environ 8 à 9 μ (Fig.VII). Ces mitochondries sont caractérisées par la présence de crêtes nombreuses et très développées, critères morphologiques signalés dans d'autres ovocytes matures (NØRREVANG, 1965 ; WISCHNITZER, 1967).

2 - Les lobules lipidiques

Chez N. pelagica, leur nombre est assez restreint ; leur taille par contre est considérable et se situe dans certains cas aux alentours de 30 μ . Ces éléments volumineux résultent vraisemblablement de

Fig. VII - Représentation schématique d'un ovocyte mature de N. pelagica.

La zone corticale du noyau (N) renferme de nombreux fragments de nucléole (Nu) dont certains sont accolés aux lamelles annelées intra-nucléaires (LAI).

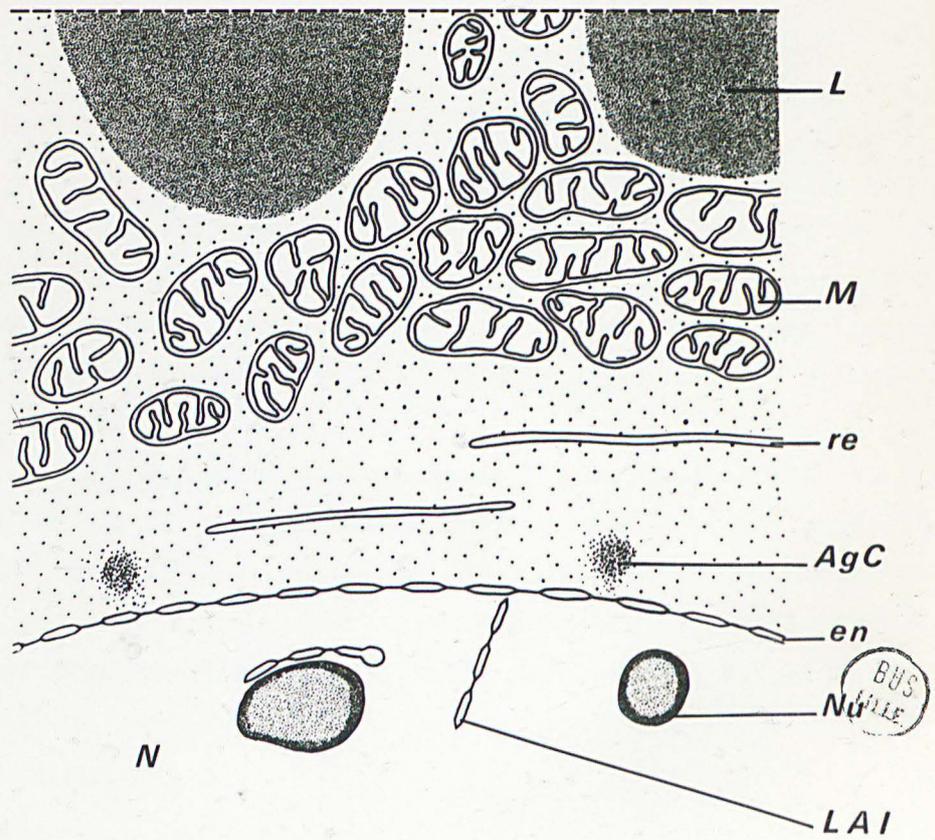
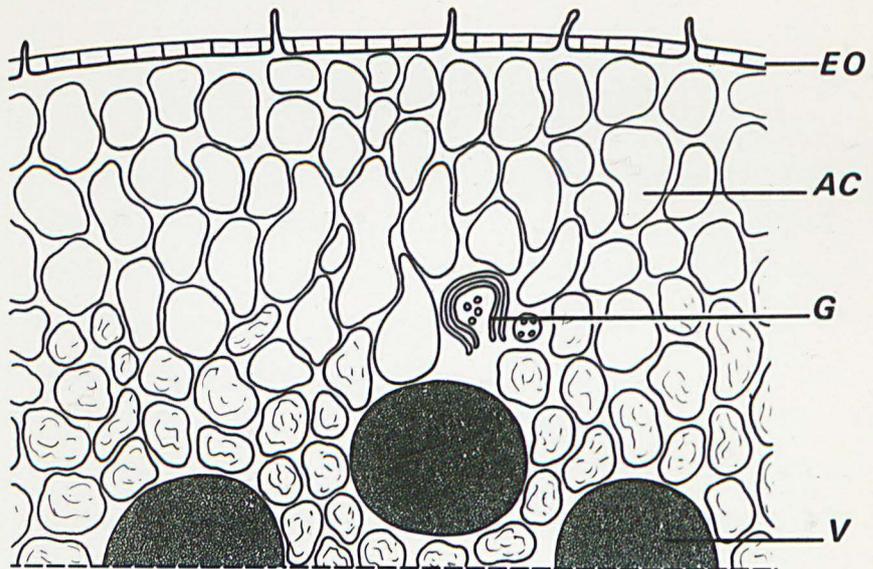
Quelques agrégats cytoplasmiques (AgC), issus d'une extrusion de matériel nucléaire sont observés à proximité des pores de l'enveloppe nucléaire (en). En allant de cette dernière vers le cortex, on rencontre successivement :

- Une zone riche en ribosomes, parcourue par des citernes allongées de réticulum (re)
- Une couche de mitochondries (M)
- De volumineux lobules lipidiques (L)
- Les granules de vitellus protéique (V)
- La couche des alvéoles corticaux (AC), les plus internes présentant une densité électronique plus élevée
- L'enveloppe ovocytaire (EO) traversée par les villosités.

Les corps de Golgi (G) en dégénérescence migrent à l'intérieur de la couche des alvéoles mucopolysaccharidiques.



Fig. VII



la fusion de petits lobules lipidiques disséminés antérieurement dans le cytoplasme.

Chez P. cultrifera, par contre, le nombre de lobules lipidiques reste élevé dans les ovocytes matures ; la fusion de ces éléments ne s'effectue qu'après la fécondation.

3 - Les lobules de vitellus protéique

Les lobules vitellins des ovocytes matures sont caractérisés par une structure très homogène. Nous n'avons que très rarement observé dans la zone corticale de ces lobules la présence de vésicules ou de corps multivésiculaires. La membrane limitant le vitellus est lisse et ne présente pas de discontinuités (Pl. 33, fig. b).

Chez P. cultrifera, dans les ovocytes matures depuis quelques jours, les lobules vitellins se disposent en un gradient longitudinal, les plus riches en groupements glycols migrant vers le pôle végétatif. Ce gradient constituerait la première polarité ovocytaire (PORCHET, 1969).

4 - La zone corticale

a) Les mucopolysaccharides

A l'approche de la maturation, les lobules mucopolysaccharidiques migrent vers la zone corticale. Ils forment alors une enveloppe d'une épaisseur variant entre 15 et 20 μ chez N. pelagica et atteignant 50 μ chez P. cultrifera. Tous les alvéoles sont pratiquement accolés ; il ne persiste entre eux que de très fines travées cytoplasmiques (Pl. 33, fig. b).

Chez N. pelagica, les éléments de l'enveloppe proches du vitellus se caractérisent par la densité élevée de leur réseau fibrillaire (Pl. 33, fig. b). Cette structure est peut-être en relation avec une nature chimique particulière ; à ce niveau en effet, la microscopie photonique révèle la présence de polysaccharides PAS positif non colorés par le bleu alcian.

b) L'appareil de Golgi

Corrélativement à l'édification de la couche corticale mucopolysaccharidique, on assiste à la dégénérescence progressive de l'appareil de Golgi. Cette involution a été suivie chez N. pelagica.

Dans les ovocytes proches de la maturité sexuelle (190 à 200 μ) les saccules de la face distale réacquièrent un aspect plus régulier, tandis que les vacuoles golgiennes se raréfient (Pl. 34, fig. b). Les dictyosomes tendent alors à se replier sur eux-mêmes ; les saccules dilatés de la face proximale forment la partie externe d'un fer à cheval dont le centre est occupé par des fragments de saccules distaux et quelques vacuoles golgiennes (Pl. 34, fig. c et Pl. 35, fig. a). Cette zone renferme également de nombreuses vésicules dont certaines présentent l'aspect de "coated vesicles" (Pl. 34, fig. c).

L'évolution structurale des dictyosomes semble se poursuivre par la fusion des saccules golgiens à leur extrémité. On observe alors des structures annulaires, formées par des empilements de saccules enroulés concentriquement (Pl. 35, fig. b et c). Le centre et le voisinage de ces formations sont occupés^{par} de nombreuses vésicules et quelques corps de structure multivésiculaire (Pl. 35, fig. b).

Corrélativement à cette évolution, les corps de Golgi s'éloignent de la zone corticale et migrent à l'intérieur de la couche mucopolysaccharidique. Dans les ovocytes matures, prêts à être fécondés, les formations golgiennes ont complètement disparu.

5 - Destinée des mucopolysaccharides lors de la fécondation

Lors de la fécondation, les modifications les plus spectaculaires concernent les mucopolysaccharides ; en effet, 24 heures après celle-ci, la structure des lobules lipidiques et protéiques ne montre pas de modifications notables.

Chez P. cultrifera (PORCHET et DHAINAUT, 1969), quelques minutes après la pénétration du spermatozoïde, les mucopolysaccharides acides sont exsudés à travers le chorion ovocytaire. Autour des oeufs se constitue une enveloppe d'une épaisseur d'environ 150 μ , d'aspect gélatineux sur le vivant. Cette gelée refoule à sa périphérie les spermatozoïdes libres dans l'eau de mer. Trente minutes après la fécondation, le rejet des mucopolysaccharides est total et l'on ne décèle plus histochimiquement aucune trace

de ces formations à l'intérieur de l'oeuf.

Un processus similaire est observé chez N. pelagica lors de la fécondation. Cependant chez cette espèce, l'examen au microscope électronique des oeufs montre que quelques lobules mucopolysaccharidiques semblent persister dans le cytoplasme.

Les modalités de l'extrusion des mucopolysaccharides à travers le chorion ovocytaire seront envisagées dans le chapitre consacré à l'étude de l'enveloppe ovocytaire.

II - NEREIS DIVERSICOLOR

Contrairement au cas de N. pelagica et P. cultrifera, les ovocytes de N. diversicolor ne subissent pas de remaniements cytoplasmiques importants à l'approche de la maturation ; à ce moment la topographie des inclusions de l'ooplasme reste inchangée par rapport aux stades précédents.

Deux critères seulement permettent de caractériser le cytoplasme à ce stade ovocytaire : l'apparition de glycogène et l'élaboration des formations corticales.

L'apparition de glycogène ne constitue pas un phénomène isolé dans le comportement des ovocytes à l'approche de la maturation. Des faits analogues ont été mentionnés dans les ovocytes d'un Gastéropode Prosobranch (BEDFORD, 1966), de la Limule (DUMONT et ANDERSON, 1967), de l'Axolotl (PERRY, 1967) et de Poissons Téléostéens (ANDERSON, 1968b ; ULRICH, 1969).

Par contre, les formations corticales, par suite de leur dualité structurale liée à une spécificité fonctionnelle des dictyosomes, constituent un problème cytologique intéressant qui sera envisagé en détail.

A - LES FORMATIONS CORTICALES

Les formations corticales apparaissent chez N. diversicolor à l'approche de la maturité sexuelle. Le diamètre ovocytaire varie à ce moment entre 180 et 190 μ .

Deux catégories distinctes d'organites sont présentes dans le cytoplasme cortical sous-jacent au chorion de l'ovocyte. La première catégorie correspond aux alvéoles corticaux décrits par PASTEELS (1966b) chez cette même espèce et par FALLON et AUSTIN (1967) chez N. limbata Ehlers

(= N. succinea Leuckart). Outre ces alvéoles, on observe des organites de densité électronique élevée, à structure hétérogène. Par analogie avec des formations similaires décrites chez les Echinodermes (ANDERSON, 1966 ; ENDO, 1961 ; RUNNSTROM, 1966 ; TAKASHIMA et Al., 1966), et chez les Lammelibranches (HUMPHREYS, 1967), nous les désignerons sous le terme de granules corticaux.

1 - Les alvéoles corticaux

Ils se présentent sous l'aspect de lobules arrondis ou ellipsoïdaux entourés par une membrane. Leur taille varie de 0,3 à 0,9 μ (Pl. 39, fig. a et b). Ils apparaissent disséminés dans le cytoplasme cortical de l'ovocyte submature entre des citernes de réticulum et de nombreux ribosomes libres. Par contre, dans l'ovocyte mature, les lobules sont étroitement accolés, sauf au niveau des racines des microvillosités. Ils forment à ce stade une zone d'environ 5 μ d'épaisseur, homologue de la "foam structure" décrite par LILLIE (1911).

Les alvéoles corticaux renferment un contenu de très faible densité électronique parcouru par un réseau de fibrilles. Celles-ci, parfois enroulées en spires concentriques, ont un diamètre d'environ 50 Å. Ce diamètre est toutefois supérieur dans certains lobules en cours d'élaboration.

Les alvéoles corticaux représentent vraisemblablement le matériel coloré par le bleu alcian dans la zone corticale de l'ovocyte. Cependant, vu leur taille restreinte, il est difficile de les différencier avec certitude à l'échelle de la microscopie optique.

2 - Les granules corticaux

Leur apparition est légèrement postérieure à celle des alvéoles. Disséminés assez irrégulièrement dans tout le cortex de l'ovocyte mature, les granules corticaux sont en contiguïté ou à proximité immédiate de la membrane plasmique et orientés perpendiculairement à cette dernière (Pl. 39, fig. a). Les granules corticaux, d'une longueur d'environ 1,5 μ sont limités par une membrane et renferment deux composants de densité différente. Le composant dense de structure granulaire englobe un réseau formé par un matériel peu opaque aux électrons. Comme le montrent les micrographies de sections transversales, ce dernier matériel à structure filamenteuse est surtout localisé dans la zone externe des granules (Pl. 39, fig. b).

D'autre part, la substance dense peut se présenter dans les granules immatures (Pl. 40, fig. b) sous l'aspect d'une lamelle enroulée en spirale ; les tours de la spire étant reliés par de fins filaments.

Les granules corticaux renferment généralement une vacuole dans laquelle un matériel granulaire est disséminé dans un contenu de faible densité. La position de cette vacuole est variable mais, le plus souvent, elle est située à proximité de la membrane plasmatique.

La technique de RAMBOURG (1967) spécifique de la détection des glycoprotéines (voir discussion) a été effectuée sur des ovocytes fixés uniquement par la glutaraldéhyde et inclus dans le glycol-méthacrylate. Après coloration par le mélange acide chromique phosphotungstique, une réaction intense est observée au niveau des granules corticaux (Pl. 43, fig. a).

B - MORPHOLOGIE DE L'APPAREIL DE GOLGI ET DE SON MATERIEL SECRETOIRE

Parmi les divers organites cytoplasmiques examinés lors de l'apparition des formations corticales, le complexe golgien se signale par son grand développement et des indices évidents d'une activité sécrétoire importante.

Des différences morphologiques considérables, corrélatives d'une activité fonctionnelle spécifique s'observent parmi les dictyosomes d'un même stade ovocytaire (Fig.VIII). Pour la clarté de l'exposé, et malgré les caractères intermédiaires de certains d'entre eux, nous distinguerons deux types principaux de dictyosomes.

1 - Morphologie du premier type de dictyosome

Les dictyosomes de ce groupe sont constitués par l'empilement de 6 à 9 saccules d'un diamètre moyen de 300 \AA ; des vésicules d'une taille de 700 \AA s'élaborent à leur extrémité par un processus de bourgeonnement.

Les saccules de la face proximale présentent un aspect dilaté et renferment un contenu de faible densité. Dans leur voisinage, les citernes ergastoplasmiques sont le plus souvent absentes ; on observe par contre, à la périphérie de ces dictyosomes des formations de réticulum, peu nombreuses et souvent orientées parallèlement aux saccules golgiens

Fig. VIII - Ovocyte de N. diversicolor.

Représentation schématique de la morphologie des deux types de dictyosomes et de leur produit sécrétoire lors de l'élaboration des organites corticaux.

Dans le type A, les vacuoles golgiennes (VG) issues de la fragmentation des saccules distaux (SD) sont à l'origine des alvéoles corticaux (AC).

Les saccules distaux des dictyosomes du type B élaborent des corps à structure granulaire (CG) qui évoluent pour former les granules corticaux (GC).

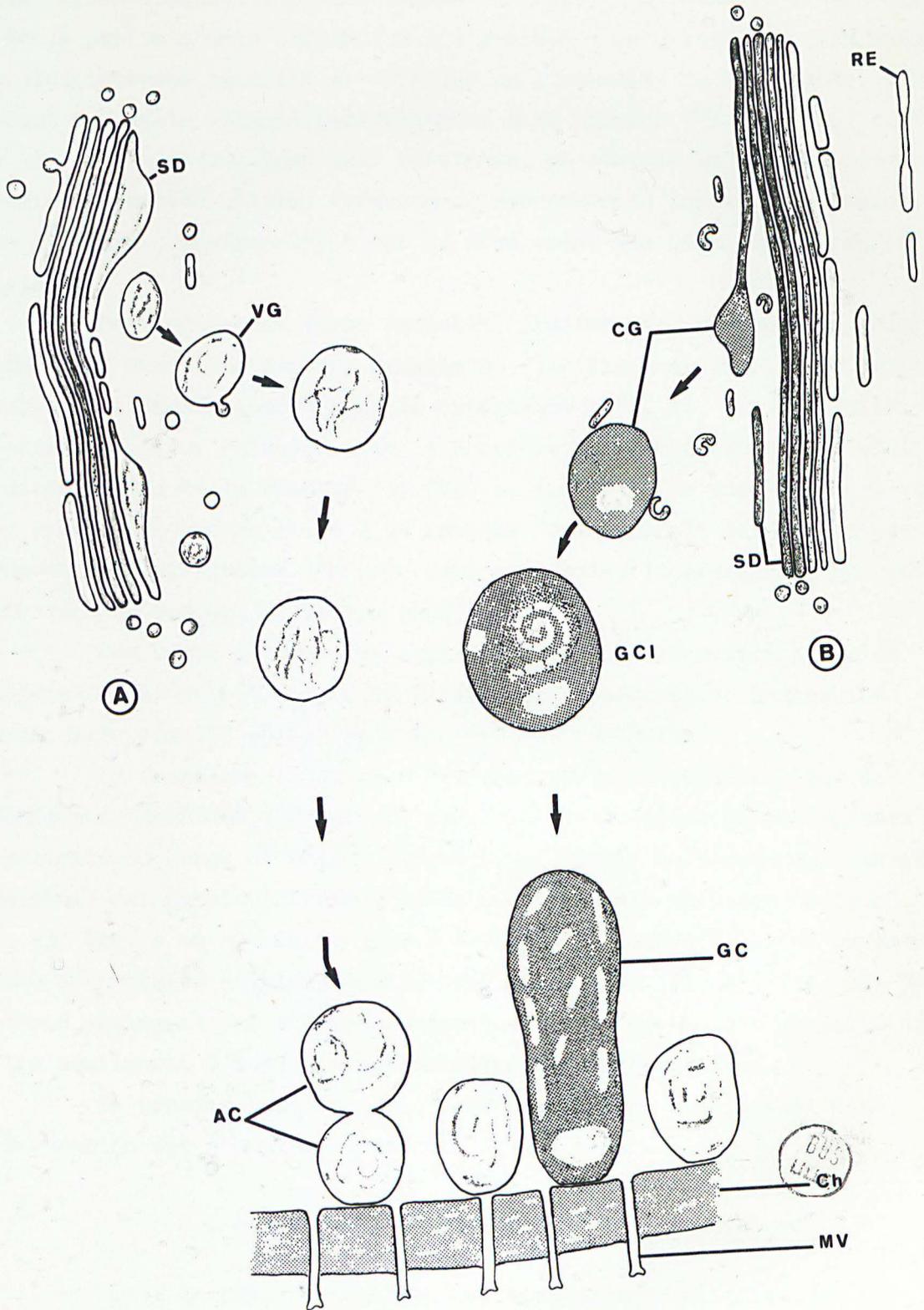
RE : réticulum endoplasmique

Ch : chorion de l'enveloppe ovocytaire

MV : microvillosités de la paroi.



Fig. VIII



(Pl. 40, fig. c).

Les saccules de la face distale ont un diamètre analogue à ceux de la région moyenne. Ils contiennent un matériel de densité élevée mis en évidence par la double coloration à l'acétate d'uranyle-plomb. Les saccules les plus internes semblent se détacher de l'ensemble du dictyosome, mais restent toutefois alignés parallèlement à ce dernier (Pl. 40, fig. c et Pl. 41, fig. a et b). Dans leur voisinage, on observe la présence de nombreux saccules de petite taille, fréquemment recourbés en forme de croissant. Leur diamètre d'environ 350 Å est du même ordre que celui des saccules golgiens.

Des lobules de forme variable, limités par une membrane, renferment un matériel dense à structure granulaire. Ils figurent le plus souvent sous l'aspect d'éléments isolés dans le cytoplasme (Pl. 41, fig. b), mais, dans certains cas, leur relation avec le complexe golgien ressort très clairement. La micrographie de la Planche 41, fig. a, montre un de ces lobules à structure granulaire encore relié à un saccule qui apparaît ici détaché de l'ensemble du dictyosome. On note dans ce lobule, la présence d'une vacuole renfermant un contenu de faible densité.

Ces corps granulaires sont entourés par les petits saccules disséminés dans le cytoplasme et de fréquents rapports de contiguïté peuvent être établis entre ces deux types de formation.

La technique de mise en évidence des glycoprotéines par la technique de RAMBOURG a permis de confirmer les données morphologiques de la polarité du corps de Golgi. La réaction, faible au niveau des saccules proximaux, est particulièrement nette au niveau des saccules distaux (Pl. 43, fig. a et b). Cette teneur élevée en glycoprotéines se retrouve au niveau des lobules golgiens à structure granulaire (Pl. 43, fig. b). Des critères analogues ont été précédemment notés au niveau des granules corticaux et ils soulignent l'analogie cytochimique de ces formations.

Ce premier type de dictyosome paraît donc spécialisé dans l'élaboration des granules corticaux.

2 - Morphologie du deuxième type de dictyosome

Le pôle proximal de ces dictyosomes est constitué par des saccules d'aspect tubulaire d'environ 550 Å de diamètre et de faible densité. Ces saccules, parfois associés à des vésicules (Pl. 42, fig. a) peuvent

présenter un aspect anastomosé (Pl. 40, fig. d) et semblent, dans certains cas, s'étendre entre deux dictyosomes voisins.

A la face opposée, les saccules internes se caractérisent par de fréquentes dilatations ; leur contenu de très faible densité est parcouru par un fin réseau de fibrilles.

Dans le cytoplasme sous-jacent sont disséminés différents organites de forme variée (Pl. 42, fig. a et b) :

a - Vésicules dont la taille, sensiblement homogène, se situe aux environs de 600 Å ;

b - Saccules d'un diamètre d'environ 400 Å et d'une longueur variable ; ils résultent vraisemblablement d'une fragmentation des saccules golgiens ;

c - Vésicules de taille hétérogène. La structure annulaire de certaines d'entre elles semble indiquer qu'elles pourraient s'édifier par un processus d'enroulement des saccules ;

d - Vacuoles d'une taille variant entre 30 et 100 μ m et d'un contenu analogue à celui des portions dilatées des saccules distaux.

Certains aspects morphologiques semblent indiquer que les organites de type b et c pourraient se fusionner avec les vacuoles à contenu clair du type d. L'examen des micrographies, par contre, ne permet pas de conclure avec certitude à une participation éventuelle des vésicules de type a.

Dans les plus grandes vacuoles golgiennes (type d), la structure du réseau fibrillaire est nettement dessinée (Pl. 42, fig. a). Ces vacuoles semblent représenter un stade de transition entre les sécrétions golgiennes de ce 2ème type de dictyosome et les alvéoles corticaux.

3 - Dictyosomes à caractères intermédiaires

Certains dictyosomes présentent des caractères intermédiaires par rapport aux deux types précédemment décrits. Dans leur zone distale (Pl. 43, fig. c) des vacuoles à contenu dense et granulaire coexistent avec d'autres vacuoles à contenu fibrillaire, d'une morphologie analogue à celle du deuxième type de dictyosome.

En outre, dans cette zone, certaines vésicules se caractérisent par leur contenu de forte densité et leur aspect "tapissé" (coated vesicles) (Pl. 43, fig. d). L'origine et la destinée de ces formations sont difficiles à préciser ; toutefois, comme le montre la micrographie de la Pl. 43, fig. c,

une relation peut exister entre ces vésicules et les vacuoles golgiennes.

La signification de l'activité fonctionnelle de cette catégorie particulière de dictyosome sera envisagée dans la discussion.

III - DISCUSSION

A - LES FORMATIONS CORTICALES

1 - Lobules mucopolysaccharidiques et alvéoles corticaux

Chez N. pelagica et P. cultrifera, les lobules mucopolysaccharides sont extrêmement abondants. Au cours de leur élaboration, ils sont disséminés dans l'ensemble du cytoplasme, jusqu'à proximité de l'enveloppe nucléaire. A l'approche de la maturation, ils migrent dans la zone corticale de cytoplasme pour former une couche dont l'épaisseur peut atteindre 50 μ chez P. cultrifera.

Chez N. diversicolor par contre, les alvéoles corticaux sont peu nombreux et gagnent directement le voisinage du chorion. Cependant, malgré ces différences, de nombreux points de comparaison résultent de l'examen de ces deux types de formations :

- Elles sont issues de dictyosomes présentant un aspect morphologique comparable.
- Leurs caractères morphologiques sont identiques. Elles renferment un matériel de faible densité électronique parcouru par un réseau de fibrilles.
- Lors de la fécondation, les formations alvéolaires sont expulsées et leur matériel forme une gelée péri-ovocytaire. Elles ne constituent donc pas de réserves cytoplasmiques.
- De même que dans le cas des ovocytes de N. pelagica et P. cultrifera, il semble que les alvéoles corticaux de N. diversicolor soient constitués de mucopolysaccharides acides. Chez cette espèce, on détecte en effet, lors de leur apparition dans la zone corticale des ovocytes, la présence d'un matériel métachromatique alcianophile. Cependant à l'échelle de la microscopie optique, la distinction entre les alvéoles et les granules corticaux reste délicate.

Ces analogies permettent de considérer que les alvéoles corticaux des trois espèces de Néréidiens étudiées peuvent être homologués en une même entité structurale.

L'existence d'alvéoles corticaux constituée par un matériel de faible densité, parcouru par un réseau fibrillaire, semble avoir été observée essentiellement chez les Annélides et plus particulièrement chez les Néréidiens : N. diversicolor (PASTEELS, 1966b ; et cette étude), N. limbata (FALLON et AUSTIN, 1967), N. japonica (TAKASHIMA, 1962).

Chez les Poissons, à la suite d'études au microscope photonique, divers auteurs ont désigné sous ce terme des formations assez comparables, dont le contenu, comme chez les Annélides, est expulsé lors de la fécondation (KUSA, 1953 ; YAMAMOTO, 1962). Cependant, les études récentes, effectuées au microscope électronique sur ce matériel, ont révélé que contrairement aux Néréidiens, les alvéoles des ovocytes des Poissons et des Cyclostomes ne renferment pas de réseau fibrillaire (ANDERSON, 1968b ; AFZELIUS, 1968). D'autre part, dans le cas de l'oeuf de Lamproie, AFZELIUS considère que les alvéoles, de par leur structure, peuvent être assimilés aux granules corticaux typiques.

2 - Les granules corticaux

Ils représentent un élément caractéristique des ovocytes matures de N. diversicolor. Par contre, chez N. pelagica nous n'avons observé qu'exceptionnellement de tels organites cytoplasmiques.

L'aspect ultrastructural des granules corticaux varie considérablement selon les espèces animales. Le plus souvent, ces organites, limités par une membrane sont de forme sphérique ou ovoïde ; leur taille varie entre 0,4 et 0,5 μ . Chez les Batraciens (HEBRARD, 1967 ; KEMP et ISTOCK, 1967 ; VAN GANSEN, 1966) leur contenu est homogène. Il renferme une zone centrale plus dense dans le cas des Mammifères (BACA et ZAMBONI, 1967) et du Mollusque Barnea candida (PASTEELS et DE HARVEN, 1962).

Chez les Echinodermes, ENDO (1961), RUNNSTROM (1966), TAKASHIMA (1966), ANDERSON (1968a) ont décrit divers types de granules corticaux dont certains sont caractérisés par la présence de formations lamellaires denses, enroulées concentriquement. La complexité maximale a été signalée par HUMPHREYS (1967) chez Mytilus edulis. Chez cette espèce, la double fixation

glutaraldéhyde-osmium permet la mise en évidence, autour d'une masse granulaire dense, de faisceaux de microtubules d'une longueur de 0,8 μ . Des conditions de fixation analogues n'ont jamais permis de déceler de telles structures dans les granules corticaux de N. diversicolor.

A la suite des travaux de MONNE et SLAUTTERBACH (1950) sur l'oeuf d'Oursin, divers auteurs ont confirmé la présence fréquente d'un matériel mucopolysaccharidique dans les granules corticaux. Ces mucopolysaccharides, acides ou neutres selon les espèces, seraient associés chez les Echinodermes en un complexe mucopolysaccharides acides-protéines (AFZELIUS, 1956 ; ANDERSON, 1968a). Dans le cas de notre matériel, nous n'avons pu établir avec certitude la présence de mucopolysaccharides au niveau des granules. Par contre, la coloration par le mélange acide chromique-phosphotungstique permet de déceler, en microscopie électronique, une teneur élevée en glycoprotéines à leur niveau.

B - L'APPAREIL DE GOLGI

1 - Rôle de l'appareil de Golgi dans l'élaboration des formations corticales

A la suite des travaux de BALINSKY et DAVIS (1963) chez les Amphibiens, divers auteurs : WARD et WARD (1968) également chez les Amphibiens ; BACCA (1967) chez les Mammifères ; ANDERSON (1966, 1968a) et KESSEL (1968a) chez les Echinodermes ANDERSON (1968b) chez les Poissons, ont localisé le site d'élaboration des organites corticaux au niveau du complexe golgien. De même dans les ovocytes de Néréidiens proches de la maturité sexuelle, le développement considérable de l'appareil de Golgi paraît corrélatif d'une activité de synthèse importante.

La face proximale des dictyosomes est constituée par des saccules d'aspect dilaté qui renferment un matériel de faible densité. Ces saccules présentent parfois un aspect anastomosé analogue à celui décrit dans d'autres cellules par KESSEL (1965 et 1968a) et par MORRE et al. (1965). Il est maintenant généralement admis que cette face de l'appareil de Golgi, désigné par BERLIN (1967) sous le terme de "forming face", joue le rôle de collecteur pour un matériel, élaboré dans la plupart des cas, à partir de l'ergastoplasme.

Chez les Néréidiens, les formations ergastoplasmiques sont rares, contrairement à d'autres cellules engagées dans des synthèses actives de mucopolysaccharides (NEUTFA et LEBLOND, 1966 ; OVTRACHT, 1967). Par contre, la disposition du réticulum à la périphérie des dictyosomes et son aspect aplati semble indiquer, comme le suggèrent ESSNER et NOVIKOFF (1962), la possibilité de sa transformation progressive en saccules golgiens. Outre l'apport de matériel contenu dans ce système membranaire, la participation de ce dernier contribuerait au maintien de l'intégrité structurale du corps de Golgi (ESSNER et NOVIKOFF, 1962 ; GRASSE, 1957).

Les saccules de la face distale présentent selon les dictyosomes des aspects morphologiques différents. D'après ces critères, on peut distinguer deux catégories d'appareils de Golgi, spécialisés respectivement dans l'élaboration des alvéoles mucopolysaccharidiques et des granules corticaux (Fig. VIII).

a) Elaboration des alvéoles mucopolysaccharidiques



Les saccules de la face distale de ces dictyosomes présentent fréquemment un aspect dilaté. Ils semblent se fragmenter en des vacuoles golgiennes d'une morphologie analogue à celle des alvéoles mucopolysaccharidiques. A ces vacuoles semblent venir se fusionner des saccules et des vésicules, également d'origine golgienne, qui contribueraient à leur accroissement.

Chez N. pelagica, l'utilisation de glucose tritié comme précurseur des mucopolysaccharides (DHAINAUT, 1968) a permis de préciser les processus de synthèse de ce matériel. Les ovocytes de cette espèce, contrairement à ceux de N. diversicolor ne renferment pas de glycogène cytoplasmique susceptible d'interférer avec le métabolisme du glucose.

La spécificité du glucose en tant que précurseur des mucopolysaccharides acides se doit d'être discutée. Le glucose radioactif pourrait en effet se trouver dégradé, surtout pour des temps d'incorporation de longues durées, en des métabolites incorporés secondairement dans les lobules protéiques ou lipidiques. Il semble cependant qu'un tel processus métabolique soit limité, très peu de grains d'argent ayant été observés au niveau de ces organites.

Les monosaccharides libres sont éliminés par les processus de fixation ; seuls persistent ceux qui sont incorporés dans les hydrates de carbone complexes ou autres grosses molécules (NEUTRA et LEBLOND, 1966). Dans les cellules à mucus de l'intestin, ces auteurs ont par ailleurs vérifié que le marquage observé à la suite d'une injection de glucose tritié correspondrait effectivement à une synthèse de mucopolysaccharides ; la digestion enzymatique de ces substances entraîne une réduction drastique de la radioactivité.

Dans les ovocytes de N. pelagica, l'incorporation de glucose tritié, "in vitro" ou "in vivo", est suivie d'une localisation initiale du marquage au niveau des dictyosomes. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans différentes cellules sécrétrices de l'intestin par SCHMALBECK et ROHR (1967) et par NEUTRA et LEBLOND (1966).

Il apparaît selon les termes de ces derniers auteurs, que les "sacculles du complexe golgien constituent le site où le glucose et les autres monosaccharides s'associent pour former des hydrates de carbone complexes". C'est également à ce niveau que s'effectuerait l'association des polysaccharides complexes avec les protéines (DROZ, 1966b ; SCHMALBECK et ROHR, 1967) ou avec les radicaux sulfates (LANE et coll., 1964).

Les résultats autoradiographiques concordent avec ceux obtenus par les techniques cytochimiques en microscopie électronique. REVEL (1964) et BERLIN (1967) par l'oxyde de thorium, WETZEL et WETZEL (1966) par une réaction de capture du fer, ont montré que l'apparition des mucopolysaccharides s'effectue au niveau des sacculles et des vacuoles golgiens. THIERY (1967) a récemment confirmé ces résultats par la mise en évidence des groupements aldéhydes libérés de la chaîne polysaccharidique à la suite d'une oxydation par l'acide periodique.

Les résultats autoradiographiques, joints aux observations morphologiques permettent donc de conclure à l'élaboration des alvéoles mucopolysaccharides chez les Néréidiens, par un type de dictyosome aux caractéristiques bien déterminées.

b) Elaboration des granules corticaux

Ces formations n'ont été pratiquement observées que chez N. diversicolor. Les granules corticaux riches en glycoprotéines semblent provenir d'un type de dictyosomes qui s'oppose à celui précédemment

décrit par la densité élevée du contenu de ses saccules distaux. Des critères morphologiques analogues ont été signalés dans d'autres cellules élaborant des glycoprotéines (GOURANTON, 1967; OVSTRACHT, 1967).

Chez N. diversicolor, la coloration par le mélange acide chromique-phosphotungstique met en évidence la polarité nettement marquée de ce type de dictyosome. La réaction, faible au niveau des saccules proximaux, est par contre intense au niveau des saccules distaux et des vacuoles golgiennes.

FEASE (1966), MARINOZZI (1967) et RAMBOURG (1967) ont montré, que dans les tissus fixés uniquement à la glutaraldéhyde et inclus dans des résines hydrophiles, l'acide phosphotungstique à bas pH met en évidence, non pas les protéines basiques, mais la fraction polysaccharidique des groupements glycoprotéiques. La spécificité de cette réaction a été établie par MARINOZZI (1968) et RAMBOURG (1968) par des blocages de contrôle dûs à des réactions de sulfatation et d'acétylation. Ces auteurs concluent que ce sont vraisemblablement les groupements hydroxyles des glycoprotéines qui sont responsables de l'affinité de ces substances pour l'acide phosphotungstique.

Au niveau des vacuoles golgiennes, le matériel sécrétoire de ces dictyosomes est donc caractérisé par une densité électronique élevée, une structure granulaire et la présence de glycoprotéines. Cette analogie, à la fois structurale et cytochimique avec les granules corticaux, permet de considérer ces derniers comme issue de ce second type de dictyosome.

2 - Evolution fonctionnelle de l'appareil de Golgi

L'évolution fonctionnelle de l'appareil de Golgi apparaît comme un des produits les plus remarquables de l'ovogenèse des Néréidiens. Les transformations morphologiques subies par les dictyosomes sont résumées dans le schéma de la figure IX.

Durant la phase active de la vitellogenèse, l'utilisation d'acides aminés marqués a permis de préciser (Chapitre VI) la contribution de l'appareil de Golgi à l'élaboration du vitellus. A l'approche de la maturation, les processus de vitellogenèse se ralentissent et à ce stade les formations corticales apparaissent. Cette modification de l'activité sécrétoire est corrélative des transformations morphologiques de l'appareil de Golgi.

Fig. IX - Schéma récapitulatif de l'évolution de l'appareil de Golgi
(N. pelagica).

A - Ovocyte en phase de vitellogenèse protéique active (60 à 100 μ).

Les saccules de la face distale des dictyosomes renferment un matériel de densité électronique élevé. Les lobules vitellins en formation (V) sont situés à proximité des dictyosomes et s'accroissent par incorporation de vésicules golgiennes.

B - Ovocyte en cours d'élaboration des mucopolysaccharides (150 - 170 μ).

La longueur des dictyosomes s'est considérablement accrue. Les saccules de la face distale présentent un aspect dilaté. Ils se fragmentent pour donner naissance à des vacuoles golgiennes (vg) précurseurs des lobules de mucopolysaccharides (Mc). Quelques petits éléments de vitellus protéique (V) poursuivent leur croissance à partir des vésicules élaborées à l'extrémité des saccules golgiens.

C - Dégénérescence de l'appareil de Golgi.

Les dictyosomes s'enroulent sur eux mêmes. Ils sont entourés par de nombreuses vésicules et des corps multivésiculaire (cmv).

Ch : chorion de la paroi ovocytaire

v : villosité

G : Golgi

FP : face proximale des dictyosomes

FD : face distale des dictyosomes

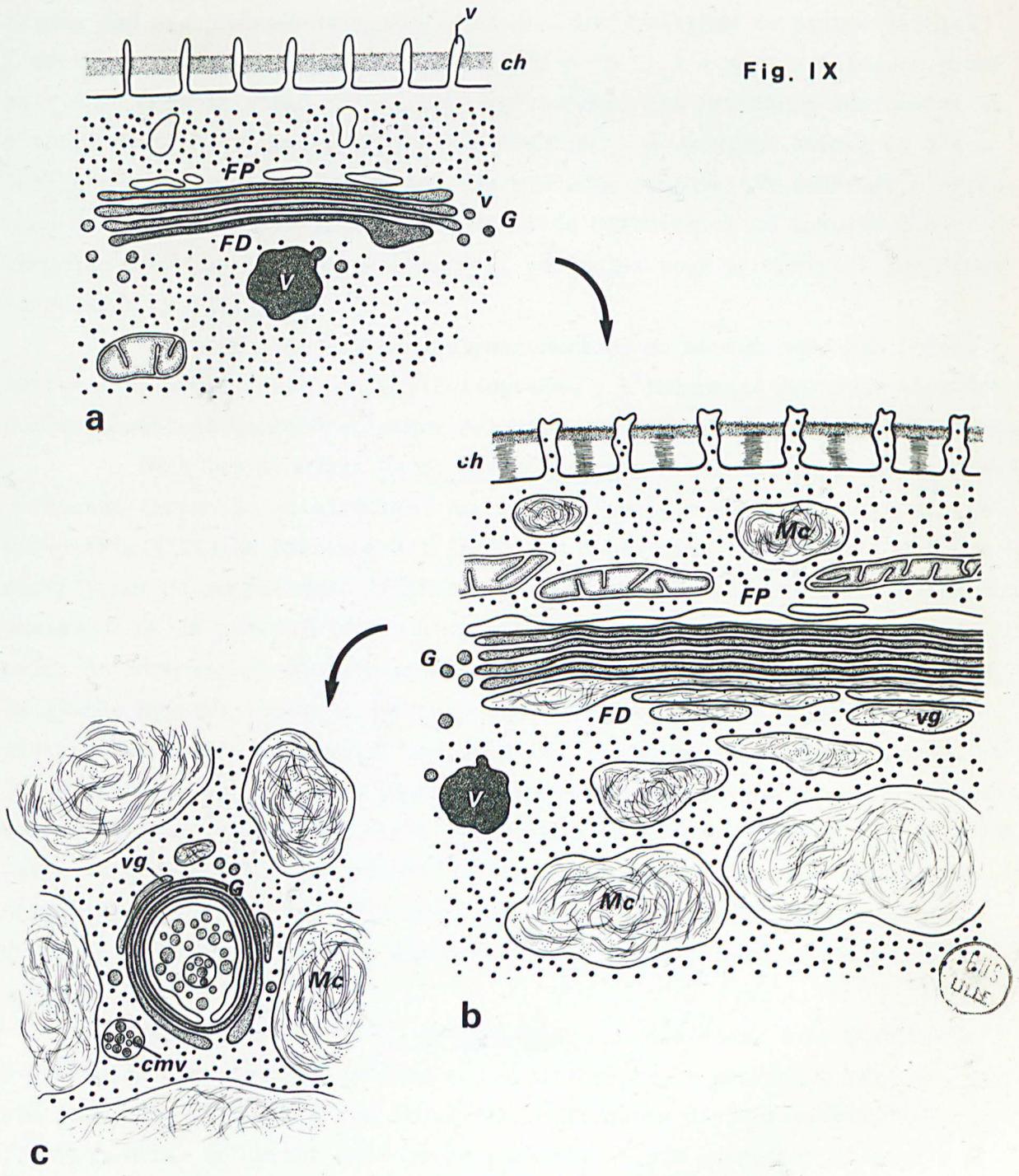
vg : vacuole golgienne

Mc : mucopolysaccharides

V : vitellus protéique.

BUS
VILLE

Fig. IX



Cependant, l'injection de leucine ^3H dans des N. pelagica, ayant dans le coelome des ovocytes d'un diamètre d'environ 170 μ (phase active d'élaboration des mucopolysaccharides) est encore suivie d'un marquage au niveau des dictyosomes et de certains lobules vitellins de petite taille. L'appareil de Golgi, ainsi que DROZ (1967 a et b) l'a mis en évidence, pourrait donc être le siège, d'une part du stockage des protéines néoformées et d'autre part, de l'incorporation des hexoses. A certains stades de l'évolution ovocytaire une ségrégation des produits synthétisés pourrait s'effectuer ; elle se traduirait par des modalités différentes de transfert : vacuoles pour les mucopolysaccharides, vésicules pour le matériel protéique précurseur du vitellus.

L'élaboration des mucopolysaccharides ne serait donc pas corrélative d'un arrêt total de la vitellogenèse ; l'intensité de cette dernière semble toutefois considérablement ralentie par rapport aux stades précédents.

Dans les ovocytes de N. diversicolor, chaque catégorie d'organites corticaux (granules et alvéoles) est issue d'un type particulier de dictyosomes (Fig.VIII). La présence à l'intérieur d'une même cellule de plusieurs dictyosomes de morphologie différente est assez rare et pose le problème non seulement de la spécificité fonctionnelle de ces dictyosomes, mais aussi celui du déroulement de leur processus sécrétoire. FAIN-MAUREL (1969) dans la glande hypobranchiale des Ptéropodes décrit deux types différents de dictyosomes liés à la dualité des produits de sécrétion de cette glande. Toutefois dans ce matériel, les deux catégories de dictyosomes sont localisées dans deux types cellulaires distincts. Par contre, dans la glande salivaire de Sciara, PHILLIPS et SWIFT (1965) ne signalent pas de différences morphologiques entre les cellules. Or, dans ce cas, trois catégories de granules mucoprotéiques sont élaborées par trois types distincts de dictyosomes.

Dans l'ovocyte de N. diversicolor, la présence, à la périphérie de certains dictyosomes, de deux types différents de sécrétion (Pl. 43, fig. c) est peut-être l'indice d'une éventuelle alternance de leur spécificité fonctionnelle. Le déroulement de ce processus reste cependant difficile à établir. PHILLIPS et SWIFT signalent que chez Sciara, les différentes catégories de lobules mucoprotéiques sont synthétisées tour à tour. Ils émettent l'hypothèse que les variations d'activité golgienne seraient sous la dépendance des potentialités du réticulum endoplasmique. Il est possible qu'un

phénomène identique, induisant un processus sécrétoire complexe, puisse intervenir au cours de l'ovogenèse de N. diversicolor.

3 - Les processus d'involution du Golgi

A l'approche de la maturité sexuelle, les figures d'enroulement de l'appareil de Golgi semblent correspondre à une phase d'involution de cet organite. A ce stade, les synthèses cytoplasmiques sont pratiquement achevées. Par suite de la mise en place de la couche corticale de mucopolysaccharides, les corps de Golgi sont refoulés vers l'intérieur du cytoplasme ; cette migration s'accompagne d'une réduction considérable de leur taille. Des aspects similaires de la régression du corps de Golgi ont été signalés dans les ovocytes atrésiques du rat (VASQUEZ-NIN et SOTELO, 1967) et dans les processus de la spermiogenèse après l'édification de l'acrosome (BEAMS et KESSEL, 1968). Par ailleurs, dans certaines conditions expérimentales, MORRE et MOLIENHAUER (1964) ont constaté que les citernes golgiennes se fusionnent par leur extrémité et s'érigent en structures annulaires concentriques. Ces structures sont peut-être à rapprocher également des formations pseudo-myéliniques formées à partir des dictyosomes dans les cellules de la glande salivaire de Limnée (FAIN-MAUREL, 1969).

CONCLUSION

A l'approche de la maturité sexuelle, les ovocytes des Néréidiens sont caractérisés par l'apparition d'alvéoles mucopolysaccharidiques et de granules corticaux ; ces dernières formations n'ont été observées toutefois que dans les ovocytes de N. diversicolor.

Les alvéoles mucopolysaccharidiques sont élaborés par un type de dictyosome dont les saccules de la face distale présentent un aspect dilaté ; la fragmentation de ces saccules libère des vacuoles golgiennes dont les caractéristiques morphologiques sont identiques à celles des alvéoles mucopolysaccharidiques.

Chez N. pelagica, l'incorporation de glucose ^3H , "in vitro" et "in vivo" est suivie d'une localisation initiale du marquage au niveau des dictyosomes. Il semble donc, conformément aux résultats obtenus par NEUTRA et LEBLOND (1966), dans les cellules à mucus de l'intestin, que les saccules de l'appareil de Golgi constituent le siège de la synthèse des hydrates de

carbone complexes. A ce niveau, se réaliserait également le couplage de ces substances avec les radicaux acides du type ester-sulfurique.

Dans les ovocytes matures de N. pelagica et de P. cultrifera, les alvéoles forment une couche corticale d'une épaisseur variant entre 30 et 50 μ . Lors de la fécondation, le contenu des alvéoles est expulsé à travers le chorion et constitue alors la gelée péri-ovocytaire.

Chez N. diversicolor, l'élaboration des granules corticaux est assurée par un type de dictyosome, dont les saccules distaux d'aspect régulier renferment un matériel dense. L'analogie cytochimique du matériel sécrétoire de ces dictyosomes et du contenu des granules corticaux a été établie par une technique de détection des glycoprotéines par l'acide phosphotungstique (RAMBOURG, 1967).

Un aspect dominant de l'évolution ovocytaire des Néréidiens est donc représenté par l'évolution fonctionnelle de l'appareil de Golgi. Celui-ci, engagé initialement dans la voie des synthèses protéiques du vitellus subit ensuite de profonds remaniements morphologiques en rapport avec le changement de la nature chimique de ses produits de sécrétion. Toutefois, cette évolution métabolique n'est pas brutale et absolue. Chez N. pelagica, lors de l'élaboration des mucopolysaccharides, l'injection de leucine ^3H est encore suivie d'une incorporation restreinte au niveau de l'appareil de Golgi et de certains petits lobules vitellins.

Le rôle de l'appareil de Golgi à ce stade apparaît donc double : incorporation des hexoses et stockage des protéines néo-formées. Cette dualité fonctionnelle de l'appareil de Golgi a été signalée par DROZ (1967 a et b) dans d'autres types cellulaires.

Chez N. diversicolor, l'existence de deux catégories d'organites corticaux (granules et alvéoles) issus chacun d'un type particulier de dictyosome pose en outre le problème du déterminisme de la spécialisation métabolique de ces éléments.

CHAPITRE VIII

L'ENVELOPPE OVOCYTAIRE

INTRODUCTION

La paroi ovocytaire des très jeunes ovocytes présente une structure très simple, ces ovocytes en effet sont limités uniquement par une membrane plasmique lisse. Très rapidement cette structure se transforme par suite de l'apparition de villosités et d'un revêtement de nature glycoprotéique. Avant d'aborder nos observations, il importe de définir les termes utilisés dans cette étude de l'enveloppe ovocytaire. Comme le signale PASTEELS (1966b), une certaine ambiguïté s'est en effet introduite dans la nomenclature se rapportant à ce sujet. Le terme de "membrane vitelline" en particulier est encore parfois utilisé abusivement pour désigner les formations exovulaires soulevées par la réaction corticale au moment de la fécondation.

Pour suivre la terminologie proposée par PASTEELS, nous adopterons le terme de membrane plasmique (= plasmolème) pour désigner l'"unit membrane" entourant le cytoplasme ovocytaire. L'appellation de chorion sera réservée à la couche de glycoprotéines traversée par les villosités et reposant sur la membrane plasmique.

I - STRUCTURE DE LA PAROI DES OVOCYTES JEUNES

Les ovogonies et les ovocytes en prophase de méiose sont limités par une membrane plasmique simple. L'épaisseur de cette membrane se situe aux environs de 90 \AA ; l'examen à fort grossissement montre qu'elle est formée de 3 feuillets, sa structure est donc celle d'une "unit membrane" selon le schéma de ROBERTSON (1959).

Les cellules germinales sont séparées les unes des autres par de minces travées cytoplasmiques d'une épaisseur d'environ $500 \text{ m}\mu$ (Pl. 44, fig. a). Ces formations plasmiques sont constituées vraisemblablement par les diverticules de cellules annexes associées aux cellules germinales. Des éléments

similaires ont été décrits dans les ovaires d'Echinodermes (MILLONIG, 1968). Ils pourraient représenter l'équivalent d'un stroma ovarien.

L'association étroite entre les parois des cellules germinales et des cellules intercalaires est illustrée par la présence fréquente de desmosomes (Pl. 44, fig. a).

Au début de la diacinèse, les cellules germinales augmentent de volume et acquièrent une forme arrondie. Elles se dissocient progressivement du tissu intercalaire dont les vestiges persistent sous la forme de longs rubans (Pl. 44, fig. b). La paroi des jeunes ovocytes est alors caractérisée par l'apparition en certaines zones de faible étendue (quelques μ) d'un plissement serré en doigt de gant, de la membrane plasmique. Comme le montrent les micrographies de la planche 44, fig. c et d, ces replis aboutissent à l'édification de villosités, initialement de forme assez massive chez N. diversicolor, d'aspect plus élancé dans le cas de N. pelagica.

Simultanément à l'apparition des villosités, on note entre ces dernières, la formation d'un chorion de faible densité. Celui-ci dans le cas de N. diversicolor semble élaboré par la paroi latérale des villosités ; chez N. pelagica, ce matériel est limité vers l'extérieur par une mince bande de densité électronique élevée.

Corrélativement à l'augmentation de la taille des ovocytes, les villosités s'étendent progressivement à toute la surface de la paroi ovocytaire ; cette dernière acquiert ainsi progressivement la structure typique que nous allons décrire maintenant.

II - STRUCTURE DE LA PAROI DES OVOCYTES EN PHASE DE VITELLOGENÈSE

(Ovocyte de 30 à 140 μ)

A - ÉTUDE MORPHOLOGIQUE

1 - Les villosités

Elles dérivent comme nous l'avons vu d'un repli de la membrane plasmique. Les villosités ont un diamètre d'environ 50 μ , leur longueur se situe aux alentours de 200 μ (Pl. 27 ; Pl. 45, fig. a et b et Fig. X a). Elles renferment un hyaloplasme de faible densité parcouru par de très minces filaments orientés parallèlement à leur grand axe.

Dans les ovocytes d'un diamètre inférieur à 170 μ , le contenu des villosités diffère profondément de celui du cytoplasme cortical, en

particulier par l'absence de ribosomes. Cette différence structurale n'est cependant pas liée à l'existence de cloisons à la base des villosités.

L'extrémité distale des villosités présente un aspect légèrement renflé. A ce niveau, la densité du hyaloplasme est plus élevée que dans le reste de la villosité. On note fréquemment la présence d'un matériel dense accolé au feuillet interne de la membrane plasmique (Pl. 45, fig. a). De l'autre côté de la membrane, le feuillet externe est recouvert par un matériel assez diffus, orienté radiairement par rapport à ce dernier (Pl. 45, fig. a et b).

2 - Le chorion

Son épaisseur se situe aux environs de 200 μ . Il est constitué d'un matériel assez homogène réparti en 2 couches concentriques : une couche interne de faible densité, accolée à la membrane plasmique, et une couche externe d'aspect légèrement granuleux, de densité plus élevée. Cette dernière est limitée vers l'extérieur par une très mince bande de densité électronique élevée (Pl. 45, fig. k et Pl. 56, fig. a).

3 - Les invaginations de la membrane plasmique

Elles sont de deux sortes. Les premières forment des vésicules d'aspect arrondi (Pl. 45, fig. a et fig. d). La membrane qui les entoure est recouverte du côté du cytoplasme par un feutrage de courtes fibrilles ("coated vesicles" des auteurs anglo-saxons) ; leur centre apparaît dense aux électrons et finement grenu. Ces formations constituent des vésicules de pinocytose. Leur présence est constante à ce stade de l'ovogenèse, mais leur nombre, comme nous l'avons signalé lors de l'étude de la vitellogenèse est peu élevé.

Le deuxième type d'invagination est constitué par des replis profonds de la membrane plasmique à l'intérieur du cytoplasme (Pl. 45, fig. e). Ce type de formation, beaucoup plus rare encore que le précédent se caractérise par l'absence du revêtement des membranes. Ces replis semblent illustrer une continuité entre la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique. On note à ce niveau une modification de structure de la membrane du plasmolème qui, dans sa partie invaginée, acquiert une épaisseur analogue à celle de la membrane du réticulum.

B - ETUDE CYTOCHIMIQUE

1 - En microscopie optique, l'enveloppe ovocytaire apparaît colorée fortement par le PAS (persistance après action de l'amylase salivaire) et plus faiblement par le bleu Alcian. Elle présente d'autre part une métachromasie élevée après coloration par le bleu de toluidine.

2 - Au microscope électronique, l'enveloppe ovocytaire se colore très fortement par l'acide phosphotungstique à faible pH (RAMBOURG, 1967) (Pl. 43, fig. a). Dans les ovocytes jeunes, la coloration est plus intense au niveau de la couche externe du chorion que dans la zone interne.

Les réactions permettent donc de conclure à la présence de composés polysaccharidiques, vraisemblablement représentés par des glycoprotéines, au niveau de l'enveloppe ovocytaire.

- Détection d'activité enzymatique

Les ovocytes de N. pelagica ont été incubés à 37° C pendant 60 minutes dans le mélange de WACHSTEIN et MEISEL (1957) contenant de l'adénosine triphosphate (ATP) comme substrat. Des incubations de contrôle ont été effectuées dans le même milieu dépourvu de substrat. La présence de précipités de phosphate de plomb, indice d'une activité ATP asique, a été notée au niveau de l'enveloppe ovocytaire (Pl. 45, fig. c). Elle est localisée essentiellement à la base du chorion, au niveau de la membrane plasmique.

III - MODIFICATIONS DE LA STRUCTURE DE LA PAROI AU COURS DE LA MATURATION DE L'OVOCYTE

Lorsque les ovocytes des espèces étudiées ont atteint un diamètre d'environ 170 μ , l'enveloppe ovocytaire est l'objet de profonds remaniements morphologiques tant au niveau du chorion que des villosités.

1 - Le chorion

Son épaisseur augmente considérablement ; elle atteint 500 μ , soit environ 2 fois et demie celle d'un ovocyte de 60 μ .

L'examen de sections tangentiellles du chorion montre que celui-ci présente maintenant une structure alvéolaire (Pl. 46, fig. b et Fig. X b'). Dans cette disposition en nid d'abeille, le centre de chaque logette est occupé par une villosité. La paroi des alvéoles est formée de fines fibrilles

Fig. X - Schéma de l'évolution du chorion et des villosités au cours de la croissance ovocytaire (N. pelagica).

a - Structure de l'enveloppe ovocytaire des ovocytes de 40 à 170 μ .

Ch : chorion ; v : villosité ; mp : membrane plasmique.

(a' : section tangentielle).

b - Ovocyte de 170 à 200 μ .

Les villosités augmentent de taille et sont envahies par le cytoplasme cortical riche en ribosomes. Dans le chorion l'apparition de cloisons fibrillaires denses conduit à une structure alvéolaire, bien visible en section tangentielle (b').

c - Ovocytes submatures. Les ribosomes sont refoulés progressivement vers la base des villosités qui acquièrent un aspect très circonvolé.

(c' : section tangentielle).

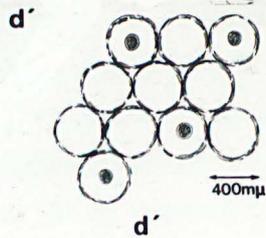
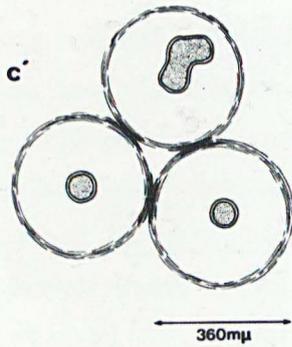
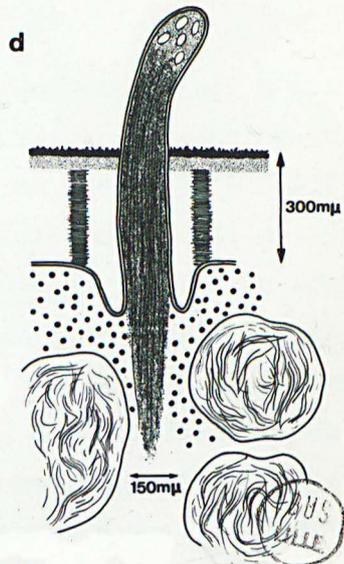
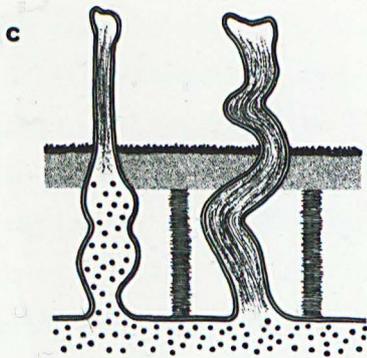
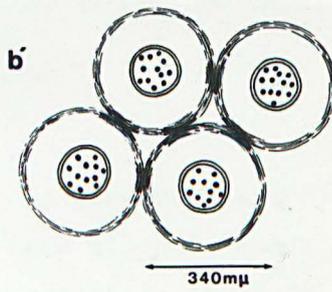
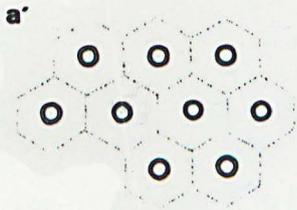
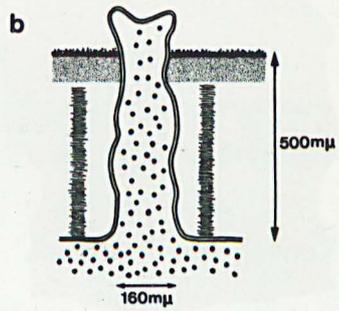
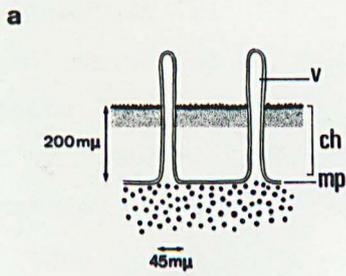
d - Ovocytes matures. Seules persistent un certain nombre de villosités qui sont caractérisées par un contenu de densité élevée, parcouru par un réseau d'épaisses fibrilles.

(d' : section tangentielle de plusieurs logettes du chorion).

N.B. - Toutes les figures sont représentées à la même échelle, seule la figure d' a été réduite pour montrer le nombre peu élevé des villosités persistant lors de la maturation.

BUS
LILLE

Fig. X



enroulées concentriquement. En coupe transversale, la section des parois alvéolaires forme des sortes de cloisons disposées perpendiculairement à la membrane plasmique (Pl. 39, fig. a et Pl. 46, fig. a). Vers l'extérieur, le chorion est limité par une mince zone de densité électronique élevée. Au delà de cette limite, on observe chez N. diversicolor la présence de fins tubules d'un diamètre d'environ 50 Å, groupés en des faisceaux situés dans le prolongement de la paroi des alvéoles (Pl. 46, fig. a).

Chez N. pelagica, les alvéoles ne s'étendent pas jusqu'à la bordure dense du chorion. Ils restent séparés de cette dernière, par une zone de structure homogène d'une épaisseur d'environ 100 μ (Pl. 56, fig. b et Fig. X b).

2 - Les villosités

Lors de l'apparition de la structure alvéolaire du chorion, les villosités présentent un aspect très allongé, assez grêle. Leur longueur se situe aux environs de 700 mμ, leur diamètre étant de l'ordre de 60 mμ. Chez N. diversicolor, l'extrémité distale des villosités présente une forme bilobée. A ce niveau, le feuillet externe de la membrane est entouré par un lacis de filaments venant se rattacher aux fins tubules de la zone externe du chorion (Pl. 46, fig. a).

Cette structure évolue rapidement. Les villosités s'élargissent (leur diamètre atteint environ 160 mμ) et leurs parois acquièrent un aspect plissé. Le contenu des villosités devient alors identique à celui du cytoplasme cortical ; on y décèle la présence de ribosomes (Pl. 46, fig. b et Fig. X b et b') et, dans le cas de N. diversicolor, celle de particules de glycogène. La mise en évidence des formations de glycogène est particulièrement nette après la technique de coloration par la thiocarbohydrazide - protéinate d'argent (Pl. 46, fig. d) (THIERY, 1967). L'emploi de cette technique permet de constater que le glycogène n'apparaît pas simultanément dans toutes les villosités. Il semble donc que la transformation morphologique des villosités résulte de leur envahissement progressif par le matériel cytoplasmique cortical.

Chez N. pelagica, à l'approche de l'épitoque, de nouveaux remaniements surviennent : les ribosomes sont progressivement refoulés vers la base des villosités par suite du développement d'un réseau fibrillaire qui

s'étend progressivement depuis le pôle apical jusque dans la zone basale des villosités. Ces dernières acquièrent alors un tracé très sinueux ; leur diamètre très régulier se situe aux alentours de 70 μ (Fig. X c et Pl. 46, fig. e).

Dans les ovocytes matures de N. diversicolor, les villosités se raccourcissent et leur extrémité distale ne dépasse plus la zone externe du chorion. Ces villosités, d'une épaisseur de 0,15 μ ont un contenu très densément fibreux, disposé en un réseau orienté dans le sens radiaire. Elles se prolongent par une racine longue et assez tortueuse qui s'insinue entre les alvéoles corticaux (cf. les descriptions de PASTEELS, 1966b).

Chez N. pelagica, les villosités d'une structure analogue à celle de N. diversicolor présentent par contre un développement beaucoup plus considérable, leur longueur atteignant 500 à 600 μ . On observe fréquemment dans l'élargissement de leur extrémité distale un réseau de petites vacuoles (Pl. 46, fig. f).

Dans les ovocytes matures de N. pelagica et de N. diversicolor, ce remaniement ultime n'affecte qu'un nombre restreint de villosités ; la majeure partie de celles-ci dégénèrent à ce stade. En section tangentielle, l'examen des alvéoles du chorion révèle qu'une logette seulement sur 4 ou 5 renferme une villosité mature (Fig. X d').

IV - LES REMANIEMENTS DE LA PAROI OVOCYTAIRE LORS DE LA FECONDATION

Nous ne décrivons que brièvement les modifications de la région corticale à ce stade ; celles-ci, contrairement à l'évolution antérieure de l'enveloppe ovocytaire, ayant fait l'objet de nombreux travaux chez les Néréidiens (TAKASHIMA, 1962 ; PASTEELS, 1966b ; FALLON et AUSTIN, 1967).

Chez N. diversicolor, les alvéoles corticaux éclatent et déversent leur contenu dans un espace péri-vitellin renfermant de nombreux débris émanant des cloisons interalvéolaires et de la membrane plasmique (PASTEELS, 1966). Les micrographies de la planche 47, fig. a et b illustrent chez N. pelagica ce stade de la formation de l'espace péri-vitellin. Le matériel contenu dans ce dernier est extrudé le long des villosités ; il s'épanche à la périphérie du chorion pour former la gelée péri-ovocytaire (FALLON et AUSTIN, 1967). Les villosités s'épanouissent en des prolongements filiformes

qui traversent le chorion et s'étendent dans toute l'épaisseur de cette gelée.

Chez N. pelagica, quelques heures après la fécondation, les villosités régressent tandis que le chorion persiste. Il garde sa structure alvéolaire, mais le centre des logettes est vide (Pl. 47, fig. d). Lors des premières divisions de segmentation, le chorion reste accolé à la membrane plasmique des blastomères, il constitue ainsi la paroi initiale de la jeune larve (Pl. 47, fig. c).

V - DISCUSSION

1 - Etude comparative de la structure de l'enveloppe ovocytaire

La structure de l'enveloppe des ovocytes immatures est identique dans toutes les espèces de Néréidiens examinées : N. japonica (TAKASHIMA, 1962), N. diversicolor (BOILLY, 1964 ; PASTEELS, 1966b), N. limbata (FALLON et AUSTIN, 1967), N. pelagica et P. cultrifera (cette étude). Par contre, à l'exception des observations de BOILLY (1964) sur N. diversicolor, nous n'avons trouvé aucune donnée concernant l'évolution structurale de l'enveloppe ovocytaire des Néréidiens à l'approche de la maturation sexuelle ; les auteurs cités précédemment ayant centré leurs observations sur les processus de fécondation.

Une structure comparable à celle des Néréidiens a également été observée chez d'autres Annélides : Sabellaria alveolata (PASTEELS, 1965a ; FRANKLIN, 1966), Syllis amica (DHAINAUT, inédit), Golfingia ikedai (SAWADA et al., 1968) ; de même que dans des ovocytes de Mollusques : Barnea candida (PASTEELS et DE HARVEN, 1962) ; Spisula solidissima (REBHUM, 1962) ; Mytilus edulis (HUMPHREYS, 1962).

La paroi des ovocytes de Néréidiens est constituée par un chorion glycoprotéique traversé par des villosités dues à des replis de la membrane plasmique. Nous allons envisager maintenant le rôle respectif de ces constituants de la paroi.

2 - Le chorion

Le chorion des Néréidiens est constitué de deux couches concentriques de densité différente, la couche externe étant la plus dense. Cette dualité de structure semble fréquente ; outre les Invertébrés

précédemment cités, elle a également été décrite dans des ovocytes de Vertébrés : Lamproie (BUSSON-MABILLOT, 1967), Téléostéens (ULRICH, 1969). Par contre la structure alvéolaire du chorion, caractéristique des ovocytes proches de la maturité, semble assez exceptionnelle et n'a guère été observée à notre connaissance que chez les Néréidiens.

Le chorion des ovocytes d'Annélides est comparable, dans une certaine mesure, à la zone pellucide entourant les ovocytes de Vertébrés : Téléostéens, Amphibiens, Mammifères (voir revue bibliographique dans NØRREVANG, 1968). Toutefois, la structure de la zone pellucide est parfois, comme chez les Téléostéens, extrêmement complexe (ULRICH, 1969) ; d'autre part, contrairement au cas des Néréidiens, la zone pellucide serait élaborée à la fois par les ovocytes et les cellules folliculeuses (NØRREVANG, 1968).

Le chorion est riche en composés polysaccharidiques et en glycoprotéines. Il forme un revêtement cellulaire appliqué étroitement contre la membrane plasmique. Ce matériel représente vraisemblablement de part sa situation et sa nature chimique un "glycocalyx" selon la définition de BENNETT (1963). De même, le matériel filamenteux recouvrant les villosités à leur extrémité distale est comparable au "cell coat" (alias glycocalyx) décrit par ITO et REVEL (1965) à la surface des villosités intestinales.

Si la nature chimique du glycocalyx est relativement bien connue, de même que ses différents aspects morphologiques (BENNETT, 1969) son rôle par contre demeure assez mal défini.

Chez les Amibes, BRANDT et PAPPAS (1960) considèrent que le revêtement polysaccharidique épais qui entoure ces cellules ("extraneous coat") joue un rôle actif dans les processus d'absorption en concentrant le matériel exogène à la surface de l'organisme. L'utilisation "in vivo" de traceurs, tel le thoro-thrast, montre l'absorption de ces derniers au niveau de la couche muqueuse péri-cellulaire.

Par contre, chez les Annélides, à la suite d'une injection intracoelomique de thoro-thrast, nous n'avons pas observé la pénétration de cette substance à l'intérieur du chorion.

REVEL et ITO (1965) ont signalé un comportement analogue du "cell coat" des villosités intestinales. Pour ces auteurs, "le rôle joué par le revêtement de la surface des villosités reste obscur ; il n'existe pas d'indication nette permettant de comparer sa fonction à celle de la couche externe

des amibes". Pour BENNETT (1969), les structures poreuses du glycocalyx joueraient essentiellement un rôle de filtre, elles pourraient également retenir au voisinage de la membrane cellulaire certains produits solubles comme les enzymes.

3 - Les villosités

Les villosités représentent, d'une façon générale, une structure caractéristique de la surface ovocytaire. Elles sont particulièrement développées dans le cas d'ovocytes entourés par une zone pellucide épaisse (Poissons et Mammifères). Les villosités permettent un accroissement considérable de la surface de contact entre les cellules et le milieu externe. A leur niveau, s'effectuent très probablement chez les Néréidiens des échanges entre l'ovocyte et le liquide coelomique. Dans cette hypothèse, comme le note BOILLY (1967) dans son étude des microvillosités de la cuticule de Syllis amica, les plages hyaloplasmiques denses accolées au feuillet membranaire interne de l'extrémité distale des villosités pourraient représenter un dépôt temporaire de substances transférées vers la cellule. Cependant si la présence de villosités caractérise fréquemment les cellules spécialisées dans les processus d'absorption, ces formations sont également observées au niveau d'organes ne présentant pas de telles fonctions : canalicules sécrétoires des cellules de l'estomac (ITO et WINCHESTER, 1963) ; cellules sensorielles (DE ROBERTIS et LASANSKY, 1958). D'autre part, même dans les cellules dont la fonction absorbante est démontrée, telles les cellules intestinales, le rôle des villosités dans cette fonction demeure peu connu. L'absorption des protéines semble s'effectuer en majeure partie par l'intermédiaire des vésicules de micropinocytose (ANDERSON, 1964 ; ROTH et PORTER, 1964 ; STAY, 1965). Les villosités seraient plutôt orientées, selon CARDELL et al. (1967), dans l'absorption, par diffusion sélective, des monoglycérides et acides gras des micelles. Ce rôle dans l'assimilation des lipides a été confirmé récemment en autoradiographie à haute résolution par CARLIER et al. (1969) au niveau de l'intestin du rat. Toutefois, les travaux expérimentaux précédents n'éclairent encore qu'imparfaitement nos connaissances sur le rôle des villosités. Le mécanisme fonctionnel de ces dernières restant à l'heure actuelle un des problèmes majeurs de la biologie cellulaire.

CONCLUSION

L'enveloppe ovocytaire des Néréidiens est constituée d'un chorion de nature glycoprotéique traversé par des villosités formées par un repli de la membrane plasmique.

A l'approche de la maturité sexuelle, le chorion acquiert une structure alvéolaire. Dans une première phase, les villosités dont la taille s'est accrue considérablement se trouvent envahies par le cytoplasme cortical ; leur contenu présente un aspect analogue à ce dernier. Celui-ci est ensuite refoulé par suite du développement d'un réseau de filaments s'étendant depuis le pôle apical des villosités. Après la fécondation, le chorion persiste dépourvu de villosités. Il constitue alors la paroi des premiers blastomères.

Le chorion, de par sa nature chimique, peut être assimilé à un glycocalyx. Il n'a pas été possible, par l'utilisation de traceurs, de visualiser le passage de substances à travers cette formation. Peut-être selon l'hypothèse de BENNETT (1969), le chorion pourrait-il jouer un rôle de filtre vis à vis des substances du liquide coelomique.

Les modifications morphologiques subies par les villosités semblent indiquer le rôle important de ces formations dans les processus d'absorption. Cependant, le mécanisme exact de ce processus reste obscur ; sa complexité rejoint le problème très général des phénomènes d'absorption au niveau des membranes.

La mise en évidence d'ATPase au niveau des membranes constitue un indice de l'activité énergétique de ces dernières (NOVIKOFF et al., 1962 ; MARCHESI et PALADE, 1967). Dans le cas de l'enveloppe ovocytaire, cette activité est vraisemblablement en relation avec les transports actifs s'opérant à ce niveau.

CHAPITRE IX

LES ELEOCYTES. RAPPORTS ELEOCYTES-OVOCYTES

INTRODUCTION

Chez les Néréidiens, les ovocytes qui évoluent librement dans le coelome sont entourés par de nombreuses cellules, constituées en majeure partie par les éléocytes. Ce terme d'éléocyte a été proposé par ROMIEU en 1923 en remplacement de celui de cellules adipo-sphéruleuses utilisé par KOLLMANN (1908).

Dès 1868, CLAPAREDE signale l'existence de cellules coelomiques caractérisées par l'abondance de leurs inclusions lipidiques. Il désigne l'ensemble de ces cellules sous l'appellation de "tissu connectif adipo-sexuel", présumant ainsi une relation étroite entre ces cellules et les gonocytes. A sa suite KUKENTHAL (1885) considère que ce parenchyme lâche est vraisemblablement en relation avec le développement des cellules germinales femelles, en particulier avec l'élaboration du vitellus. Mc INTOSH (1907) parle également d'un "ovigerous tissue". Cette conception du rôle des éléocytes a été reprise par toute une série d'auteurs dont les examens effectués en microscopie photonique (voir bibliographie de ces travaux dans ROMIEU, 1923) établissent la raréfaction des substances de réserves de ces cellules à l'approche de la maturité sexuelle, et la dégénérescence, à ce stade, d'un nombre important d'entre elles. ROMIEU (1923) conclut à ce sujet : "Il est inutile d'insister sur le rôle nutritif de ces cellules... Les éléocytes font l'office d'un tissu adipeux transitoire dont les réserves sont utilisées pour la métamorphose ou pour l'édification du vitellus".

Ce problème de la relation éléocytes-ovocytes méritait d'être repris à l'échelle de la microscopie électronique. Nous envisagerons successivement la structure et l'activité physiologique de ces cellules, leur évolution à l'approche de la maturité sexuelle et enfin les modalités d'un échange éventuel de matériel entre les éléocytes et les ovocytes.

I - STRUCTURE ET ACTIVITE PHYSIOLOGIQUE DES ELEOCYTES DES INDIVIDUS ATCQUES

Les éléocytes, contrairement aux cellules germinales, ont fait l'objet d'études fort nombreuses en microscopie optique. Nous restreindrons donc notre exposé aux données les plus marquantes apportées par la microscopie électronique.

A - ZONE DE FORMATION DES ELEOCYTES

Chez les Annélides (Polychètes et Oligochètes), les vaisseaux sanguins ne sont pas délimités par un endothélium (HAMA, 1960 ; VAN GANSEN, 1962), mais par un repli de l'épithélium coelomique. La paroi du réseau vasculaire comporte de l'intérieur vers la périphérie : des fibres collagènes, des faisceaux de très fins filaments, les membranes basales des cellules périvasculaires (Pl. 48, fig. b et c) (DHAINAUT-COURTOIS, 1966). Les cellules périvasculaires appartenant à l'épithélium péritonéal renferment fréquemment des myofibrilles et VAN GANSEN (1962) désigne leur assemblage sous le terme de myomésenthélium.

Les éléocytes en formation sont intercalés entre les cellules périvasculaires du myomésenthélium. Leur lame basale repose directement sur la couche de filaments limitant l'espace vasculaire ; elle présente souvent des invaginations lobulées formées par une hernie des fibres collagènes et fibrillaires (Pl. 48, fig. b).

Les éléocytes en croissance sont disposés perpendiculairement à la paroi du vaisseau sanguin. D'abord de forme assez massive, ils s'allongent progressivement par suite d'une pédiculisation de leur zone basale (Pl. 48, fig. a). Cet aspect morphologique avait été bien observé en microscopie photonique par DEHORNE et DEFRETIN (1933). Le cytoplasme des éléocytes en formation est caractérisé par la présence de nombreuses citernes ergastoplasmiques de forme arrondie et de petite taille (environ 0,2 μ) dont l'aspect rappelle celui des microsomes (Pl. 48, fig. a, b et c). Des formations de glycogène, représentées par des granulations de type β apparaissent disséminées entre les citernes ergastoplasmiques. Elles s'assemblent secondairement en particules α (rosettes) en même temps que se différencient de petits lobules lipidiques. On note également l'apparition d'une vacuole de grande taille qui renferme des granulations opaques aux électrons (Pl. 48, fig. a).

A ce stade, l'éléocyte se détache de la paroi du vaisseau et évolue librement dans le coelome.

B - STRUCTURE DES ÉLÉOCYTES LIBRES

Dans ces éléocytes, on assiste à une régression considérable du développement de l'ergastoplasme. Celui-ci ne persiste que sous la forme de citernes allongées, associées entre elles, rarement à plus de 2 ou 3. Ces citernes, parfois situées dans la zone corticale du cytoplasme, sont observées le plus souvent dans la zone périnucléaire. Le noyau renferme un nucléole de petite taille ; la chromatine est individualisée sous forme d'amas très denses (Pl. 49, fig. a). Les mitochondries, peu nombreuses, sont situées en majeure partie, de même que l'appareil de Golgi, à proximité du noyau (Pl. 49, fig. b).

Les éléocytes libres se caractérisent par l'abondance de leurs substances de réserves. Ces dernières sont constituées à la fois par de nombreux lobules lipidiques d'une taille d'environ 1,8 μ et de très nombreuses rosettes de glycogène. Les lipides et le glycogène sont assemblés en des plages de grande taille d'environ 6 à 8 μ (Pl. 49, fig. a et b). Dans les vers ayant jeûné pendant 25 à 30 jours, l'importance des réserves glyco-géniques décroît considérablement, par contre la régression des lobules lipidiques est beaucoup moins spectaculaire.

Chaque éléocyte renferme une vacuole de grande taille à contour extrêmement irrégulier. Le contenu vacuolaire, d'aspect très polymorphe, est d'une densité électronique extrêmement élevée. Parfois disséminé en des amas de contour irrégulier (Pl. 49, fig. b), il apparaît le plus souvent constitué par des granulations sensiblement sphériques, d'une taille variant entre 1 et 20 μ .

En microscopie photonique, ce matériel montre une réaction positive au test de la murexide ; ses caractères de solubilité aux alcalis et aux acides (LISON, 1960) conduisent à le considérer comme de nature purique.

La présence de ces inclusions cellulaires n'avait pas échappé à l'attention des anciens auteurs, en particulier de DEHORNE (1930) et de ROMIEU (1923). Ce dernier les considère comme des sels d'urate de sodium pouvant présenter des formes cristallines variées. Au microscope électronique, ce matériel revêt toujours une forme amorphe ; l'aspect cristallin observé

par ROMIEU pourrait être un artéfact dû aux fixateurs histologiques.

C - LES PROCESSUS D'ENDOCYTOSE

1 - Morphologie

La zone marginale du cytoplasme renferme différents types de vacuoles et de vésicules de morphologie variée (Pl. 50, fig. a). Les plus grandes de ces vacuoles d'un diamètre d'environ 1,5 à 2 μ sont souvent vides, mais elles renferment parfois un matériel de structure fibrillaire ou amorphe. Elles sont entourées par des vésicules arrondies d'une taille variant entre 0,1 et 0,4 μ . On note enfin la présence de nombreuses vésicules cupuliformes caractérisées par leur densité électronique élevée.

2 - Injection de thoro-thrast

Le rôle de ce système vacuolaire dans les processus d'endocytose a pu être démontré par l'emploi de l'oxyde de thorium (thoro-thrast *) utilisé comme traceur.

Dans ce but, une série de N. pelagica a reçu une injection de 10 μ l de thoro-thrast dilué au 1/40 dans l'eau de mer. Les fixations ont été effectuées après 1-12 et 24 heures d'évolution.

- 1 heure : La capture des particules de thoro-thrast s'effectue au niveau d'invaginations de la membrane plasmique caractérisées par le revêtement finement fibrillaire de leur paroi (Pl. 50, fig. b et c). Ces vésicules de pinocytose viennent ensuite déverser leur contenu dans les vacuoles de plus grande taille qui se présentent ainsi comme l'équivalent de vacuoles digestives.

- 12 heures après l'injection du traceur, le milieu coelomique paraît épuré en quasi-totalité (Pl. 50, fig. e). Les vésicules de pinocytose en formation sont vides, par contre les vacuoles digestives ont un aspect distendu par suite de l'accumulation du thoro-thrast à leur niveau. La présence de particules de traceur n'a pas été observée dans les vésicules cupuliformes, ni à l'intérieur de la grande vacuole à inclusion purique, même 24 heures après l'injection.

* "Thoro-thrast" Testagar and Co, Détroit, Michigan.

3 - Détection enzymatique

L'intervention des processus enzymatiques au cours des processus d'endocytose est bien connue (voir CARASSO et coll., 1964 ; HOURDRY, 1968). Nous avons procédé à la détection des phosphatases acides par incubation des cellules coelomiques dans le milieu de Gomori renfermant du β glycérophosphate de sodium comme substrat.

Dans les éléocytes, une activité enzymatique est mise en évidence au niveau des vacuoles digestives de même que dans les petites vacuoles arrondies de la zone corticale du cytoplasme (Pl. 50, fig. d et f). Des précipités de phosphate de plomb ont également été observés au niveau des vésicules de pinocytose (Pl. 50, fig. f).

D - LES GRANULES PROTEIQUES DU CYTOPLASME

1 - Morphologie

Les éléocytes de N. diversicolor et de P. cultrifera sont caractérisés par l'existence de granules d'une taille importante atteignant environ 2 μ . Ces éléments disparaissent dans les éléocytes des vers inanitiés pendant 20 à 25 jours ; ils sont toujours très rares dans ceux des N. pelagica atokes.

Ces granulations de nature protéique comme en témoignent les réactions histochimiques (Millon, bleu de bromophénol, vert solide) avaient fait l'objet d'observations attentives de la part des anciens auteurs. ROMIEU (1923) mentionne à juste titre leur abondance dans les éléocytes de N. diversicolor ; il signale leur coloration "in vivo" par le bleu de crésyl brillant et les désigne sous le terme de granulations oxyphiles. PRENANT, dès 1922, détecte la présence de fer à leur niveau.

En microscopie électronique, ces granules apparaissent limités par une membrane d'aspect sinueux. Ils renferment de nombreuses particules fréquemment groupées en une structure para-cristalline (Pl. 5, fig. a et b). L'examen à fort grossissement montre que certaines d'entre elles se présentent de face sous l'aspect d'un hexagone d'une taille d'environ 200 Å, dont le centre est occupé par une zone de plus faible densité (Pl. 51, fig. d). Vues de profil, ces particules ont une forme ressemblant à la lettre X (Pl. 51, fig. c). Cet aspect correspond à celui des molécules d'hémoglobine décrites par ROCHE et coll. (1960) et par BRETON-GORIUS (1963)

dans le sang de divers Annélides (Arenicola marina et N. diversicolor).

2 - Mode de formation

Chez l'Arénicole, BRETON-GORIUS (1963) a montré le rôle important joué par l'appareil de Golgi dans l'élaboration des vacuoles à hémoglobine des cellules chloragogènes. De même chez N. diversicolor, nous avons constaté une activité sécrétoire considérable au niveau des dictyosomes lors de l'apparition des granules protéiques. Dans les éléocytes jeunes, toute la région golgienne est occupée par des lobules d'un contenu homogène de densité moyenne (Pl. 52, fig. a). Dans les éléocytes libres, l'extrémité des saccules golgiens semble élaborer, selon les dictyosomes ou leur stade d'évolution fonctionnelle, deux types distincts de formations: des vésicules arrondies de densité moyenne et des granules renfermant un matériel très dense parcouru par un réseau d'épais filaments disposés en croisillon (Pl. 52, fig. b). Ces deux types de formation semblent venir se fusionner dans les granules en croissance, à ce stade par un contour ^{caractérisés} extrêmement lobulé (Pl. 52, fig. b). Au cours de leur maturation, les granules acquièrent progressivement une forme arrondie ; l'aspect typique des particules d'hémoglobine n'est observé que lorsque les lobules ont atteint une taille d'environ 1,5 μ .

En autoradiographie à haute résolution, l'incorporation de leucine ^3H (L⁽⁻⁾-leucine ^3H 200 mCi/mM) se traduit, 6 heures après l'injection, par un marquage abondant localisé en majeure partie au niveau des saccules golgiens et des grains de sécrétion proches de ces derniers (Pl. 52, fig. c). Après 24 à 48 heures d'incorporation, les grains d'argent sont situés en quasi-totalité au niveau des granules protéiques.

E - DISCUSSION

Deux points de l'activité physiologique des éléocytes retiendront particulièrement notre attention : les processus de phagocytose d'une part, l'élaboration des granules à hémoglobine d'autre part.

1 - Activité phagocytaire

L'activité phagocytaire des éléocytes de Néréidiens est connue depuis les travaux de ROMIEU (1923). Celui-ci, à la suite d'une injection de carmin dans le coelome de P. cultrifera et de N. diversicolor, observe la localisation de ce produit dans les éléocytes.

Au microscope électronique, nous avons constaté que les particules de thorostrast sont captées par des vésicules de pinocytose, puis transférées dans les vacuoles digestives de grande taille. Ce processus est tout à fait comparable à celui observé après utilisation de traceurs dans les cellules néphrindiennes de N. diversicolor (DELBOS, 1969) et de Sabella pavonina (KOECKLIN, 1969).

L'origine et le rôle des vésicules cupuliformes de densité élevée n'ont pu cependant être élucidés. Des formations similaires ont été décrites par FAVARD et CARASSO (1964) chez les Ciliés Péritriches et par SUTTON et WEISS (1966) dans des macrophages. Pour FAVARD et CARASSO, ces organites résultent d'une évolution des vésicules de pinocytose issues des vacuoles digestives. Elles sont rejetées dans cette même vacuole au terme de leur évolution. Pour SUTTON et WEISS, les cupules de nature lysosomiale viendraient éclater à la surface des macrophages ; leur présence conférerait des propriétés lytiques à cette membrane.

Il est à noter que dans ces deux expériences, ces formations paraissent liées à un rejet de substances, mais morphologiquement, la distinction entre les processus d'endocytose et d'exocytose s'avère très délicate. Si les vésicules cupuliformes ont pour origine les grandes vacuoles digestives, l'absence de thorostrast dans leur contenu peut s'expliquer soit par un temps d'expérimentation trop court, soit par un blocage de leur processus de formation ; FAVARD et CARASSO ont en effet constaté que la présence d'un ingestat compact (thorostrast) dans les vacuoles digestives perturbe et inhibe les processus de pinocytose.

Nous n'avons jamais pu établir avec certitude, d'autre part, le rejet de vésicules de quelque type que ce soit dans les grandes vacuoles à inclusions puriques. Le mécanisme fonctionnel de l'édification de ces substances reste obscur.

2 - Les granules cytoplasmiques

L'existence de vacuoles renfermant des pigments respiratoires a été constatée dans les cellules coelomiques de plusieurs espèces de Polychètes (Arenicolidae, BRETON-GORIUS, 1963 ; Serpulidae, POTSWALD, 1969 ; Amphitritidae, DALES, 1964 ; Nereidae). La présence de ces substances pose plusieurs problèmes en particulier en ce qui concerne leur origine et leur signification physiologique.

Dans les cellules périvasculaires, l'appareil de Golgi semble être impliqué dans l'élaboration des pigments respiratoires. BRETON-GORIUS constate l'apparition des molécules d'hémoglobine dans les dilatations terminales des saccules golgiens. POTSWALD, par contre, note chez les Serpulides la présence de molécules de chlorocruorine à l'intérieur des citernes ergastoplasmiques ; l'appareil de Golgi n'intervenant que pour condenser ce matériel. Chez les Néréidiens enfin, l'aspect typique des molécules d'erythro-cruorine n'est décelé que dans les granules relativement âgés. S'il est incontestable que l'appareil de Golgi se trouve engagé dans d'actives synthèses protéiques, comme en témoignent les résultats autoradiographiques, on peut se demander toutefois si les sécrétions golgiennes sont les seuls éléments qui interviennent dans l'élaboration des granules éléocytaires. Par utilisation de la peroxydase comme traceur de protéines, LOCKE et COLLINS (1968) ont visualisé la capture des protéines sanguines et leur stockage sous forme de granules dans les corps gras des insectes. L'utilisation d'une telle technique est à envisager chez les Néréidiens dans le cadre de cette étude. Il semble cependant peu probable qu'un processus similaire puisse intervenir dans les éléocytes. Nous avons vu en effet que le métabolisme protéique des éléocytes est intense. Par contre, après injection d'acides aminés marqués, le taux de radioactivité du sang reste extrêmement faible, même après des temps d'incorporation de longues durées. Les protéines sanguines sont donc vraisemblablement étrangères à l'élaboration des granules protéiques éléocytaires.

CONCLUSION

Les éléocytes se présentent comme des cellules riches en réserves (lipides et glycogène), pourvues d'une activité phagocytaire élevée et capables par ailleurs de synthétiser un matériel protéique. Ces caractères, de

même que la présence d'inclusions puriques, permettent de rapprocher les éléocytes des cellules chloragènes dont l'étude a fait l'objet de travaux importants à la fois chez les Arenicolidae (BRETON-GORIUS, 1963) et les Lombriciens (VAN GANSEN-SEMAL, 1956). Les éléocytes, comme les cellules chloragènes, sont élaborés au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins ; ils représenteraient donc l'équivalent de cellules péri-vasculaires devenues libres dans le coelome.

Les études effectuées en microscopie photonique ont d'autre part attiré l'attention de nombreux chercheurs (voir bibliographie dans ROMIEU, 1923) sur la similitude, à la fois structurale et physiologique existant entre les cellules adipeuses des Insectes ("fat body cells" des auteurs anglo-saxons) et les éléocytes. Les données apportées par la microscopie électronique (EVANS, 1967 ; ODHIAMBO, 1967) semblent justifier cette comparaison. Ces cellules, non seulement accumulent des réserves abondantes de nature glycogénique et lipidique, mais renferment dans leur cytoplasme des granules protéiques élaborés au moins en partie par l'appareil de Golgi (LOCKE et COLLINS, 1965).

II- EVOLUTION CYTOLOGIQUE DES ELEOCYTES A L'APPROCHE DE LA MATURETE SEXUELLE

A - NERBIS PELAGICA

Corrélativement à l'évolution des processus gamétogénétiques et aux transformations hétéronéridiennes, les éléocytes subissent d'importantes modifications ultrastructurales, différentes selon les sexes.

1 - Eléocytes des individus femelles

L'évolution morphologique de ces éléocytes avait été signalée dès 1933 par DEHORNE et DEFRETIN, à la suite d'une étude en microscopie photonique. Dans le noyau, le nucléole augmente considérablement de volume, il atteint un diamètre d'environ 3 μ . En même temps, on assiste à la différenciation d'une zone centrale fibrillaire et d'une zone corticale granulaire (Pl. 53, fig. a et Pl. 54, fig. a). Le nombre et la taille des mitochondries augmentent. Les modifications les plus spectaculaires concernent toutefois l'ergastoplasme. Dans les éléocytes en formation, encore accolés

aux vaisseaux sanguins parapodiaux, il est représenté par de nombreuses citernes de forme arrondie. Ces éléments font place dans les éléocytes libres à des sacs allongés de longueur considérable (3 à 4 μ) (Pl. 53, fig. a et b), qui constituent en microscopie optique les filaments basophiles décrits par DEHORNE et DEFRETIN (1933).

Les citernes ergastoplasmiques sont fréquemment disposées parallèlement les unes aux autres en des empilements pouvant grouper une dizaine d'éléments. Cet agencement est particulièrement typique dans la zone marginale des éléocytes accolés contre une paroi ovocytaire.

Durant les transformations hétéronériennes, les fibres musculaires s'autolysent (DEFRETIN, 1949). La présence de débris musculaires (sarcolytes) dans le coelome et la phagocytose de ces éléments par les éléocytes ont fait l'objet, en microscopie photonique, de descriptions attentives de la part de plusieurs auteurs (DEHORNE, 1922 ; ROMIEU, 1923). Divers aspects ultrastructuraux de ce processus ont pu être observés. Les débris musculaires phagocytés sont englobés dans une vacuole limitée par une membrane dérivée de la membrane plasmique et de même épaisseur (Pl. 54, fig. b). La digestion des fibres musculaires progresse dans la vacuole suivant une direction centripète (Pl. 54, fig. c) ; le réticulum sarcoplasmique représente l'élément cellulaire le plus résistant à l'action des enzymes digestives. Autour de la vacuole de phagocytose, on observe la présence constante de deux catégories d'organites :

- vésicules d'un contenu de faible densité, d'un diamètre d'environ 0,3 μ .
- corps denses (0,1 à 0,5 μ), d'une morphologie analogue à celle des lysosomes.

A la fin de leur cycle évolutif, les vacuoles de phagocytose ne renferment plus que des débris presque complètement digérés, agglomérés parfois en des formations fibrillaires concentriques. Elles acquièrent l'aspect typique des corps résiduels observés dans les cellules macrophages.

Durant les premiers stades de l'épitoquie, des granules cytoplasmiques d'une structure similaire à ceux des éléocytes de N. diversicolor apparaissent. Caractérisés par l'agencement paracrystallin de leur matériel, ils atteignent une dimension considérable de l'ordre de 2 μ (Pl. 51, fig. b). A l'approche de la maturité, des vésicules se forment dans la région corticale des granules et sont ensuite libérées dans le cytoplasme environnant. Par ce

processus les lobules protéiques se désagrègent progressivement; leur disparition est complète dans les individus matures.

Un certain nombre d'éléocytes ^{entrent} alors en dégénérescence. Ils s'agglomèrent pour former des amas roussâtres entourés par les linocytes.

Les éléocytes des Heteronereis femelles, de forme ovoïde, sont caractérisés par une structure relativement simple. On note la persistance d'un nucléole volumineux de même que celle d'amas importants d'ergastoplasme (Pl. 55, fig. c). Les substances de réserve ont disparu et les vacuoles digestives sont très rares. La grande vacuole persiste, mais son contenu, pratiquement vide, ne renferme plus que quelques rares granulations puriques.

2 - Eléocytes des individus mâles

Leur évolution est beaucoup moins complexe que celle décrite précédemment dans les éléocytes des femelles. On ne constate jamais un développement notable de l'ergastoplasme.

Au cours de l'épitoquie, un grand nombre d'éléocytes dégènèrent. Ceux qui persistent sont caractérisés chez les Heteronereis mâles par le développement énorme de la vacuole à inclusions puriques (Pl. 55, fig. a) ; les granulations denses sont toutefois peu abondantes. Le cytoplasme ne renferme que peu d'inclusions; ces dernières sont constitués en majeure partie par des corps résiduels résultant de l'involution des sarcolytes (Pl. 55, fig. a et b). Les lobules lipidiques ont disparu. Suivant les individus examinés, on constate la persistance de rosettes de glycogène ou l'absence totale de ces dernières.

B - NEREIS DIVERSICOLOR ET PERINEREIS CULTRIFERA

A l'approche de la maturité sexuelle, l'évolution structurale des éléocytes de N. diversicolor et de P. cultrifera est beaucoup moins spectaculaire que celle décrite précédemment.

Chez N. diversicolor, on observe dans les éléocytes des femelles un léger accroissement de l'ergastoplasme. Celui-ci forme des empilements de 3 à 4 citernes situées à la périphérie du noyau ou dans la zone marginale du cytoplasme. Les réserves de glycogène et de lipides ne disparaissent pas totalement. On ne constate pas, d'autre part, de dimorphisme net

entre individus mâles et femelles.

Les observations poursuivies sur P. cultrifera en microscopie électronique n'ont porté que sur un petit nombre d'échantillons. Il ne semble pas cependant que chez les sub-épitoques femelles, les éléocytes présentent de différences notables par rapport à l'état atoque.

C - DISCUSSION

Le trait marquant de cette étude est sans conteste le dimorphisme sexuel présenté par les éléocytes des Heteronereis de N. pelagica.

Les éléocytes des individus femelles sont caractérisés par une hypertrophie des formations ergastoplasmiques. Le processus ne semble pas être lié à l'ingestion des sarcolytes puisqu'il n'apparaît pas dans les éléocytes mâles où la phagocytose est également intense. Il est beaucoup plus plausible de rattacher le développement de l'ergastoplasme à l'élaboration des granules protéiques. Nous avons vu en effet que ceux-ci, rares chez les individus atokes, deviennent très abondants au cours de premiers stades de l'épitoque.

La différence d'évolution observée entre les éléocytes de N. pelagica et ceux de N. diversicolor et de P. cultrifera semble pouvoir s'expliquer par le fait que dans les deux dernières espèces, la synthèse des granules protéiques débute précocement et se poursuit à un rythme constant durant toute l'ovogenèse.

Dans cette étude cependant un point reste obscur. Les sécrétions protéiques des éléocytes de N. pelagica apparaissent en effet à un stade où l'accumulation des réserves protéiques des ovocytes (vitellus) est fortement ralentie. De même dans les Heteronereis femelles où la maturation ovocytaire est achevée, les éléocytes conservent des caractères de cellules métaboliquement très actives (nucléole hyperthrophié, amas de citernes ergastoplasmiques). Nous discuterons dans le paragraphe suivant des relations entre les éléocytes et les ovocytes. Il faut se garder d'oublier toutefois que la maturation des gamètes ne constitue pas la seule activité physiologique des Heteronereis ; les réserves éléocytaires peuvent être également mobilisées par les remaniements morphologiques (soies hétéronéréidiennes, lamelles parapodiales, système vasculaire) corrélatifs de l'épitoque.

III- LES RELATIONS ÉLÉOCYTES-OVOCYTES

A - DONNEES MORPHOLOGIQUES

Au cours de la vitellogenèse, les ovocytes de N. pelagica et P. cultrifera sont entourés par d'importants amas d'éléocytes accolés contre leurs parois (Pl. 1, fig. e et Pl. 58, fig. a). Durant la phase d'élaboration des mucopolysaccharides, les éléocytes très aplatis sont intercalés entre les cellules germinales tassées dans le coelome par suite de leur volume. Aucune adhésion d'éléocytes, par contre, n'est constatée à la périphérie des ovocytes matures.

L'association des éléments coelomiques avec les ovocytes est moins constante chez N. diversicolor. D'autre part, quelle que soit l'espèce, les ponctions du contenu coelomique révèlent que le degré d'association est variable selon les individus examinés et qu'à tous les stades, on peut trouver des ovocytes entièrement libres. L'association éléocyte-ovocyte ne paraît donc pas présenter un caractère permanent et obligatoire. Des observations similaires en tout point aux nôtres ont été effectuées par SCHROEDER (1970) au cours de l'ovogenèse de Nereis grubei.

Au microscope électronique, les micrographies de la planche 56 illustre l'aspect morphologique des rapports éléocytes-ovocytes à deux stades différents de l'ovogenèse : vitellogenèse (fig. a) et élaboration des mucopolysaccharides (fig. b). Au cours de la vitellogenèse, les villosités de l'enveloppe ovocytaire apparaissent parfois en contact étroit avec les rosettes de glycogène libérées à l'extérieur de l'éléocyte par une rupture de la membrane de ce dernier. A l'approche de l'épitoque, les citernes ergastoplasmiques des éléocytes forment fréquemment des empilements dans la zone proche des ovocytes. Mais quel que soit le stade considéré, on ne constate jamais de modification structurale de l'enveloppe ovocytaire dans la zone de contact avec les éléocytes. La membrane plasmique de ces cellules, orientée parallèlement à la paroi de l'ovocyte, est contiguë à l'extrémité des villosités. Elle n'est séparée de l'extrémité de ces dernières que par une distance souvent inférieure à 500 Å.

En conclusion, les observations ultrastructurales ne révèlent aucune intrication étroite entre les éléocytes et les ovocytes, mais uniquement des rapports de contiguité. D'autre part, aucun échange de matériel entre ces

deux catégories cellulaires n'est morphologiquement décelable à l'échelle de la microscopie électronique.

B - DONNEES AUTORADIOGRAPHIQUES

Chez les Insectes, des études autoradiographiques ont montré, entre les cellules folliculeuses et les ovocytes, la possibilité d'un transfert de matériel constitué par l'ARN (SIRLIN et JACOB, 1960 ; BIER, 1963 ; FAVARD-SERENO et DURAND, 1963 ; POLLACK et TELFER, 1969) ou du glycogène (BIER, 1954).

Nous avons utilisé cette technique pour préciser le métabolisme des éléocytes et visualiser éventuellement un passage de matériel radioactif en direction des ovocytes.

1 - Métabolisme du glycogène

Les éléocytes étant particulièrement riches en glycogène au cours de la phase atoque, on pouvait envisager "à priori" que ce matériel ou ses dérivés solubles puissent être intégrés dans les synthèses ovocytaires : vitellus lipidique ou protéique.

Dans ce but, nous avons procédé à l'injection de glucose ^3H dans des N. pelagica d'un diamètre ovocyttaire moyen d'environ 70 μ . Le cytoplasme de ces ovocytes ne renferme ni glycogène ni mucopolysaccharides dont la biosynthèse aurait pu interférer avec le marquage d'un apport exogène.

- Techniques

Après une injection unique de 30 $\mu\text{C/g}$ de glucose ^3H (D-glucose-6-T ; 1340 mc/mM. Radiochemical centre Amersham), les animaux sont sacrifiés après des temps variant de 1 heure à 6 jours.

Les fixations sont effectuées par la glutaraldéhyde et l'osmium et les inclusions dans l'épon afin de limiter au maximum la dissolution du glycogène et des lipides.

Les coupes semi-fines sont disposées sur une lame de verre et traitées ensuite selon le processus autoradiographique normal.

- Résultats

Les éléocytes présentent rapidement un marquage important. Celui-ci, déjà considérable après 3 heures d'incorporation atteint son maximum vers la 6ème heure. Il persiste dans les éléocytes jusqu'à la fin de l'expérience (6 jours).

Dans les ovocytes, après 3 à 6 heures d'incorporation, aucun marquage n'est présent, ni dans le noyau ni dans le cytoplasme. Il n'apparaît qu'après 24 à 48 heures d'expérimentation et se localise uniquement dans les lobules lipidiques. Il reste toujours beaucoup plus faible que celui des éléocytes.

Les enseignements de cette expérience sont de deux ordres :

- Comme le laissaient présager les données morphologiques, les éléocytes constituent un site de synthèse important du glycogène. Les synthèses s'effectuent à un rythme rapide (3 heures d'incorporation). D'autre part, le glycogène des éléocytes semble relativement stable puisqu'un taux notable de radioactivité persiste après 6 jours d'évolution.

- Dans les ovocytes, le marquage n'est décelé qu'au niveau des lipides. Son apparition est très tardive par rapport à celle des éléocytes, ce qui laisse supposer que le glycogène de ces cellules ne serait pas transféré directement vers les ovocytes.

2 - Métabolisme des ARN et des protéines

. Incorporation d'uridine (uridine ³H-5 ; 18,5 Ci/mM)

Cette étude a été effectuée à la fois en microscopie optique et électronique. Le marquage des éléocytes est très précoce (1/2 heure après l'injection). Il est en majeure partie, localisé initialement au niveau du noyau. Il apparaît ensuite dans le cytoplasme (3 heures) ; sa répartition coïncide sensiblement avec celle du réticulum granulaire mais un certain nombre de grains d'argent sont dispersés dans tout le cytoplasme.

Un taux de radioactivité très différent oppose pour des temps relativement courts (6 à 12 heures) les éléocytes et les ovocytes. Ces derniers ne présentent à ce stade qu'un marquage cytoplasmique extrêmement réduit (Pl. 57, fig. a et b). On constate uniquement la présence de quelques grains au niveau de l'enveloppe ovocytaire et du cytoplasme sous-jacent.

Pour des temps d'incorporation de longue durée (6 jours), la situation se trouve inversée. Un comptage des grains dans les éléocytes montre que leur nombre a diminué d'environ $2/3$ par rapport à celui évalué après 6 heures d'incorporation. Par contre dans les ovocytes, un marquage considérable est maintenant observé dans tout le cytoplasme à l'exception des lobules vitellins et lipidiques (Pl. 57, fig. c). Nous avons vu au chapitre V que l'ARN radicatif du cytoplasme ovocytaire est issu, en majeure partie, d'extrusions de matériel nucléaire.

. Incorporation de leucine (L⁽⁻⁾ leucine ³H, 200 mCi/mM)

La cinétique d'élaboration des protéines est sensiblement comparable à celle des ARN ; le marquage nucléaire est cependant plus restreint. La radioactivité éléocytaire est beaucoup plus élevée que celle des ovocytes pour des temps d'incorporation de faible durée.

Chez N. pelagica, dans les femelles sub-épitoques, les éléocytes, très basophiles, ont un taux de radioactivité supérieur à celui des individus atokes. Il est difficile cependant d'avoir recours à la méthode du comptage des grains en microscopie optique par suite du contour irrégulier et difficilement discernable de ces cellules. Dans les éléocytes de N. diversicolor, l'autoradiographie à haute résolution montre que pour des temps d'incorporation de 3 à 6 heures, la majeure partie des grains d'argent est localisée au niveau de l'appareil de Golgi et des sécrétions proches de ce dernier. Après 24 à 48 heures d'évolution le marquage est localisé essentiellement au niveau des granules protéiques. Ceux-ci semblent donc représenter la voie métabolique principale des synthèses de protéines.

C - DISCUSSION

L'incorporation de précurseurs marqués montre que les éléocytes ont un métabolisme actif, spécialisé à la fois dans l'élaboration du glycogène, des ARN et des protéines. Les synthèses d'ARN et de protéines sont d'autre part beaucoup plus rapides que celles des ovocytes.

Peut-on déduire de ces données, des preuves d'un transport de matériel dans le sens éléocytes-ovocytes ? Les seuls arguments en faveur de cette hypothèse résident d'une part, dans la baisse du taux de la radioactivité éléocytaire en fonction du temps, d'autre part dans la présence de grains

d'argent au niveau de l'enveloppe et de la zone corticale des ovocytes.

La diminution de la radioactivité éléocytaire peut s'expliquer, particulièrement en ce qui concerne les protéines, par une libération de ces substances à l'extérieur de la cellules. Cependant la majorité des éléocytes ne sont pas associés aux ovocytes, mais libres dans le liquide coelomique. Rien ne permet donc d'affirmer que le transfert des protéines soit spécialement orienté en direction des ovocytes.

D'autre part, le marquage de la zone corticale des ovocytes doit être interprété avec prudence car, rappelons-le, aucun indice morphologique d'un transport de matériel n'a pu être mis en évidence. La présence de grains à ce niveau peut éventuellement résulter, en microscopie à haute résolution, d'un artéfact dû à la rétention de molécules d'acides aminés par les charges ioniques de la paroi ovocytaire.

Enfin et surtout, pour que l'on puisse déduire avec certitude l'existence d'un flux de matériel radioactif dans le sens éléocyte-ovocyte, il faudrait que, comme dans le cas de certains insectes, le métabolisme ovocytaire soit très faible. Or nous avons vu que ce dernier, s'il est plus lent que celui des éléocytes, est néanmoins extrêmement actif. Il s'effectue d'autre part normalement dans le cas d'ovocytes, évoluant "in vitro" en eau de mer, en l'absence d'éléocyte.

Dans ces conditions, que devient la conception des anciens auteurs qui attribuaient aux éléocytes un rôle direct dans la nutrition des cellules germinales et la formation du vitellus ? La microscopie électronique a permis de préciser qu'il n'existait aucune intrication structurale entre les éléocytes et les ovocytes. Les éléocytes ne peuvent donc être assimilés à des cellules folliculeuses. Chez les Insectes, le rôle nourricier de ces dernières est d'ailleurs fortement contesté par des travaux récents (voir revue bibliographique dans BUSSON-MABILLOT, 1969) ; les ovocytes puiseraient directement dans l'hémolymphe le matériel protéique (TELFER et MELIUS, 1963) ou polysaccharidique (FAVARD-SERENO, 1969) servant à l'édification du vitellus.

Nous avons signalé par contre l'analogie structurale existant entre les éléocytes et les cellules adipeuses des Insectes. Un rapprochement d'ordre physiologique est également intéressant à envisager. Ces cellules ont un métabolisme protéique élevé comme en témoignent les incorporations de

précurseurs radioactifs (HILL, 1965). Chez Leucophaea maderae, BROOKS (1969) a montré, par des techniques immunologiques et autoradiographiques, que les cellules adipeuses des femelles élaborent une protéine spécifique dont les caractéristiques sont similaires à celles des protéines du vitellus. Cette protéine est absente chez les nymphes et les mâles et sa synthèse est contrôlée par l'hormone juvénile.

D'autres auteurs (LUSCHER, 1968 ; PAN et al., 1969) ont également signalé la libération de protéines dans l'hémolymphe et l'utilisation de ces dernières dans la vitellogenèse. De même, les autres substances de réserves des cellules adipeuses : lipides (GILBERT, 1967) et glycogène (HASEGAWA et YAMASHITA, 1965 ; WIEMS et GILBERT, 1967) sont utilisées pour l'élaboration du vitellus. Un rôle similaire peut être envisagé en ce qui concerne les éléocytes. Ceux-ci, après avoir élaboré les protéines et les avoir stockées comme des substances de réserves (influence du jeûne ⁽¹⁾) pourraient transférer ces substances, non pas directement dans les ovocytes comme on le pensait jusqu'alors, mais dans le liquide coelomique qui servirait de milieu nourricier. Cette libération pourrait s'effectuer sous forme d'acides aminés. La teneur de ces substances est particulièrement élevée dans le milieu coelomique des Polychètes (M.E. CLARK, 1964) ; d'autre part, l'absorption des protéines complexes par les ovocytes semble limitée comme ne témoigne le nombre peu élevé de vésicules de pinocytose.

Une telle hypothèse nécessite pour sa vérification un recours à des méthodes biochimiques et immunologiques qui sortaient du cadre des techniques utilisées dans ce travail mais que nous pensons utiliser prochainement pour la poursuite de cette étude.

CONCLUSION DU CHAPITRE

1 - Les éléocytes se forment à la périphérie des vaisseaux sanguins parapodiaux. Les citernes ergastoplasmiques, abondantes dans les éléocytes en formation, se raréfient dans les éléocytes libres dans le coelome.

(1) Les granules protéiques sont absents dans les éléocytes de vers inanitiés pendant 20 jours.

2 - Les éléocytes, très riches en lipides et en glycogène, sont des cellules spécialisées dans l'élaboration des substances de réserves. Leur métabolisme est extrêmement actif comme le prouvent^{les} incorporations de glucose, d'uridine et de leucine tritiés.

3 - L'appareil de Golgi intervient dans l'élaboration de granules riches en protéines et renfermant des molécules d'hémoglobine. Chez N. diversicolor, l'injection de leucine ³H se traduit, après 6 heures d'incorporation par une accumulation de grains d'argent au niveau des saccules golgiens et du matériel sécrétoire proche de ces derniers. Après 24 à 48 heures d'évolution, le marquage se localise en majeure partie au niveau des granules protéiques.

4 - Le rôle phagocytaire des éléocytes est extrêmement important. L'injection dans le milieu coelomique d'une solution de thoro-thrast est suivie de la capture des particules du traceur par les vésicules de pinocytose et par leur accumulation dans des vacuoles digestives. Doués d'une fonction d'épuration du milieu coelomique, les éléocytes remplissent également une fonction de macrophages. Les débris musculaires (sarcolytes), très nombreux dans le coelome à l'approche des transformations hétéronéréidiennes, sont englobés dans de grandes vacuoles puis dégradés et transformés en corps résiduels.

La présence d'inclusions puriques intra-vacuolaires indique, d'autre part, que les éléocytes jouent un rôle dans le catabolisme des substances azotées et dans l'accumulation des déchets.

5 - A l'approche de la maturité sexuelle, les éléocytes de N. pelagica présentent un dimorphisme sexuel très net. Ceux des individus femelles sont caractérisés par le développement considérable de l'ergastoplasme et par l'apparition de lobules protéiques de grande taille.

6 - A l'échelle de la microscopie électronique, les relations entre les éléocytes et les ovocytes apparaissent comme de simples rapports de contiguïté. Aucune intrication entre ces deux catégories de cellules n'a été constatée et aucun indice morphologique d'échange de matériel n'a été observé. Les éléocytes ne constituent donc pas l'équivalent de cellules folliculeuses.

7 - Par la libération progressive de leur matériel de réserve dans le liquide coelomique (expérience de jeûne, baisse du taux de radioactivité) les éléocytes semblent jouer un rôle comparable à celui des cellules adipeuses des Insectes. Leur intervention à ce titre dans les processus de la gamétogenèse est envisagée.

CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE

Au cours de l'ovogenèse, l'évolution du cytoplasme peut être divisée en quatre stades : prévitellogenèse, élaboration du vitellus protéique, développement des alvéoles corticaux de nature mucopolysaccharidique, maturation.

L'élément le plus spectaculaire de ces transformations est représenté par l'évolution fonctionnelle de l'appareil de Golgi. L'élaboration des premiers lobules vitellins résulte d'une différenciation des vacuoles golgiennes. Au cours de la vitellogenèse, l'incorporation de leucine ^3H , visualisée en autoradiographie à haute résolution, montre que les protéines synthétisées initialement au niveau des ribosomes sont remaniées et condensées au niveau des dictyosomes. Les vésicules élaborées par les saccules golgiens représentent le support morphologique par lequel les protéines précurseurs du vitellus sont acheminées vers les lobules vitellins en croissance.

Lors de l'apparition des mucopolysaccharides, de profonds remaniements morphologiques surviennent au niveau de l'appareil de Golgi (dilatation des saccules de la face distale). L'incorporation de glucose ^3H chez N. pelagica est suivie d'un marquage localisé initialement au niveau des saccules golgiens. Ces résultats, joints aux données cytochimiques, permettent de considérer que c'est à ce niveau que s'effectue la synthèse des hydrates de carbone complexes. Les mucopolysaccharides sont ensuite libérés dans le cytoplasme sous forme d'alvéoles corticaux. Chez N. diversicolor, deux types d'éléments corticaux ont pu être observés : granules riches en glycoprotéines, alvéoles constitués par les mucopolysaccharides. Chacun de ces éléments est élaboré par un type particulier de dictyosome.

Lors de la fécondation, le contenu des organites corticaux est expulsé dans l'espace périvitellin ; ce matériel traverse ensuite le chorion de l'enveloppe ovocytaire pour constituer une gelée protectrice autour de la jeune larve.

Durant la majeure partie de l'ovogenèse, le métabolisme du nucléole est intense comme en témoigne l'incorporation d'uridine ^3H , de leucine ^3H et d'arginine ^3H .

Chez N. pelagica, l'étude ultrastructurale montre que l'évolution du nucléole se déroule suivant un cycle complexe. Vers la fin de la vitellogenèse, le nucléole hypertrophié se dissocie, ce qui entraîne la disparition du composant granulaire. A partir des éléments fibrillaires persistant se reconstitue un nouvel édifice nucléolaire, lors de l'apparition des mucopolysaccharides. La dislocation ultime du nucléole survient à l'approche de la maturité sexuelle.

Les étapes de la croissance du nucléole semblent en rapport avec les processus d'extrusion du matériel nucléaire vers le cytoplasme. Dans les ovocytes jeunes, ce transfert de matériel (ARN ribosomal) a pu être visualisé en autoradiographie à haute résolution par une étude cinétique de l'incorporation d'uridine ³H. Après une phase de condensation à proximité de l'enveloppe ovocytaire, les extrusions nucléaires semblent se dissocier dans le cytoplasme en libérant un matériel de structure fibrillaire et des petites particules, ces dernières pourraient représenter un stade intermédiaire de l'édification des ribosomes.

La concordance entre les diverses phases du cycle nucléolaire et les synthèses du cytoplasme semble représenter le résultat d'une interaction dans l'activité fonctionnelle des ces éléments. Celle-ci pourrait être régie par le taux d'hormone cérébrale. Les résultats très récents de DURCHON et PORCHET (1970) ont permis en effet d'établir chez P. cultrifera, une courbe de l'activité cérébrale en fonction de l'âge des vers et du diamètre des ovocytes. Dans cette courbe, deux points d'inflexion traduisant une diminution de l'activité inhibitrice semblent coïncider respectivement avec le début de la vitellogenèse et l'apparition des mucopolysaccharides.

Notre étude sur l'ovogenèse a également porté sur l'évolution structurale de l'enveloppe ovocytaire et sur les rapports entre les ovocytes et les éléocytes. Ces derniers éléments ne présentent jamais d'intractions étroites avec les cellules germinales, ils ne peuvent donc être assimilés à des cellules folliculeuses. Cependant les modifications morphologiques subies par les éléocytes à l'approche de la maturité sexuelle permettent d'envisager la possibilité d'un rôle actif de ces cellules dans l'élaboration d'un matériel qui, après sa libération dans le liquide coelomique, servirait à l'édification des réserves ovocytaires.

DEUXIEME PARTIE

INCIDENCE DE LA LEVEE DE L'INHIBITION
CEREBRALE SUR L'EVOLUTION DE LA GAMETOGENESE

INTRODUCTION

La première partie de notre étude nous a permis de suivre les modifications cytologiques et métaboliques survenant au cours de l'ovogenèse naturelle. Nous avons vu en particulier que l'évolution cytoplasmique est régie par l'activité fonctionnelle de l'appareil de Golgi. Ce dernier oriente tout d'abord ses synthèses dans l'élaboration du vitellus protéique, ensuite, dans celles des polysaccharides entrant dans la composition des granules et alvéoles corticaux. Chez N. pelagica une corrélation a pu être établie entre le cycle évolutif du nucléole et les synthèses cytoplasmiques. Les différentes étapes de l'activité ovocytaire semblent déterminées par la diminution progressive du taux d'hormone cérébrale.

La deuxième partie de ce travail portera sur les répercussions entraînées sur le déroulement des processus de gamétogenèse par la suppression brutale du facteur inhibiteur.

En condition anormale, les études effectuées chez divers Néréidiens ont montré que les ovocytes subissaient un accroissement de taille accéléré (HAUENSCHILD, 1956 ; CHOQUET, 1962 ; CLARK et RUSTON, 1963). Notre travail a eu pour but en premier lieu de définir les particularités cytologiques présentées par les ovocytes ayant évolué en condition expérimentale. Nous nous sommes attachés plus particulièrement à suivre les transformations morphologiques et **fonctionnelles** des organites cytoplasmiques impliqués dans les processus d'accroissement cellulaire, de façon à comparer ces données à celles de l'ovogenèse naturelle.

Les problèmes posés par le contrôle endocrine des processus de gamétogenèse sont toutefois extrêmement nombreux et diversifiés. Nous n'avons pas la prétention de les avoir tous abordés de façon approfondie. En particulier le déroulement complexe du cycle nucléolaire de N. pelagica n'a été envisagé qu'à l'échelle de la microscopie photonique ; de même l'étude autoradiographique du métabolisme n'a porté que sur une seule espèce de Néréidiens.

Le plan adopté dans cette étude sera calqué dans ses grandes lignes sur celui de la première partie. Toutefois étant donné la similitude de certains processus physiologiques, nous centrerons nos observations sur les organites cellulaires présentant, en condition anormale, les modifications cytologiques les plus significatives.

Une attention particulière sera apportée à l'évolution biométrique des ovocytes en expérimentation, vu l'importance de ce critère dans l'étude de la croissance ovocytaire.

Nous nous sommes intéressé d'autre part au mode de contrôle par lequel l'hormone nérebrale exerce son action au niveau du noyau. Chez les mâles, la levée de l'inhibition hormonale déclenche les divisions spermatocytaires et aboutit à la libération des spermatozoïdes (DURCHON, 1952). Ce problème a été abordé par l'étude autoradiographique des synthèses d'ADN, à la fois chez les gonocytes mâles et femelles, de façon à pouvoir établir une comparaison entre les deux lignées germinales.

CHAPITRE X

ETUDE BIOMETRIQUE ET CYTOLOGIQUE DE L'EVOLUTION OVOCYTAIRE EN L'ABSENCE D'HORMONE

I. TECHNIQUES D'EXPERIMENTATION

Deux types de manipulations ont été utilisées pour cette étude.

1 - Expérimentation "in vivo"

Les animaux, après avoir été maintenus au jeûne pendant quelques jours au laboratoire sont sectionnés dans la région médiane du corps.

Les fragments sont isolés dans des boîtes de Pétri, remplies d'eau de mer filtrée, renouvelée tous les deux jours. Suivant les séries expérimentales, la température d'élevage est de 15 ou 20° C.

Les ovocytes de la région postérieure évoluent ainsi en condition an hormonale tandis que ceux de la région antérieure, soumis à l'action de l'hormone cérébrale, servent de témoins. Des examens ont également été effectués à partir d'ovocytes issus d'animaux décérébrés.

2 - Expérimentation "in vitro"

Elle a été effectuée en culture organotypique, à la température de 20° C, sur le milieu mis au point par DURCHON et SCHALLER (1963) (voir Matériel et Techniques).

Cette méthode n'a pu être appliquée qu'aux ovocytes de N. diversicolor, cette espèce présentant seule une évolution normale "in vitro".

Cette technique permet d'étudier à partir d'une souche unique l'évolution des ovocytes:

- en présence d'hormone (association de parapodes à des Prostomiums de jeunes individus)

- en l'absence d'hormone (parapodes isolés). Elle a permis également, par l'association en cours de culture de prostomiums à des parapodes initialement isolés, de préciser l'influence d'un rétablissement de l'action hormonale sur l'évolution ovocytaire.

II. NEREIS PELAGICA

1 - Résultats biométriques

Les données concernant l'évolution de la croissance ovocytaire en fonction du temps et du diamètre ovocytaire initial sont reportées dans le tableau 11.

Tableau 11 : influence de l'hormone cérébrale sur la croissance des ovocytes de N. pelagica.

Temps d'évolution	Diamètre ovocytaire initial (en μ)	Ovocytes témoins (Région antérieure)	Ovocytes de la région postérieure (soustraits à l'hormone cérébrale)
10 jours	30 à 40	$43,2 \pm 7,6$	$37,3 \pm 8,9$
	60 à 65	$69,5 \pm 17$	$66,2 \pm 6,2$
	90 à 100	$101,3 \pm 16,4$	$104,6 \pm 22,4$
20 jours	35 à 40	$44,3 \pm 19,2$	$101,0 \pm 9,6$
	70 à 80	$85 \pm 13,2$	$140,5 \pm 13,6$
40 jours	40 à 50	$61 \pm 9,7$	$140,1 \pm 7,2$
	70 à 80	$103,2 \pm 13,6$	$204,2 \pm 8$

(Les résultats de chaque série portent sur la moyenne ovocytaire de 10 individus exprimée en μ).

La croissance des ovocytes de la région antérieure est sensiblement analogue à celle des ovocytes provenant d'animaux non opérés. Cependant durant les dix premiers jours de l'expérimentation, l'accroissement de la taille des plus jeunes ovocytes est assez sensible, ce qui pourrait correspondre à une sorte d'activation consécutive à l'amputation.

Dans la partie postérieure, soustraite à l'action de l'hormone, l'augmentation du diamètre des ovocytes est peu significative durant les premiers jours d'évolution. Elle devient très marquée entre le 10ème et le 20ème jour et se poursuit ensuite sous une forme atténuée jusqu'au 40ème jour d'expérimentation.

Par rapport à leur diamètre initial, les ovocytes compris entre 40 et 70 μ présentent un coefficient d'accroissement variant entre 2,5 et 3,5 (Pl. 58, fig. a et b). Cet accroissement est plus faible pour les ovocytes d'un diamètre supérieur à 90 μ (X 2 fois environ). Les données numériques de cette série expérimentale sont totalement en accord avec celles établies en 1962 par CHOQUET pour cette espèce.

Corrélativement à l'évolution ovocytaire apparaissent les modifications morphologiques de l'épitoque. Après 40 jours d'évolution, la majorité des tronçons postérieurs présentent des lamelles parapodiales bien développées et des soies hétéronéréidiennes. Un certain nombre sont animés d'une nage frétilante.

2 - Evolution cytologique

a) Ovocytes de la partie antérieure

Leur structure ne présente pas de différence par rapport aux ovocytes de même taille issus d'animaux non opérés. (Pl. 58, fig. c et e). Après une évolution de 40 jours, le cytoplasme de ces ovocytes ne renferme que très peu de matériel présentant une réaction métachromatique au bleu de toluidine ; les mucopolysaccharides alcianophiles font défaut.

b) Ovocytes de la partie postérieure (évolution en condition anormonale)

10 jours. Les ovocytes d'un diamètre initial compris entre 40 et 70 μ présentent une structure analogue à celle des témoins : cytoplasme très basophile dans lequel sont disséminés les lobules lipidiques et vitellins. On constate dans les ovocytes de 80 à 110 μ , une légère augmentation du nombre des lobules présentant une réaction métachromatique au bleu de toluidine.

20 jours. Chez les plus jeunes ovocytes, l'évolution se traduit essentiellement par la différenciation d'une zone cytoplasmique périnucléaire riche en ARN. Dans cette zone, des formations filamenteuses très basophiles sont disposées parallèlement au noyau. On note d'autre part l'apparition de quelques lobules métachromatiques localisés essentiellement dans la région corticale de l'ovocyte (Pl. 58, fig. g).

30 à 40 jours. Tous les ovocytes examinés présentent la structure caractéristique des ovocytes matures. A partir du noyau sont répartis en couches

successives : une auréole cytoplasmique basophile, les lobules lipidiques, les lobules vitellins et les mucopolysaccharides acides (Pl. 58, fig. d, f et h). L'épaisseur de la gangue mucopolysaccharidique varie suivant le diamètre initial des ovocytes en expérimentation. Elle ne dépasse guère 5 à 6 μ pour les ovocytes mesurant au départ 40 μ , de plus la coloration au PAS bleu alcian révèle une certaine hétérogénéité dans sa composition. Par contre pour les ovocytes d'un diamètre initial supérieur à 75 μ , l'épaisseur de la gangue est analogue à celle des ovocytes ayant subi une maturation naturelle (10 à 15 μ) ; comme dans ce cas, la zone la plus corticale est uniquement réactive au bleu alcian (Pl. 58, fig. f).

III. PERINEREIS CULTRIFERA

L'étude de cette espèce a été menée en collaboration avec M. PORCHET (DHAINAUT et PORCHET, 1967). En l'absence d'hormone cérébrale, l'évolution des ovocytes de P. cultrifera est variable selon la période de l'année au cours de laquelle s'effectue l'expérimentation.

1 - Période estivale (août et septembre)

Les adultes mourant après la reproduction qui se situe en mai-juin, on ne récolte, en été, que des individus de 1ère et de 2ème année. Notre étude a porté uniquement sur les femelles de 2ème année dont le diamètre ovocytaire s'échelonne entre 40 et 90 μ .

50 jours après la section, la taille des ovocytes de la région postérieure n'a pas varié. L'examen cytologique ne montre pratiquement aucune différence entre les ovocytes ayant évolué en condition an hormonale et ceux fixés lors de la récolte. Tout au plus, les ovocytes de la région antérieure montrent-ils parfois de légères variations, caractérisées en particulier par une diminution de la basophilie nucléaire.

2 - Période hivernale (décembre et janvier)

Dans tous les cas, les ovocytes réagissent à l'absence d'hormone par une augmentation de taille ; l'analyse biométrique en a été effectuée par PORCHET (1969). Les caractéristiques cytologiques des ovocytes appartenant à des animaux de 2ème et 3ème année ainsi que leurs modifications après des temps variés d'évolution sont résumées dans la Figure XI. Les ovocytes de 2ème année subissent dans 90 % des cas une dégénérescence suivie

Fig. XI - Evolution des ovocytes de P. cultrifera en l'absence d'hormone cérébrale. (Période hivernale).

Fig. 1 - Ovocyte d'un animal de 2 ans : Répartition des ribonucléoprotéines (RNP) et des lobules de vitellus protéique (V) et lipidique (L).

Fig. 2 - A. Structure d'un ovocyte de 3 ans (120 μ de diamètre). Noter la présence de polysides (P) représentés par des pointillés.

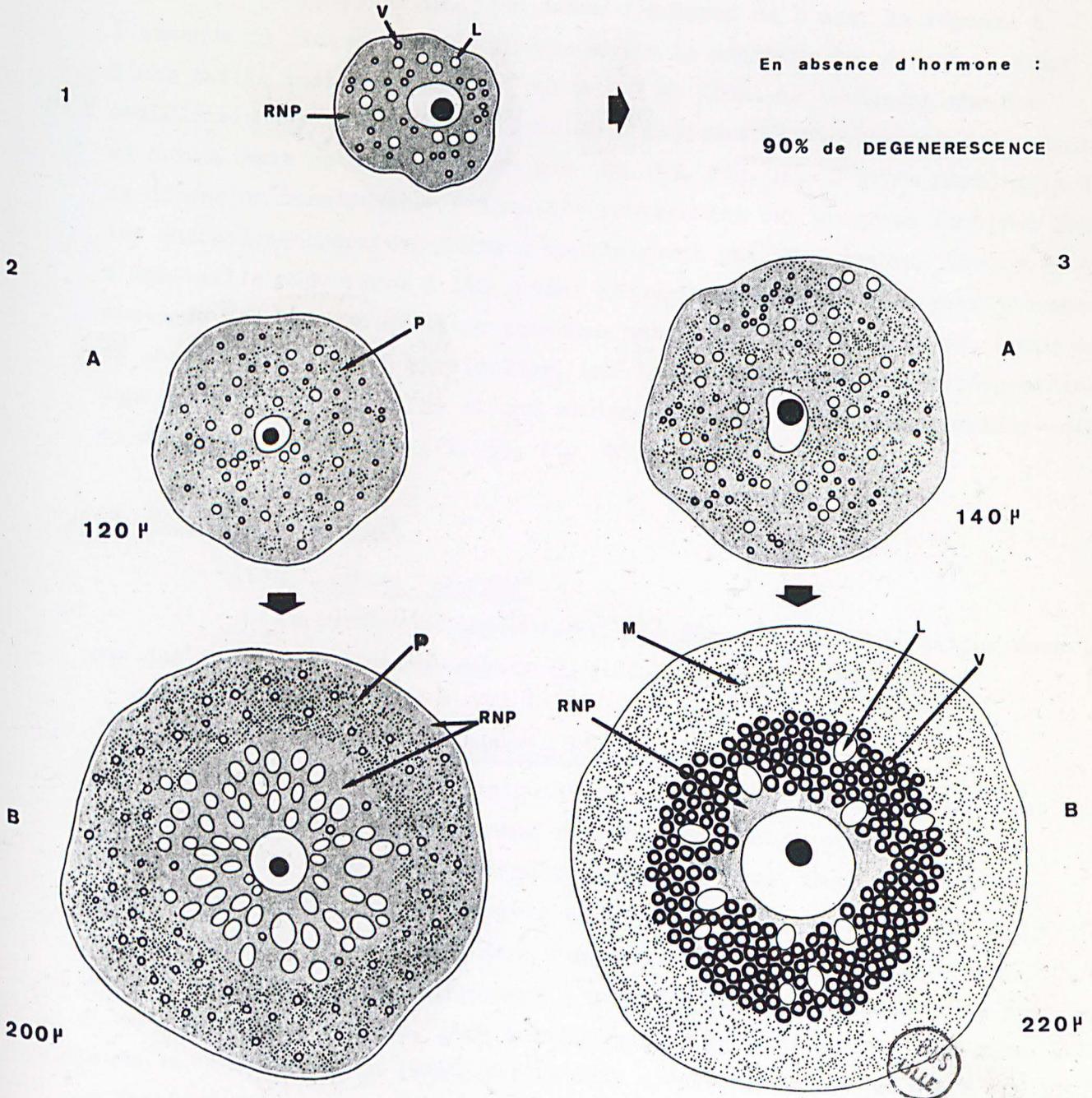
- B. 40 jours d'évolution sans hormone cérébrale. Les lobules lipidiques sont regroupés à la périphérie du noyau. Les polysides (P) ne présentent pas de réactions acides et restent disséminés parmi les RNP.

Fig. 3 - A. Ovocyte de 3 ans (140 μ de diamètre). Apparition dans le cytoplasme des premiers lobules de mucopolysaccharides.

- B. 40 jours d'évolution sans hormone cérébrale. Ségrégation des constituants cytoplasmiques. Migration des RNP dans la zone péri-nucléaire. Au centre du cytoplasme : accumulation des lobules vitellins (V) et lipidiques (L). Dans la zone corticale : couche de mucopolysaccharides (M).



Fig. XI



de lyse. Les quelques rares ovocytes non dégénérés atteignent une taille de 150 μ mais n'acquièrent pas les caractéristiques histochimiques des ovocytes témoins de taille identique (absence de composés métachromatiques).

Pour les ovocytes issus d'animaux de 3 ans, la réponse à l'absence du facteur hormonal varie selon le diamètre des ovocytes. Ceux d'une taille initiale comprise entre 120 et 130 μ ne subissent que des modifications partielles. Les lobules lipidiques se rassemblent à proximité du noyau, mais ne se fusionnent pas (Pl. 59, fig. g). D'autre part, malgré la dimension considérable à laquelle parviennent ces ovocytes (environ 200 μ), les mucopolysaccharides acides n'apparaissent pas. Par contre, les ovocytes d'une taille supérieure à 140 μ vont acquérir une morphologie sensiblement analogue à celle des ovocytes parvenus naturellement à maturation. Comme dans ce cas, on observe, en particulier, une localisation des ribonucléoprotéines dans la zone périnucléaire et une condensation des mucopolysaccharides acides en une gangue corticale (Pl. 59, fig. h).

IV. NEREIS DIVERSICOLOR

A - ETUDE "IN VIVO"

Le protocole expérimental est analogue à celui utilisé dans le cas des deux espèces précédemment étudiées.

1 - Résultats biométriques

Cette manipulation effectuée en collaboration avec M. BERTOUT a porté sur des animaux récoltés en Octobre et Novembre. Ces derniers ont pu, selon le diamètre de leurs ovocytes, être répartis en 3 classes (inférieur à 90 μ , compris entre 90 et 110 μ et entre 110 et 130 μ), dont les moyennes ovocytaires sont respectivement de 54,8 μ , 101,8 μ et 121,4 μ . Les résultats numériques concernant l'accroissement des ovocytes, en présence et en l'absence d'hormone, sont regroupés dans le Tableau 12. La figure XII donne la représentation graphique de deux classes ovocytaires (54,8 et 121,4 μ) en fonction du temps.

On constate une brusque augmentation du diamètre des ovocytes de la région postérieure entre le 5ème et le 10ème jour. Cet accroissement qui intéresse simultanément les 3 classes ovocytaires se poursuit ensuite d'une façon plus ralentie jusqu'au 25ème jour. A ce stade de l'évolution

Tableau 12 . Ovocytes de *N. diversicolor*. Evolution du diamètre ovocytaire et du rapport $\frac{\text{écart-type}}{\text{diamètre}}$ après 25 jours d'évolution en présence et en l'absence d'hormone cérébrale.

Etat initial		Etat après 25 j. d'évolution			
		avec hormone		sans hormone	
Diamètre	$\frac{\text{Ecart type}}{\text{Diamètre}}$	D	$\frac{\sigma}{D}$	D	$\frac{\sigma}{D}$
$54,8 \mu \pm 12,7$	0,23	$72,6 \mu \pm 13,9$	0,19	$123,2 \mu \pm 17,1$	0,14
$102,8 \mu \pm 13,6$	0,13	$122,8 \mu \pm 12,6$	0,10	$166 \mu \pm 1,4$	0,008
$121,4 \mu \pm 8,6$	0,07	$141,8 \mu \pm 10,4$	0,07	$183,9 \mu \pm 6,5$	0,03

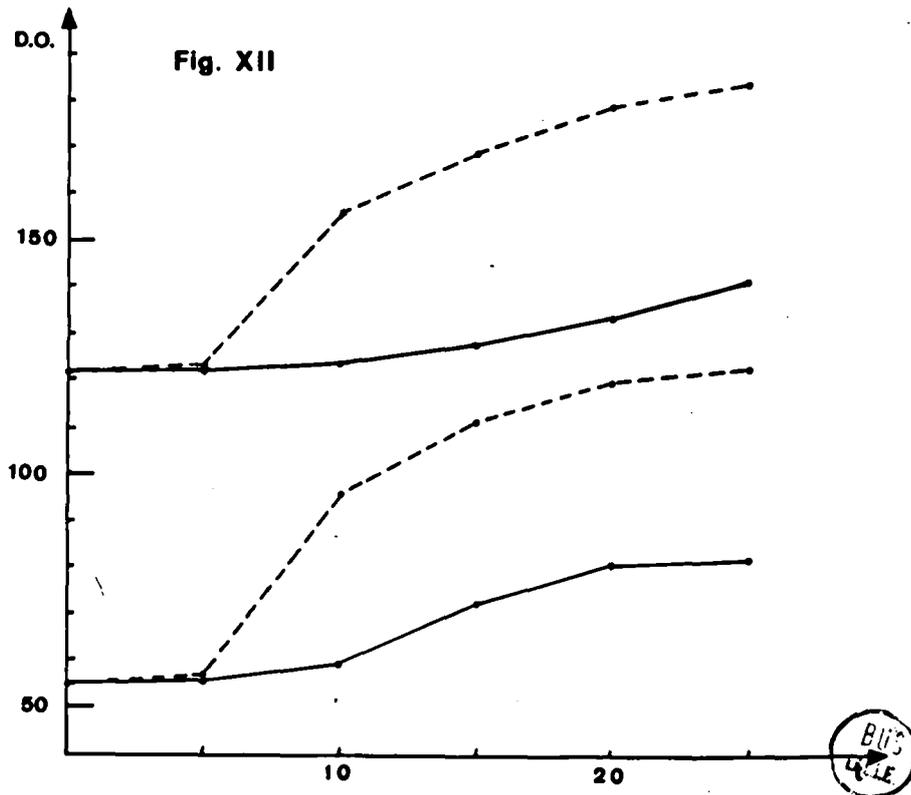


Figure 1: Accroissement du diamètre ovocytaire en fonction du temps pour les classes $54,8 \mu$ et $121,4 \mu$.
 — en présence d'hormone.
 --- en absence d'hormone
 abscisses: t (temps d'évolution en jours).
 ordonnées: D.O. (Diamètre Ovocytaire Moyen en microns).

on remarque, que dans les tronçons soustraits à l'action de l'hormone, la population ovocytaire devient de plus en plus homogène comme en témoigne, dans les 3 classes considérées, le très faible rapport écart type/diamètre (Tableau 12).

2 - Etude cytologique

Après une quinzaine de jours d'évolution en condition anormonale, les ovocytes acquièrent une morphologie caractéristique, par suite de la ségrégation des éléments cytoplasmiques. Les petits lobules lipidiques disséminés dans le cytoplasme tendent à se fusionner ; de même que les lobules de vitellus protéique, ils sont repoussés vers la zone corticale du cytoplasme (Pl. 59, fig. a et b). Autour du noyau, se différencie une zone cytoplasmique homogène très basophile. L'action de l'ARNase entraîne à ce niveau la suppression de la coloration par la pyronine ou le bleu de toluidine. Cette zone montre, en outre, une intense coloration par le P.A.S., coloration abolie par action préalable de l'amylase salivaire.

Cette répartition des éléments cytoplasmiques est caractéristique des ovocytes ayant subi une croissance accélérée en l'absence d'hormone ; elle n'est jamais observée au cours de l'ovogenèse naturelle, même à l'approche de la maturation. "In vivo", les ovocytes présentant les signes typiques d'une dégénérescence cellulaire sont rares, même dans les tronçons ayant évolué, en condition anormonale, pendant une période très longue de l'ordre de 50 jours.

B - ETUDE "IN VITRO"

Cette étude, réalisée en cultrure organotypique a été entreprise et poursuivie en collaboration avec Monsieur le Professeur DURCHON (DURCHON et DHAINAUT 1964 ; DURCHON et al., 1965).

Cette méthode, beaucoup plus souple que l'expérimentation "in vivo", a permis non seulement de suivre l'évolution d'ovocytes dans des parapodes isolés, mais encore, par la réassociation de prostomiums à des parapodes en cours de **culture**, de préciser l'influence d'un rétablissement de l'action hormonale sur l'évolution des ovocytes. Elle a autorisé enfin l'étude des interactions ovocytes-prostomiums d'âges différents. Les expériences ont été poursuivies à la température constante de 20° C.

1 - Parapodes isolés

L'évolution ovocytaire est comparable à celle précédemment décrite dans les ovocytes ayant évolué "in vivo". Les modifications morphologiques se manifestent précocement (10 jours de culture) et se traduisent ici encore par une concentration de substances basophiles autour du noyau (Pl. 59, fig. d).

Au 20ème jour de culture, la condensation des ribonucléoprotéines s'est accentuée dans la zone périnucléaire où l'on observe alors la présence d'amas et de filaments pyroninophiles (Pl. 59, fig. e). D'autre part, on assiste à une vacuolisation des granules vitellins et le nucléole, devenu très hétérogène, est appauvri en ARN. Des formations mucopolysaccharidiques apparaissent près de la membrane ovocytaire. On note enfin à ce moment, la présence de nombreux ovocytes en dégénérescence dans lesquels toute structure organisée a disparu ; ces ovocytes sont fréquemment entourés par des linocytes.

Les ovocytes témoins (association parapode-prostomium de même âge) sont identiques à ceux issus de l'ovogenèse naturelle (répartition régulière des ribonucléoprotéines entre les lobules vitellins) (Pl. 59, fig. c) ; ils ne présentent jamais de signes de dégénérescence.

2 - Réassociations en cours de culture de prostomiums à des parapodes initialement isolés.

Cette manipulation, portant sur une centaine d'explants, a consisté à réassocier tous les deux jours, pendant deux semaines, des parapodes initialement isolés avec des prostomiums. Toutes les cultures, ainsi que les témoins (association initiale) ont été fixées après une durée totale d'évolution de 24 jours.

Résultats :

- les ovocytes des parapodes réassociés avant le 6ème jour conservent une structure analogue à celle des ovocytes témoins.
- les ovocytes remis en présence du facteur hormonal le 6ème jour sont caractérisés par l'existence, à un pôle du noyau, d'une zone cytoplasmique basophile parcourue par un réseau fibrillaire. Il ne présentent pas de dégénérescence après une évolution totale de 24 jours (Pl. 59, fig. f).
- Les ovocytes des parapodes réassociés après le 6ème jour évoluent d'une façon identique à ceux des parapodes isolés. Leur dégénérescence

est d'autant plus marquée que la réassociation parapode-prostomium a été effectuée plus tardivement.

Ces résultats montrent donc que jusqu'au 6ème jour de culture l'absence d'hormone n'entraîne pas d'effets irréversibles. Par contre, passé ce laps de temps, les ovocytes s'acheminent vers un processus de dégénérescence même en présence d'hormone.

3 - Associations prostomiums et parapodes d'âges différents

Cette série de culture a porté sur des parapodes renfermant respectivement des ovocytes d'un diamètre de 120 et 150 μ . Ces parapodes ont été associés à des prostomiums provenant de femelles 80 μ , 120 μ , 150 μ , et 180 μ .

On constate que l'association d'un parapode avec le cerveau d'un animal plus jeune ou de même âge n'entraîne aucune modification de la structure de l'ovocyte par rapport à son état initial. Par contre, les ovocytes de parapodes associés au cerveau d'un animal plus âgé évoluent d'une façon chaotique. Malgré leur taille considérable (120 μ et 150 μ), ces ovocytes, même en présence d'un cerveau sont incapables d'aboutir à une maturation normale.

V. DISCUSSION

Deux facteurs sont à considérer dans l'évolution des ovocytes en l'absence d'hormone : l'accroissement de volume et l'évolution cytologique.

1 - Accroissement de volume

Cette réponse des ovocytes de Néréidiens à la levée de l'inhibition hormonale a été constatée dans les trois espèces étudiées de même que chez Platynereis dumerilii (HAUENSCHILD, 1956) et chez Nereis grubei (SCHROEDER, 1970). Par rapport au stade initial, le diamètre ovocytaire double au cours de l'expérimentation dans les ovocytes de N. diversicolor et Pl. dumerilii. Chez N. pelagica, le coefficient d'accroissement varie entre 2,5 et 3,5 (pour une taille initiale inférieure à 90 μ) soit une augmentation de volume de l'ordre de 40 fois. Seuls les ovocytes de P. cultrifera ne réagissent pas à l'absence d'hormone en période estivale. Cette particularité sera envisagée ultérieurement dans notre discussion.

Contrairement aux observations effectuées par CLARK et RUSTON

(1963) sur N. diversicolor, il semble qu'un laps de latence variant entre 5 et 10 jours s'écoule normalement avant le début de l'accroissement. Les ovocytes d'une taille inférieure, selon les espèces, à 30 ou 40 μ , ne présentent pas d'augmentation de taille. L'examen au microscope électronique montre que l'évolution structurale de tels ovocytes, diffère profondément en l'absence d'hormone, de celles des ovocytes plus âgés (Chapitre XIV).

2 - Evolution cytologique

Contrairement à l'accroissement de taille, l'évolution cytologique est très variable suivant les ovocytes des différentes espèces de Néréidiens.

Chez N. pelagica, cette évolution s'effectue, dans ses grandes lignes, d'une façon comparable à celle de l'ovogenèse naturelle. En l'absence d'hormone, les ovocytes sont capables de synthétiser des mucopolysaccharides acides, qui se répartissent comme dans les ovocytes matures en une couche corticale.

Chez P. cultrifera, les ovocytes d'une taille inférieure à 100 μ montrent rapidement des signes de dégénérescence. Ceux compris entre 110 et 120 μ malgré une augmentation de taille considérable (180 μ) ne peuvent élaborer de mucopolysaccharides. Seuls, ceux d'une taille supérieure à 140 μ (stade de l'apparition des mucopolysaccharides) évoluent dans le sens de la maturation normale.

En condition anormonale, les ovocytes de N. diversicolor évoluent toujours d'une façon différente de celle de l'ovogenèse naturelle. Ils se caractérisent par une structure particulière (développement d'une zone basophile péri-nucléaire) puis finissent par dégénérer.

Une telle différence dans le comportement ovocytaire est difficile à expliquer "a priori". Les très intéressants travaux de PORCHET (1969) permettent cependant d'expliquer quelques aspects de ce problème. Cet auteur implante des cerveaux faiblement actifs, provenant de femelles sub-matures (ovocytes 150-170 μ) dans des femelles de P. cultrifera décérébrées renfermant des ovocytes d'une taille inférieure à 100 μ (donc voués à une dégénérescence rapide après décérébration simple). Ces jeunes ovocytes subissent alors une croissance accélérée, ils acquièrent des mucopolysaccharides

et présentent, en fin d'évolution, la ségrégation cytoplasmique typique des ovocytes matures normaux. Cette expérience, comparable à celle réalisée par HAUENSCHILD (1964) chez Pl. dumerilii, montre que ces ovocytes ont besoin d'une faible concentration hormonale pour pouvoir accomplir complètement leur évolution.

Ces données nous conduisent à envisager la possibilité d'une compétence différente des ovocytes de Néréidiens dans leurs potentialités évolutives en l'absence du facteur hormonal. Ceux de N. pelagica présentent un développement quasi-normal dans de telles conditions ; par contre, ceux de P. cultrifera ont besoin, en dessous de 140μ , d'une faible concentration hormonale pour franchir l'étape de la synthèse des mucopolysaccharides (PORCHET, 1969). Nous avons vu d'autre part que, chez cette espèce, la levée de l'inhibition hormonale ne s'accompagne en été d'aucune réponse ovocytaire. Or durant cette période, les cerveaux des femelles sont actifs : implantés chez des mâles décérébrés, ils bloquent la spermatogénèse. Il semble donc qu'en été, les ovocytes de P. cultrifera se trouvent dans un état d'inertie totale ou d'incompétence par rapport aux conditions hormonales.

Chez N. diversicolor les ovocytes en expérimentation se sont toujours montrés incapables de parvenir à une maturation normale. Leur dépendance vis-à-vis d'un taux déterminé d'hormone pourrait être très stricte. Dès 1965, HAUENSCHILD avait suggéré qu'une corrélation étroite pourrait exister entre les phases de l'évolution ovocytaire et le taux d'hormone inhibitrice. La démonstration de cette hypothèse a pu être effectuée très récemment par DURCHON et PORCHET (1970) par une méthode de culture organotypique sur milieu liquide (CHEN). Il ressort de ce travail que le déroulement des étapes de l'ovogénèse est contrôlé par une variation du taux d'hormone cérébrale. Nous savons d'autre part que les ovocytes peuvent avoir un effet de "feed back" sur l'activité sécrétrice du cerveau (PORCHET, 1967, 1969). Chez N. diversicolor, il est possible que toute modification expérimentale, de l'interaction cerveau-ovocytes entraîne ces derniers vers une évolution aberrante, aboutissant finalement à la dégénérescence.

CONCLUSION

- Après une période de latence de 5 à 10 jours, la levée de l'inhibition hormonale se traduit chez les Néréidiens par une augmentation

rapide de la taille des ovocytes, sauf chez les femelles de P. cultrifera opérées en été.

- L'aspect cytologique des ovocytes ayant évolué en condition an hormonale varie selon les espèces et le stade de développement initial des cellules germinales.

- Les ovocytes de N. pelagica et de P. cultrifera atteignent à partir d'une taille respective de 50 et de 140 μ une morphologie analogue à celle des ovocytes matures normaux (ségrégation des éléments cytoplasmiques, élaboration d'une couche corticale de mucopolysaccharides).

- Les ovocytes de N. diversicolor et ceux de P. cultrifera d'une taille inférieure à 130 μ n'acquièrent pas, malgré l'augmentation de leur volume, les caractères cytologiques des ovocytes témoins d'une taille équivalente.

- Chez N. diversicolor, l'étude de l'évolution ovocytaire en l'absence d'hormone a été effectuée à la fois "in vitro" et "in vivo". Dans tous les cas, les ovocytes après différenciation d'une zone basophile péri-nucléaire finissent par dégénérer. En culture organotypique, l'association, en cours de culture, d'un prostomium à des parapodes montre que jusqu'au 6ème jour, l'absence d'hormone n'entraîne pas d'effets irréversibles. Passé ce laps de temps les ovocytes s'acheminent vers la dégénérescence, même en présence d'hormone.

Les divergences de réaction entre les ovocytes étudiés semblent indiquer, qu'en condition an hormonale, l'évolution des ovocytes ne pourrait s'effectuer d'une façon comparable aux processus normaux de maturation que lorsque les gamètes ont atteint un seuil de compétence variable selon les espèces. Cette hypothèse est discutée en fonction des acquisitions récentes portant sur les corrélations endocrines de la gamétogenèse chez les Néréidiens.

CHAPITRE XI

INFLUENCE DE L'ABSENCE D'HORMONE CEREBRALE SUR LE METABOLISME OVOCYTAIRE

INTRODUCTION

Cette étude abordée par la technique autoradiographique a porté essentiellement sur les ovocytes de N. diversicolor. Ce choix a été effectué pour deux raisons. D'une part le métabolisme de ces ovocytes avait été examiné d'une façon approfondie au cours de l'ovogenèse naturelle. D'autre part, ces ovocytes, en condition an hormonale, présentent une évolution cytologique anormale laissant présager une déviation du métabolisme cellulaire. Il importait donc de préciser l'importance et la nature des perturbations métaboliques déclenchées par l'absence d'hormone cérébrale.

Ce problème a été envisagé par l'établissement de cinétiques d'incorporation après des durées variées d'évolution en condition expérimentale, de façon à permettre une comparaison efficace avec les processus de synthèses se déroulant au cours de l'ovogenèse naturelle.

Les ovocytes de N. pelagica qui, en l'absence d'hormone, présentent une évolution cytologique comparable à celle des conditions naturelles, n'ont fait l'objet, faute de temps, que d'investigations partielles. Ces examens avaient pour but de vérifier l'analogie des processus métaboliques survenant dans les conditions naturelles et expérimentales.

I. MATERIEL ET TECHNIQUES

Les précurseurs employés sont les mêmes que ceux utilisés dans l'étude de l'ovogenèse naturelle (Chapitre II) ; à savoir l'uridine ^3H pour les synthèses d'ARN, la leucine ^3H pour celles des protéines totales et enfin la lysine ^3H et l'arginine ^3H en tant que précurseurs de l'élaboration des protéines basiques.

L'expérimentation a porté sur des ovocytes de N. diversicolor d'un diamètre initial compris entre 80 et 110 μ . Après section des vers dans la zone médiane du corps, les tronçons antérieurs (témoins) et postérieurs (privés d'hormone) reçoivent à différents temps d'évolution, une injection

de précurseur dont la dose est proportionnelle au poids respectif des tronçons (1). La chasse du précurseur a été effectuée dans certaines séries expérimentales.

II. INCORPORATION D'URIDINE ³H (Tableau 13 et 14)

Durant les quinze premiers jours d'évolution, en condition an hormonale, on constate un accroissement du taux des synthèses nucléolaires par rapport aux ovocytes témoins de la région antérieure.

Dans le cytoplasme, le marquage est sensiblement équivalent par unité de surface à celui des témoins ; il coïncide avec les travées basophiles situées entre les inclusions lipidiques et protéiques. Quand l'évolution ovocytaire s'accroît, il apparaît au niveau de la zone basophile péri-nucléaire.

Après 22 jours d'évolution, c'est-à-dire quand les ovocytes en expérimentation atteignent leur taille maximum, le taux d'incorporation d'uridine ³H présente une chute brutale (Tableau 14). Un marquage atténué persiste au niveau de l'amphinucléole, il est souvent localisé à un seul hémisphère de cet organite. La zone péri-nucléaire, malgré sa basophilie élevée ne présente plus qu'un taux très faible de radioactivité.

Tableau 13

Incorporation d'uridine ³H après 14 jours
d'évolution en l'absence d'hormone

Temps d'incorporation	nucléole	nucléoplasme	cytopl.	vitellus protéique
1 h	+	-		-
6 h	+++	-	qq. grains	-
24 h	++++	+	+	-
48 h	++++	++	+	-
5 jours	+++	++	++	-

(1) Les tronçons antérieurs et postérieurs, isolés dans des boîtes de Pétri, sont gardés à la température de 15 ° C.

Tableau 14

Incorporation d'uridine ^3H après 22 jours
d'évolution en l'absence d'hormone

Temps d'incorporation	nucléole	nucléoplasme	cytopl.	vitellus protéique
24 h	+	quelques grains	-	-
5 jours	+	Idem	-	-

III. INCORPORATION DE LEUCINE ^3H (Tableau 15)

Durant les 12 premiers jours d'évolution, on note dans l'ensemble une augmentation globale de la radioactivité ovocytaire (quelques variations individuelles sont observées selon les vers en expérimentation).

L'aspect le plus spectaculaire est observé au niveau du nucléoplasme dont le taux de radioactivité apparaît nettement supérieur à celui des ovocytes témoins (Pl. 2, fig. 1).

Dans le cytoplasme le marquage est très abondant dans la zone corticale de l'ovocyte (Pl. 2, fig. 1). Dès le 10ème jour d'expérimentation on constate, par contre, l'absence de grains d'argent au niveau des lobules de vitellus protéique, ce qui semble indiquer l'arrêt des processus de vitellogenèse.

Au 16ème jour, la radioactivité diminue dans le cytoplasme.

Au 21ème jour d'expérimentation, le marquage baisse d'une façon très nette dans tous les sites cellulaires et devient extrêmement réduit.

Tableau 15

Incorporation ovocytaire de leucine ^3H

- après 10 jours d'évolution en absence d'hormone

Temps d'incorporation	nucléole	nucléoplasme	cytopl.	vitellus protéique
24 h	+++	+++	++	-

- après 16 jours d'évolution en absence d'hormone

Temps d'incorporation	nucléole	nucléoplasme	cytopl.	vitellus protéique
1 h	+	+	qq. grains	-
6 h	+++	++	+	-
24 h	+++	++	+	-
48 h	+++	++	+	-
4 jours	+++	++	+	-

- après 21 jours d'évolution en absence d'hormone

Temps d'incorporation	nucléole	nucléoplasme	cytopl.	vitellus protéique
24 h	+	+	+	-

IV. INCORPORATION DE LYSINE ^3H ET D'ARGININE ^3H

Les modalités d'incorporation de ces acides aminés sont très semblables à celles décrites précédemment pour l'incorporation de la leucine ^3H .

Durant les 12 premiers jours d'évolution, le taux d'incorporation est supérieur à la normale, mais ici encore on constate rapidement un arrêt de la concentration des grains d'argent au niveau du vitellus protéique.

- Après une évolution en l'absence d'hormone d'une durée de 3 semaines, une chute drastique du taux de radioactivité est constatée dans tous les ovocytes. Quel que soit le temps d'incorporation, les grains d'argent, peu nombreux, sont observés uniquement au niveau du nucléoplasme et des zones basophiles du cytoplasme (Pl. 3, fig. f).

V. DISCUSSION

Les variations du métabolisme ovocytaire au cours de l'évolution expérimentale des ovocytes semblent pouvoir être subdivisées en deux étapes.

Dans la première phase, on constate une augmentation générale de l'incorporation des précurseurs par rapport aux ovocytes témoins. Cette phase d'hyperactivité cellulaire est corrélative de la croissance accélérée des ovocytes.

Les synthèses d'ARN, en dehors des variations quantitatives ne présentent pas de différences marquées dans leur cinétique par rapport à celles survenant au cours de l'ovogenèse naturelle.

Par contre, en l'absence d'hormone, l'incorporation des précurseurs de protéines présente des modifications importantes observées à la fois au niveau du nucléoplasme et du cytoplasme.

Dans le nucléoplasme on constate, à la suite d'une injection de leucine ^3H , une augmentation spectaculaire du taux de radioactivité. Ce processus pourrait être dû, soit à une augmentation de la teneur en protéines de la vésicule germinative, soit à un ralentissement, voire à un blocage du transfert du matériel nucléaire vers le cytoplasme. En l'absence de toute donnée biochimique, il est difficile pour l'instant de dissocier ces deux processus. Dans le cytoplasme, la radioactivité est particulièrement élevée dans la zone corticale, c'est-à-dire à l'endroit où s'effectuent initialement les synthèses de protéines précurseurs du vitellus (Chapitre VI). Mais en l'absence d'hormone, même pour des temps d'incorporation de longues durées (48 heures et plus), on n'observe jamais de condensation de la radioactivité au niveau des lobules de vitellus protéique, ce qui semble indiquer que la croissance de ces éléments est stoppée. Cette déviation du métabolisme pourrait résulter en particulier de la dégénérescence précoce de l'appareil de Golgi (voir Chapitre XVI) ; l'involution de cet organite entraînant la suppression d'un maillon indispensable dans la chaîne des synthèses protéiques du vitellus.

De même, en condition anormonale, le marquage consécutif à l'incorporation d'arginine ^3H et de lysine ^3H reste localisé uniquement au niveau des travées basophiles du cytoplasme. Etant donné la liaison possible entre les protéines basiques et l'ARN ribosomal, il se pourrait que la persistance du marquage à ce niveau traduise le maintien d'une association qui aurait pour conséquence l'inhibition progressive de l'activité fonctionnelle des ribosomes.

Au cours de la deuxième phase de l'évolution ovocytaire, on constate effectivement une chute spectaculaire de l'incorporation des précurseurs marqués.

Les ovocytes qui à ce moment ont atteint leur maximum de développement parviennent à une sorte d'inertie métabolique qui contraste avec l'hyperphasie cellulaire. Chez N. diversicolor, l'absence d'hormone est donc suivie d'une déviation du métabolisme cellulaire, prélude à la dégénérescence de ces cellules.

Chez N. pelagica, espèce où les ovocytes en l'absence d'hormone parviennent à une maturation anticipée, nous avons constaté par contre que les synthèses d'ARN se poursuivent au cours de l'évolution ovocytaire selon un processus comparable à celui de l'ovogenèse naturelle.

En l'absence d'hormone, l'évolution du métabolisme ovocytaire souligne donc le comportement cytologique anormal des ovocytes voués à la dégénérescence (N. diversicolor) ; elle s'effectue par contre d'une façon comparable à celle de l'ovogenèse naturelle dans le cas des ovocytes aboutissant à un état de maturation analogue à celui qui est atteint dans les conditions naturelles (N. pelagica).

CONCLUSION

Chez N. diversicolor, l'évolution ovocytaire en condition anormale débute par une phase d'accélération des processus métaboliques, corrélative de la croissance accélérée des ovocytes.

Cependant on constate de façon précoce l'arrêt de la croissance des lobules vitellins (10ème jour d'évolution environ). Ce blocage de la vitellogenèse pourrait résulter de la dégénérescence de l'appareil de Golgi.

- Une interaction existe vraisemblablement entre le déséquilibre métabolique du cytoplasme et celui du noyau (accumulation de radioactivité dans le nucléoplasme). Cette déviation de l'activité cellulaire entraîne rapidement une chute générale du métabolisme de l'ovocyte. Ces cellules, malgré leur aspect hyperplasique, sont alors dans un état d'inertie métabolique qui prélude à une phase de dégénérescence.

- Par contre, chez N. pelagica, espèce où les ovocytes parviennent d'une façon anticipée à une maturation normale, les synthèses d'ARN se poursuivent au cours de l'évolution ovocytaire selon un processus comparable à celui de l'ovogenèse naturelle.

CHAPITRE XIII

LE NOYAU ET LES INCLUSIONS NUCLEAIRES

Notre étude de l'évolution nucléaire au cours de l'ovogenèse naturelle avait porté sur trois points principaux :

- les synthèses d'ADN ovocytaire
- les transformations du nucléole
- les inclusions intra-nucléaires

Le déroulement des synthèses d'ADN ovocytaire en condition anormale sera envisagé dans le chapitre XV, conjointement à celui des synthèses d'ADN des spermatoctes de façon à établir une comparaison efficiente entre les deux lignées germinales.

Dans ce chapitre, notre étude sera consacrée tout d'abord à l'évolution du nucléole puis à la morphologie et au mode de formation des inclusions intra-nucléaires.

I. LE NUCLEOLE

1 - Observations

L'évolution du nucléole des ovocytes en expérimentation a été suivie uniquement en microscopie photonique.

Chez N. diversicolor, au cours de l'ovogenèse naturelle, l'unique nucléole se scinde, à l'approche de la maturation, en deux hémisphères, l'un basophile, l'autre acidophile. Dans ce dernier, la teneur en ARN régresse progressivement et la coloration par le bleu de toluidine ou la pyronine finit par devenir négative. On assiste alors à une dislocation du nucléole central en de petits fragments nucléolaires situés à proximité de l'enveloppe nucléaire.

Une évolution similaire est observée précocement au cours de l'ovogenèse expérimentale (10 jours en culture organotypique, 20 jours environ "in vivo"). Après avoir acquis une ségrégation très nette en deux hémisphères (Pl. 59, fig. b et d), le nucléole se dissocie en de petits massifs fréquemment localisés à proximité des inclusions intra-nucléaires (Pl. 62, fig. b).

Chez N. pelagica, le cycle nucléolaire particulièrement complexe (chapitre IV) est caractérisé vers la fin de la vitellogenèse par une phase de dislocation suivie de la reconstitution du massif nucléolaire, stade à la suite duquel la basophilie des constituants nucléolaires diminue. Une dissociation ultime du nucléole survient peu de temps avant la maturation ovocytaire.

Après 20 jours d'évolution en condition an hormonale, on observe dans le noyau la présence de nombreux éléments nucléolaires pauvres en ARN. Cette morphologie évoque celle observée dans les ovocytes sub-épitoques témoins.

Après 25 à 30 jours d'expérimentation, on constate, comme dans le cas des ovocytes sub-matures la présence de nombreux fragments nucléolaires dans la zone corticale du nucléoplasme. Ces éléments disparaissent rapidement et le nucléoplasme pratiquement vide (Pl. 58, fig. f) ne renferme plus que de très rares éléments au contour mal défini.

c - Discussion

En condition an hormonale, le déroulement du cycle nucléolaire paraît s'effectuer dans ses grandes lignes selon un schéma comparable à celui de l'ovogenèse naturelle. Il est à noter cependant que les modifications du nucléole semblent devancer d'une façon assez nette celles du cytoplasme. Ce décalage laisse supposer que le déséquilibre hormonal pourrait jouer très tôt un rôle particulièrement important au niveau du nucléole. Nous nous proposons de reprendre ce problème en ultrastructure de façon à préciser les modifications survenant en l'absence d'hormone au niveau des composants nucléolaires.

II. LES INCLUSIONS INTRA-NUCLEAIRES

Au cours de l'ovogenèse naturelle, nous avons signalé dans le chapitre consacré au noyau, l'apparition à l'approche de la maturité sexuelle, de lamelles annelées intranucléaires dans les ovocytes de N. pelagica, et de vésicules d'une structure complexe dans ceux de N. diversicolor. Ces formations apparaissent également dans les ovocytes ayant subi une croissance accélérée en l'absence d'hormone cérébrale. Elles sont dans ce cas plus nombreuses et plus développées qu'au cours de la maturation normale.

A - LES LAMELLES ANNELEES INTRA-NUCLEAIRES

1 - Etude morphologique

Chez N. pelagica, en condition an hormonale ces formations

lamellaires peuvent atteindre une longueur d'environ 2μ (Pl. 60, fig. b). Elles s'élargissent parfois à leur extrémité en des vésicules d'une taille variant entre 1500 et 2500 Å. Les lamelles annelées intra-nucléaires sont toujours localisées à proximité de l'enveloppe nucléaire. Elles sont orientées le plus souvent obliquement ou perpendiculairement par rapport à cette dernière (Pl. 61, fig. a) ; elles ne sont jamais associées en des empilements groupant de nombreux éléments comme dans le cas des lamelles annelées cytoplasmiques.

Les formations annulaires des lamelles intra-nucléaires, d'un diamètre total d'environ 1400 Å, sont d'une structure comparable à celles de l'enveloppe nucléaire, (Pl. 60, fig. b et Pl. 61, fig. c).

Les pores renferment fréquemment un matériel dense finement granuleux ; leur fréquence est généralement moins élevée dans les lamelles annelées qu'au niveau de la paroi nucléaire.

2 - Mode de formation

Les lamelles annelées intra-nucléaires semblent s'édifier à partir de petites vésicules accolées à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire. Chez N. pelagica, ces vésicules, par une augmentation progressive de leur taille, forment des lames d'un diamètre d'environ 300 Å et d'une longueur atteignant $0,25 \mu$ (Pl. 61, fig. b). Chez N. diversicolor contrairement à celui des ovocytes issus de l'ovogenèse naturelle, le noyau des ovocytes en expérimentation renferme des lamelles annelées. Dans ce cas, on observe de fréquentes associations entre deux petites vésicules d'une taille n'excédant pas 800 Å (Pl. 64, fig. a et c). Dans cette zone de fusion partielle, la structure d'un pore annulaire semble se différencier progressivement. Un tel processus, observé par KESSEL (1964 et 1965) chez les Tuniciers, pourrait être à l'origine de l'élaboration des lamelles annelées intra-nucléaires ; certaines d'entre elles gardent en effet l'aspect d'une chaînette de vésicules reliées par l'intermédiaire d'éléments annulaires (Pl. 65, fig. a).

B - LES VESICULES INTRA-NUCLEAIRES

1 - Etude morphologique

Elles se présentent sous l'aspect de vésicules de grande taille, sensiblement sphériques, renfermant des granules d'un contenu de densité électronique élevée (Pl. 62, fig. a et b). Ces éléments sont particulièrement caractéristiques des ovocytes de N. diversicolor, mais on

en observe également dans les ovocytes de P. cultrifera ayant évolué en l'absence d'hormone et beaucoup plus rarement, dans ceux de N. pelagica (Pl. 60, fig. b).

Chez N. diversicolor, ces inclusions sont beaucoup plus nombreuses qu'au cours de l'ovogenèse naturelle (Chapitre III). On peut en dénombrer jusqu'à une centaine par section de noyau. Toujours localisées dans le nucléoplasme proche de l'enveloppe nucléaire, ces formations acquièrent une taille importante pouvant atteindre $0,9 \mu$ (Pl. 62, fig. b) (rappelons que cette dernière ne dépassait guère $0,6 \mu$ dans le cas de l'ovogenèse naturelle) (Pl. 62, fig. a). Le nombre de granules intravésiculaires est également plus élevé et l'on peut en dénombrer jusque 8 ou 10 par vésicule. Dans ce cas, certains granules ne renferment plus que très peu de matériel dense et leur contenu présente alors un aspect analogue à celui du nucléoplasme. Beaucoup plus rarement, on note l'apparition de granulations très denses, sans membrane, d'une morphologie comparable à celle du glycogène (Pl. 62, fig. b). Ces dernières observations ne résultent toutefois que d'une seule série expérimentale.

La paroi des vésicules présente fréquemment des invaginations (Pl. 64, fig. b et Pl. 65, fig. a). On observe, à l'intérieur des replis de la membrane, un dépôt de matériel dense de même aspect que le contenu des granules intra-nucléaires.

Certaines micrographies montrent nettement une relation entre les inclusions vésiculaires et les lamelles annelées (Pl. 64, fig. b et Pl. 65, fig. a). En outre, la paroi des vésicules présente fréquemment des expansions lamellaires ; ces dernières pourraient représenter les vestiges d'une association entre ces deux systèmes.

2 - Etude cytochimique

Cette étude a été réalisée sur des ovocytes de N. diversicolor ayant évolué en l'absence d'hormone pendant 25 jours.

Dans le but de préciser la nature chimique du matériel dense contenu dans les granules des vésicules intra-nucléaires, nous avons été amené à utiliser la technique des digestions enzymatiques. L'action de la pepsine à 37°C (pepsine 0,2 % dans HCl 0,1 M) pendant 20 minutes entraîne une diminution de la densité de ce matériel, qui est complètement extrait après une durée d'environ 50 minutes (Pl. 65, fig. b). Dans le cytoplasme, on observe à ce moment, la digestion du matériel matriciel des mitochondries et une atténuation de la densité du vitellus. La structure des ribosomes reste bien conservée.

Le flottage des coupes sur une solution d'ARNase à 0,15 % pendant une heure trente entraîne la disparition des ribosomes cytoplasmiques ; par contre, cette enzyme ne semble pas agir sur la structure des granulations intra-nucléaires. L'utilisation de l'ADNase n'a pas été effectuée sur les ultra-coupes, toutefois les observations réalisées en microscopie photonique à la suite de la technique de Feulgen n'ont pas permis de déceler de réactions positives au niveau des granules intra-nucléaires.

Il semble donc que des protéines constituent une partie importante du matériel intra-vésiculaire ; l'association éventuelle de ces protéines à de l'ARN n'a pu être démontrée.

III. DISCUSSION

1 - Structure et répartition des lamelles annelées et des inclusions intra-nucléaires.

- La présence de lamelles annelées à l'intérieur du noyau constitue un phénomène assez rare. L'existence de telles formations a été signalée essentiellement dans la vésicule germinative de divers ovocytes d'Echinodermes (MERRIAM, 1959), et surtout ovocytes de Tuniciers (HSU, 1963 ; KESSEL, 1964 a, 1965 ; EVERINGHAM, 1968) et d'Annélides (DHAINAUT, 1966 a ; EISENSTADT, 1965). Leur présence a également été mentionnée dans le pronucleus de l'œuf humain (ZAMBONI et al., 1966) et dans des cellules germinales mâles de Crustacés (KESSEL, 1968 e) et d'Insectes (FOLLIOU, 1968).

Les lamelles annelées intra-nucléaires présentent des caractéristiques morphologiques très comparables dans tous les groupes examinés (HSU, 1967). Elles sont toujours situées à proximité de l'enveloppe nucléaire, et sont généralement orientées obliquement ou perpendiculairement par rapport à cette dernière. Elles sont le plus souvent isolées et ne constituent jamais des empilements considérables comme dans le cas des lamelles annelées cytoplasmiques. La continuité des lamelles annelées intra-nucléaires avec la membrane nucléaire interne a été signalée par certains auteurs (EVERINGHAM, 1968 ; FOLLIOU, 1968).

- Les inclusions intra-nucléaires du type observé dans les ovocytes de N. diversicolor constituent à notre connaissance une particularité unique du noyau des cellules germinales. Elles présentent par contre certaines analogies avec les formations désignées par les auteurs anglo-saxons sous le terme de "nuclear bodies". De tels organites ont été décrits dans différents tissus (cellules de l'épididyme (NICANDER, 1964 ; HORSTMANN et al., 1966 ; SIMAR et LEMAIRE, 1966), cellules rénales (LATA et

MAUNSBACH, 1962 ; FARQUHAR et PALADE, 1962) et de la cortico-surrénale (WEBER et al., 1964)). Leur fréquence semble relativement élevée dans les cellules atteintes d'infections virales ou tumorales (BOUTEILLE et al., 1967 ; KRISHAN et al., 1967). Cependant, contrairement à celle des inclusions ovocytaires, l'origine des "nuclear bodies" semble se situer à l'intérieur du nucléoplasme, parfois à proximité du nucléole central (LAFONTAINE et al., 1963; WEBER et al., 1964 ; KIERSZENBAUM, 1969). D'autre part, les "nuclear bodies" se présentent généralement sous l'aspect d'une auréole concentrique de microfibrilles au sein de laquelle peuvent se différencier des granules denses, mais ces derniers ne sont pratiquement jamais entourés par une membrane.

Dans les cellules de la cortico-surrénale (WEBER et al., 1964), les "nuclear bodies", sous l'action de l'ACTH, évoluent et acquièrent un aspect assez comparable à celui des formations ovocytaires de N. diversicolor. Ces corps ("multilocular bodies") sont situés à proximité de l'enveloppe nucléaire et peuvent être associés à des formations lamellaires. Ils renferment des lobules de faible densité groupés à l'intérieur d'une vésicule dont la paroi présente des processus d'invagination. WEBER signale que ces formations sont dépourvues d'ARN et d'ADN. Des constatations analogues ont été effectuées au niveau des "nuclear bodies" par NICANDER (1964) et par KRISHAN et al. (1967). Ce dernier auteur souligne par contre leur teneur élevée en protéines, critère mentionné par ailleurs par GOURANTON (1969 a) au sujet de cristaux intra-nucléaires.

2 - Processus de formation

Les premiers indices de l'apparition de formations intra-nucléaires, tant au cours de l'ovogenèse naturelle qu'expérimentale, résident dans l'édification de petites vésicules aplaties, accolées à l'enveloppe nucléaire. HSU (1963) et KESSEL (1965) chez les Tuniciers ont observé l'élaboration d'organites similaires par un processus de bourgeonnement de la membrane nucléaire interne. De tels aspects morphologiques n'ont été que rarement aperçus dans notre matériel (peut-être par suite de la rapidité de leur formation) ; toutefois il paraît vraisemblable qu'un processus analogue puisse être à l'origine des vésicules proches de l'enveloppe nucléaire.

La destinée des vésicules ainsi élaborées est complexe et pourrait être liée à la fois à l'élaboration des lamelles annelées et à celle des inclusions intra-nucléaires vésiculaires.

Chez les Néréidiens, comme chez les Tuniciers (KESSEL, 1965), la formation des lamelles annelées intra-nucléaires semble résulter d'une

association de vésicules, lesquelles incomplètement fusionnées, restent séparées par une zone renfermant un matériel dense. Dans cette zone s'édifierait progressivement une structure annulaire. L'accroissement des lamelles résulterait d'un enchaînement progressif de plusieurs associations de vésicules.

Chez N. diversicolor on n'observe pas l'apparition de lamelles annelées au cours de l'ovogenèse naturelle. Les vésicules restent isolées, elles augmentent progressivement de taille et acquièrent une forme sphérique. Ces vésicules semblent donc se transformer directement en inclusions nucléaires (Pl. 63. et Fig. XIII).

Au cours de l'ovogenèse expérimentale, par contre, un processus différent semble intervenir. Les inclusions intra-nucléaires, en effet, sont fréquemment en relation avec des lamelles annelées. Il est possible, comme le suggère le schéma de la Fig. XIII que l'extrémité dilatée des lamelles intra-nucléaires puisse être à l'origine de leur formation.

Les granules observés dans les inclusions intra-nucléaires résultent d'une invagination de la paroi de ces organites. La nature du matériel qui pénètre dans ces replis membranaires semble différente de celui des fragments nucléolaires abondants dans cette région. Si des relations de contiguité sont fréquemment observées entre ces deux types de formation, aucun échange morphologique de matériel n'a pu, par contre, être mis clairement en évidence. D'autre part, les micronucléoles semblent peu sensibles à l'action de la pepsine. En dehors, d'une quantité vraisemblablement peu importante d'ARN (très faible réaction aux colorants basophiles), ces nucléoles renferment une teneur élevée en protéines basiques comme en témoigne la coloration au vert solide après hydrolyse acide, (technique d'ALFERT et GESCHWIND). Or, on connaît la résistance de ce type de protéines à l'action de la pepsine (MAZIA et al. 1947).

Lors de l'apparition des inclusions intra-nucléaires, nous avons observé par contre dans le nucléoplasme, l'existence de petites granulations sensibles à l'action de la pepsine. L'origine de ces formations est encore inconnue, rien ne permet pour l'instant de la rattacher aux processus de fragmentation du nucléole.

3 - Signification physiologique des lamelles annelées et des inclusions intra-nucléaires.

La signification physiologique de ces organites reste obscure. Chez l'insecte Philaenus, FOLLIOU (1968) considère que les lamelles annelées

Fig. XIII - Schéma proposé pour l'explication de l'élaboration des formations intra-nucléaires de N. diversicolor.

A gauche (cas de l'ovogenèse naturelle) : Evolution des vésicules issues de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire (EN).

A droite (ovogenèse expérimentale), le processus se complique par suite de l'élaboration de lamelles annelées intra-nucléaires ; l'évolution de certaines d'entre elles pourrait conduire à l'édification des vésicules. N : noyau.

Fig. XIV - Schéma relatif à l'hypothèse de la formation des lamelles annelées cytoplasmiques de N. diversicolor.

Le matériel extrudé à partir des pores de l'enveloppe nucléaire (EN) pourrait induire la différenciation de pores annulaires au niveau des citernes du réticulum situées à proximité du noyau. Ce matériel, riche en protéines, pourrait être de même nature que celui intervenant dans l'édification ^{des} granules intra-vésiculaires. Son origine demeure inconnue.



Fig. XIII

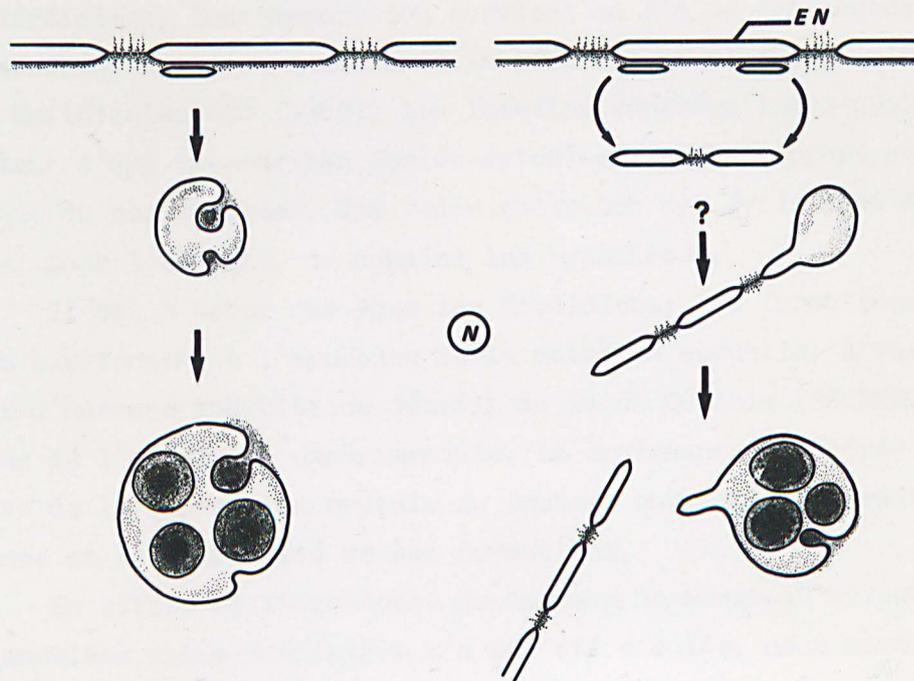
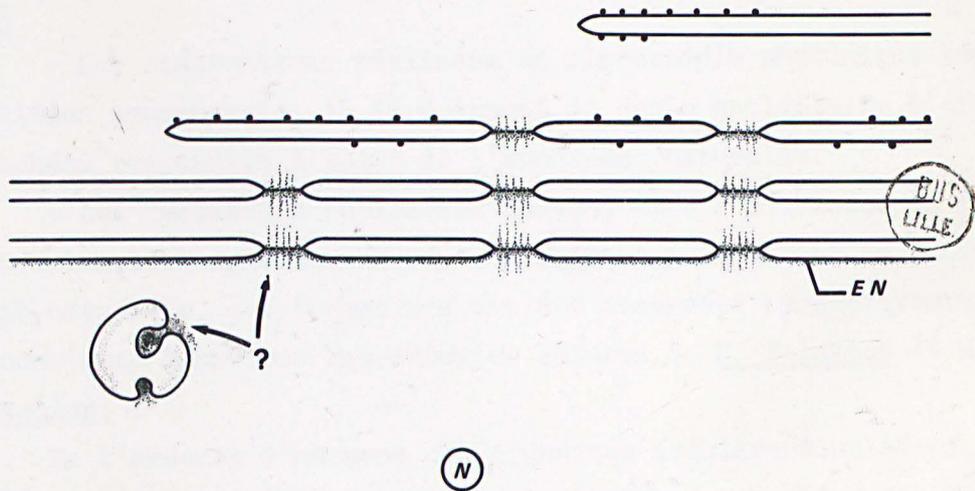


Fig. XIV



intra-nucléaires servent de support à la chromatine, mais ces observations, réalisées sur des spermatogonies, ne semblent pas pouvoir être étendues aux ovocytes, la chromatine de ces cellules n'étant pas morphologiquement décelable. EVERINGHAM (1968) suppose que ces formations pourraient représenter une sorte de réserve de membranes pour l'accroissement de l'enveloppe nucléaire. Chez les Néréidiens, leur apparition survient en fin de croissance ovocytaire et leur destinée, après la rupture de la vésicule germinative, n'a pu être précisée. Enfin selon HSU (1963), les lamelles annelées intra-nucléaires résulteraient d'une interaction nucléo-cytoplasmique en rapport avec l'activation génique du nucléoplasme. Une telle conception est évidemment séduisante mais reste, pour l'instant, du domaine des hypothèses.

Il est à noter que chez les Néréidiens, les formations intra-nucléaires surviennent à l'approche de la maturité sexuelle, à une période où le taux d'hormone inhibitrice décroît de façon notable (HAUENSCHILD, 1968). Dans le cas de l'ovogenèse expérimentale, la croissance accélérée des ovocytes, corrélative de la suppression brutale du facteur hormonal, pourrait expliquer l'importance et la complexité de ces formations.

En effet, si l'incidence des facteurs hormonaux au niveau des lamelles annelées intra-nucléaires n'a pas été étudiée, nous savons par contre que les inclusions intra-nucléaires de la surrénale évoluent sous l'action de l'A.C.T.H. (WEBER et al. 1964). D'une manière générale, il semble admis que ces formations, liées le plus souvent à une hyperactivité cellulaire, pourraient résulter d'une cause virale, tumorale, ou de conditions hormonales particulières (BOUTEILLE et al., 1967).

CONCLUSION

- Les observations réalisées en microscopie photonique montrent, qu'en condition anormale, le déroulement du cycle nucléolaire s'effectue selon un schéma comparable à celui de l'ovogenèse naturelle.

- Les inclusions nucléaires peuvent être subdivisées en deux catégories : lamelles annelées et vésicules intra-nucléaires. Au cours de l'ovogenèse naturelle, ces formations ont été observées respectivement et de façon constante dans tous les ovocytes matures de N. Pelagica et de N. diversicolor.

En l'absence d'hormone ces organites acquièrent un développement hypertrophique. D'autre part la présence simultanée de lamelles annelées et de vésicules intra-nucléaires a été constatée à la fois chez N. pelagica et N. diversicolor.

- Le mode de formation des inclusions intra-nucléaires est envisagé. Les lamelles annelées semblent résulter d'une association de petites vésicules localisées initialement à proximité de l'enveloppe nucléaire. L'augmentation progressive de la taille de ces petites vésicules serait également à l'origine des inclusions vésiculaires de grande dimension, particulièrement abondantes dans les ovocytes de N. diversicolor. Dans le cas de l'ovogenèse expérimentale, ces inclusions nucléaires pourraient également dériver d'une dilatation de l'extrémité des lamelles annelées (Fig. XIII).

- Le matériel dense des granules intra-vésiculaires est de nature protéique comme en témoigne la digestion par la pepsine après inclusion des ovocytes au GMA.

- L'abondance et l'hypertrophie des inclusions intra-nucléaires semblent liées à l'accélération des processus métaboliques corrélatifs de l'évolution ovocytaire en condition anormonale.

CHAPITRE XIII

LE RETICULUM ET LES LAMELLES ANNELEES CYTOPLASMIQUES

INTRODUCTION

Les premières études ultrastructurales réalisées sur des ovocytes ayant évolué en condition anormonale (DURCHON et BOILLY, 1964) avaient attiré l'attention, chez N. diversicolor, sur le développement des éléments du réticulum et l'abondance des lamelles annelées cytoplasmiques. Ces observations toutefois avaient été effectuées en culture organotypique sur des explants cultivés à la température constante de 20° C. Nous avons repris ce problème en faisant varier les conditions expérimentales (évolution "in vivo" à des températures variées) pour déterminer le rôle du métabolisme dans ces processus. Nous avons étendu, d'autre part, nos investigations à N. pelagica.

L'examen des ovocytes à des temps variés d'évolution permet d'établir, par ailleurs, une relation morphologique entre les éléments du réticulum et les lamelles annelées. Pour cette raison, nous avons abordé conjointement l'étude de ces deux catégories d'éléments cellulaires.

I - NEREIS DIVERSICOLOR

1 - Evolution ovocytaire "in vivo", à la température de 10 - 15° C

Après 20 à 25 jours d'évolution, ces ovocytes présentent, en microscopie optique, une zone basophile péri-nucléaire très caractéristique. En microscopie électronique, cette région du cytoplasme montre la présence de très nombreux ribosomes (responsables des réactions basophiles), des granulations alpha de glycogène et enfin de très nombreuses mitochondries, généralement de forme allongée (Pl. 66, fig. b). Les citernes de réticulum, lisse ou granulaire, sont rares. Presque absentes dans certains ovocytes, elles sont représentées dans d'autres, par des lames d'une longueur n'excédant pas 4 à 5 µ;

ces lames sont parfois rassemblées en des associations parallèles de 3 à 4 éléments.

Dans les ovocytes ayant évolué à température normale (10 - 15° C), les seules formations de réticulum présentes d'une façon constante sont observées au voisinage de l'enveloppe nucléaire ; elles apparaissent précocement au cours de l'évolution ovocytaire (10 à 15 jours environ), et sont représentées à ce stade par une ou deux lames de réticulum pratiquement agranulaire. Assez rapidement, ces lames se rapprochent de l'enveloppe nucléaire et s'orientent d'une façon rigoureusement parallèle à cette dernière. L'enveloppe nucléaire et les lames du réticulum sont séparées par une distance respective d'environ 1000 Å.

Vers le 20ème jour d'évolution, des pores apparaissent au niveau des lamelles cytoplasmiques. Ils sont situés en regard de ceux de l'enveloppe nucléaire et présentent une structure analogue (Pl. 65, fig. a et Pl. 67, fig. b) à la leur.

Quand plusieurs lamelles sont disposées concentriquement autour de l'enveloppe nucléaire, on note que l'apparition des pores est plus tardive au niveau des éléments les plus externes.

In vivo (15°C) et en condition anormonale, on constate que le nombre de lamelles annelées péri-nucléaires reste toujours limité à 3 ou 4 éléments au maximum, même dans des ovocytes ayant subi une évolution prolongée de l'ordre de 2 mois.

2 - Evolution ovocytaire "in vivo" à la température de 20° C

Ces ovocytes montrent une évolution morphologique plus rapide que dans le cas précédent. Les formations de glycogène deviennent extrêmement abondantes ; elles s'assemblent pour former de larges amas dans le cytoplasme de la zone péri-nucléaire. Dans cette zone, on observe fréquemment des accumulations très importantes de citernes ergastoplasmiques pouvant grouper une trentaine d'éléments (Pl. 67, fig. b). Au microscope optique, ces formations se présentent sous l'aspect de filaments très basophiles. Les citernes, dont la longueur peut atteindre jusque 10 µ, ont une disposition sensiblement parallèle. Elles se rapprochent les une des autres en certaines zones. A ce niveau, on observe fréquemment leur différenciation en structures annulaires (Pl. 67, fig. a). La répartition des pores le long des citernes ergastoplasmiques est assez irrégulière. Par contre, d'une lamelle à l'autre, les pores

occupent toujours une position identique ; situés les uns en face des autres, ils forment des alignements rectilignes pouvant intéresser une dizaine d'éléments ou plus.

Dans le cas des ovocytes ayant évolué à la température de 20° C nous avons retrouvé à la périphérie de l'enveloppe nucléaire la disposition concentrique des lamelles annelées ; leur nombre reste sensiblement analogue à celui observé dans le type d'expérimentation précédent.

3 - Evolution ovocytaire "in vitro" en culture organotypique

Cette étude réalisée par DURCHON et BOILLY (1964) a fourni les données les plus spectaculaires concernant la prolifération des lamelles annelées cytoplasmiques. Dans des ovocytes ayant subi une évolution de 20 jours en condition an hormonale, la zone périnucléaire est occupée en certains endroits par des lamelles annelées assemblées en des empilements de 90 rangées sur une longueur de 20 μ . Ces observations avaient été effectuées après fixation au tétroxyde d'osmium. Nous avons repris cette méthode d'obtention de lamelles annelées et, afin de préciser la morphologie de ces éléments, nous avons utilisé la double fixation ^{à la} glutaraldéhyde et à l'osmium. D'autres ovocytes, fixés uniquement à la glutaraldéhyde ont été inclus dans du glycol-métacrylate (LEDUC et BERNHARD, 1967) pour permettre une étude par digestion enzymatique.

a) Observations morphologiques

Les pores des lamelles annelées ont une structure analogue à ceux de l'enveloppe nucléaire. Ils sont limités par un anneau de densité élevée. Le diamètre extérieur de cet anneau examiné en section tangentielle (Pl. 68, fig. a et b) est d'environ 1350 Å ; son diamètre interne se situe aux alentours de 750 Å. Chaque pore renferme dans sa zone centrale un élément granulaire dense ; la paroi de l'anneau renferme 8 éléments de structure tubulaire (Pl. 68, fig. b).

Chaque lamelle est constituée de deux membranes dépourvues de ribosomes séparées par un espace inter-membranaire clair d'environ 400 Å. Les pores des différentes lamelles sont superposés en un alignement rectiligne. Ils sont réunis les uns aux autres par un matériel dense d'une structure très finement granulaire (Pl. 69, fig. b).

b) Digestions enzymatiques

- Action de la RNase (RNase à 0,15 % dans l'eau distillée à pH : 6,8)

Après flottage des coupes pendant 4 heures à 37° C, elle n'entraîne qu'une diminution partielle de la densité du matériel situé au niveau des pores lamellaires.

- Action de la pepsine (0,2 % dans HCl 0,1 M)

Cette action est beaucoup plus drastique. Elle détermine après 50 minutes de digestion, la disparition presque complète du matériel dense situé dans la zone des anneaux (Pl. 69, fig. c) ; seuls persistent à ce niveau de très fins granules d'une taille très inférieure à celle des ribosomes. Par contre, les ribosomes des citernes ergastoplasmiques prolongeant les lamelles annelées ne sont pas dégradés et restent très denses.

- La digestion par la pepsine pendant 30 minutes suivie, après lavage à l'eau distillée, d'une action de l'ARNase pendant 2 heures fournit des résultats comparables à l'action de la pepsine seule. Les structures annulaires deviennent difficilement discernables ; en outre, les ribosomes des citernes ergastoplasmiques sont fortement dégradés.

Les résultats obtenus par les digestions enzymatiques semblent indiquer que le matériel en relation avec les lamelles annelées est constitué en majeure partie de protéines, vraisemblablement associées à une faible quantité d'ARN.

II - NEREIS PELAGICA

Cette étude a porté uniquement sur une évolution ovocytaire "in vivo" dans des tronçons postérieurs de vers maintenus à la température de l'aquarium (10 à 15° C). Une température plus élevée (de l'ordre de 20° C) se montre rapidement létale.

Le développement considérable des éléments du réticulum constitue un des critères les plus marquants de l'évolution ovocytaire en condition anormale. Cet accroissement débute précocement, dix jours environ après l'opération. Les citernes aplaties de réticulum sont localisées essentiellement dans la zone corticale de l'ovocyte et dans la zone péri-nucléaire. Dans

la zone corticale, 4 à 5 éléments sont parfois associés et enroulés concentriquement. Autour du noyau, les citernes sont disposées parallèlement à l'enveloppe nucléaire, mais contrairement au cas de N. diversicolor, elles n'apparaissent jamais accolées à cette dernière.

Dans les ovocytes submatures (30 à 40 jours) une association étroite se manifeste fréquemment entre plusieurs éléments du réticulum et s'accompagne de leur différenciation en pores annulaires.

Dans les ovocytes de N. pelagica, la présence de lamelles annelées, accolées à la paroi du noyau, n'a été qu'exceptionnellement constatée. Les formations annulaires, groupant une dizaine d'éléments sont disséminées dans la zone périnucléaire, elles peuvent atteindre une longueur de 6 à 7 μ (Pl. 69, fig. a).

III- DISCUSSION

1 - Répartition et structure des lamelles annelées cytoplasmiques

Les lamelles annelées cytoplasmiques ont été observées en premier lieu par AFZELIUS (1955) et REBHUN (1956) dans des ovocytes d'Echinodermes et de Mollusques. Le terme de "lamelles annelées" leur a été décerné par SWIFT (1956). Leur présence semble particulièrement fréquente dans les ovocytes et les spermatozoïdes, elle a également été signalée dans certaines cellules somatiques, notamment les cellules tumorales. KESSEL (1968e) a fourni une bibliographie fort complète de la répartition de ces formations.

Malgré la grande diversité des observations effectuées, un certain nombre de critères communs se dégagent des études portant sur les lamelles annelées.

- Les lamelles annelées sont parfois isolées dans le cytoplasme, mais elles sont le plus souvent associées en un empilement d'éléments disposés parallèlement. L'intervalle séparant les éléments respectifs est constant et se situe ordinairement entre 800 et 1000 Å (KESSEL, 1968e). Dans le cas d'éléments adjacents à la paroi nucléaire, la distance entre cette dernière et la première lamelle annelée est approximativement la même qu'entre les différentes lamelles d'un empilement.

- La dimension des pores et anneaux est comparable à celle des éléments correspondants de l'enveloppe nucléaire. Toutefois, les granules centraux semblent moins fréquents dans les pores des lamelles annelées que dans ceux

de l'enveloppe nucléaire (KESSEL, 1968d). On constate qu'à l'intérieur d'un empilement de lamelles annelées, les pores des différentes lamelles sont superposés et forment des alignements rectilignes.

- Les lamelles annelées sont fréquemment en association étroite avec l'ergastoplasme. Cette continuité a été décrite dans diverses cellules somatiques (BEULATON, 1968a; FRASCA et coll., 1967) dans des cellules tumorales (CHAMBERS et WEISER, 1964), dans des ovocytes de Mollusques (REBHUN, 1961), de Tuniciers (KESSEL, 1965), d'Echinodermes (KESSEL, 1966b) et d'Insectes (KESSEL et BEAMS, 1969).

Ces observations paraissent suggérer que ces formations correspondent à une différenciation locale du réticulum endoplasmique par formation de pores (BEULATON, 1968a). Au cours de l'ovogenèse expérimentale des Néréidiens, nous avons constaté que l'apparition des citernes ergastoplasmiques précède celle des lamelles annelées.

- Les empilements de lamelles constituent en microscopie optique des ensembles très basophiles. Cette basophilie semble due en majeure partie à la présence d'ARN. Cependant la présence de particules de la taille des ribosomes semble être assez exceptionnelle au niveau des lamelles annelées. RUTHMAN (1958) admet que cet ARN pourrait se présenter sous une forme distincte de la forme particulaire classique ; il serait représenté selon KESSEL et BEAMS (1969) à la fois par des granules denses de 40 à 70 Å et de minces filaments d'une épaisseur inférieure à 40 Å.

Dans les ovocytes de Néréidiens, la digestion par l'ARNase entraîne la suppression de la coloration par le bleu de toluidine. Cependant il semble que l'ARN ne soit pas le constituant unique du matériel entourant les pores lamellaires. La digestion par la pepsine sur coupe de GMA entraîne une très nette diminution de la densité de ce matériel tandis que celle des ribosomes n'est pas altérée.

L'existence de protéines à ce niveau semble probable. Elle a également été envisagée par BEULATON (1968 a, 1968 b) qui a démontré l'existence d'un matériel digestible par la pepsine au niveau des pores nucléaires des cellules de la glande prothoracique du ver à soie et considère comme vraisemblable l'existence d'un matériel de nature chimique similaire au niveau des lamelles annelées.

Ces protéines seraient éventuellement du type acide. La pepsine rompt de préférence les liaisons entre le radical carboxyle en position

alpha d'un acide aminé acide (acide aspartique et acide glutamique) et la fonction aminé d'un acide aminé aromatique (tryptophane) (CLEROT, 1968). MAZIA et coll. (1947) ont remarqué d'autre part que la pepsine ne digère ni les histones, ni les histones combinées en solution. Il n'est cependant pas certain que l'on puisse étendre ces résultats à des protéines de tissus fixés, car de nombreuses variations physiques et chimiques se produisent au cours de la fixation et l'inclusion (PEARSE, 1960).

D'autre part, la coloration des protéines basiques reste toujours très faible dans le cytoplasme péri-nucléaire ; zone où se différencient les lamelles annelées.

2 - Origine des lamelles annelées cytoplasmiques

La ressemblance entre les lamelles annelées et l'enveloppe nucléaire est trop évidente pour que l'on n'ait pas cherché l'existence de relations entre ces deux structures. Pour un certain nombre d'auteurs, les lamelles annelées auraient leur origine dans l'enveloppe nucléaire mais plusieurs hypothèses sont envisagées pour expliquer leur formation à partir de cette dernière.

Les hypothèses basées sur une délamination (SWIFT, 1956) ou une fragmentation de l'enveloppe nucléaire (AFZELIUS, 1955) semblent actuellement délaissées. Seuls BALL et coll. (1968) ont retenu récemment la deuxième explication dans leur étude de l'oeuf d'Arbacia.

Selon KESSEL (1963), les nombreuses vésicules qui apparaissent dans l'ovocyte de Necturus aux dépens de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire seraient à l'origine de la différenciation des lamelles par fusion de vésicules alignées. L'excellente iconographie fournie par cet auteur est assez convaincante dans le cas de cet ovocyte ; cette hypothèse cependant ne peut pas être retenue lorsque la présence de citernes ergastoplasmiques est antérieure à celle des lamelles annelées.

Dans un travail beaucoup plus récent, KESSEL et BEAMS (1969) envisagent une hypothèse totalement différente. Dans les ovocytes de la libellule, Libellula pulchella, des masses cytoplasmiques de grande taille, à caractère basophile, semblent constituer l'équivalent de noyaux vitellins. Ces formations semblent résulter d'une extrusion massive de matériel nucléaire. Dans

le cytoplasme à l'intérieur de ce matériel basophile, les lames de réticulum présentent une structure annulaire typique. Elles se prolongent par contre, à l'extérieur en des citernes ergastoplasmiques non différenciées. KESSEL et BEAMS suggèrent que "l'ARN présent en de telles zones peut stocker des informations qui seraient capables d'exercer une influence sur la différenciation des pores membranaires". Dans les ovogonies et les très jeunes ovocytes de Libellula pulchella où il n'existe pas de noyau vitellin nettement différencié, les lamelles cytoplasmiques se différencient à proximité immédiate de l'enveloppe nucléaire. KESSEL et BEAMS, reprenant partiellement des hypothèses émises par SWIFT (1956) et HARRISSON (1966), considèrent qu'à ce niveau, le matériel associé aux pores de l'enveloppe nucléaire pourrait exercer une action inductrice sur la différenciation des lames du réticulum en pores annulaires.

Une telle hypothèse est séduisante et s'intègre assez bien dans le cadre de nos propres observations. En effet, cette hypothèse tient compte du fait que l'apparition des lamelles annelées est postérieure à celle de l'ergastoplasme. Elle explique, d'autre part, la concordance topographique observée entre les pores de l'enveloppe nucléaire et ceux des lamelles annelées proches de cette dernière (Pl. 67, fig. b et Fig. XIV). Elle ne peut toutefois être admise sans réserve et se doit d'être envisagée en un examen critique en fonction de nos résultats.

a) Les extrusions de matériel nucléaire sont très importantes à certains stades de l'ovogénèse des Néréidiens, or ces échanges nucléo-cytoplasmiques, démontrés chez N. pelagica par autoradiographie à haute résolution, ne s'accompagnent pas d'une différenciation du réticulum. A la fin de l'évolution ovocytaire en absence d'hormone, l'injection de précurseurs radioactifs (Uridine ^3H , leucine ^3H , lysine ^3H , arginine ^3H) n'est pas suivie d'un marquage notable dans la zone basophile péri-nucléaire. Au contraire, à ce moment, c'est à dire lors de l'apparition des lamelles annelées, les échanges nucléo-cytoplasmiques paraissent ralentis par rapport à l'ovogénèse naturelle. Dans son étude sur Necturus, KESSEL (1968e) signale également qu'il n'a pas été possible de mettre en évidence une incorporation sélective de précurseurs d'acides nucléiques au niveau des lamelles annelées.

Ces résultats ne permettent cependant pas de rejeter à priori l'existence à ce stade d'un transport de matériel vers le cytoplasme. Les

pores de l'enveloppe nucléaire renferment en effet un matériel fibrillaire dense. D'autre part, il est possible que les substances impliquées dans la transformation des citernes ergastoplasmiques diffèrent de celles élaborées au cours du métabolisme normal.

b) A l'intérieur du cytoplasme, les associations des lamelles annelées avec un matériel d'origine nucléaire semblent limitées à quelques cas particuliers (ovocytes de Libellula pulchella, KESSEL et BEAMS, 1969 ; spermatoctes d'Orconectes virilis, KESSEL, 1968_e). Dans les spermatoctes de Lycodontis afer, MATTEI et al. (1967) signalent qu'une telle association est postérieure à la différenciation des lamelles annelées.

De même dans les ovocytes de Néréidiens, nous n'avons pas observé la présence d'extrusions nucléaires en relation avec les lamelles annelées éloignées de l'enveloppe nucléaire.

c) Les lamelles annelées disséminées dans le cytoplasme pourraient résulter, comme l'ont envisagé SWIFT (1956) et MERRIAM (1959) d'une migration d'éléments annulaires situés initialement dans la zone péri-nucléaire. Un tel processus est plausible dans le cas où les lamelles annelées forment à ce niveau des empilements considérables (ovocytes en culture organotypique) mais dans les ovocytes ayant évolué "in vivo", la région péri-nucléaire ne comporte tout au plus que 3 ou 4 formations lamellaires et nous avons constaté d'autre part, que dans ces ovocytes l'assemblage des citernes ergastoplasmiques précède l'apparition des lamelles annelées.

Le fait que, comme chez N. diversicolor, de nombreux travaux (KESSEL, 1964^b, 1965, 1968_e; FRASCA et al., 1967) aient mentionné l'apparition des lamelles annelées à proximité du noyau nous a conduit à envisager une autre hypothèse. Des fragments de lamelles annelées, détachées de la zone péri-nucléaire, pourraient venir s'accoler aux citernes de l'ergastoplasme. Le matériel des pores de ces fragments de lamelles annelées pourraient alors induire les éléments contigus du réticulum à se différencier à leur tour en structures annulaires ; cette induction se propagerait ensuite de citernes en citernes, ce qui expliquerait les alignements caractéristiques des pores des lamelles annelées.

D'autre part, la distribution irrégulière des pores, constatée dans certaines lamelles annelées cytoplasmiques pourrait s'expliquer par la structure

de la lamelle inductrice. Celle-ci pourrait être très courte et n'exercer qu'une action localisée. En outre, la répartition des pores est assez inégale au niveau des lamelles péri-nucléaires les plus éloignées du noyau ; or ce sont ces éléments, qui par leur situation, sont susceptibles de migrer en premier lieu dans le cytoplasme.

Une telle hypothèse cadre assez bien avec l'évolution des processus cytologiques observés dans notre matériel. Elle n'a cependant aucunement la prétention d'avoir une portée générale en ce qui concerne les modalités d'élaboration des lamelles annelées ; celles-ci paraissant varier considérablement selon les types cellulaires envisagés.

3 - Signification physiologique de l'accroissement du réticulum et de l'existence des lamelles annelées cytoplasmiques

Les ovocytes de N. pelagica et N. diversicolor soustraits à l'action de l'hormone cérébrale subissent un accroissement de taille très rapide, ce qui implique vraisemblablement une accélération des processus métaboliques durant cette période. Dans ces ovocytes, le développement précoce et considérable des formations de réticulum est vraisemblablement lié à l'augmentation des synthèses protéiques mises en évidence par incorporation de leucine ³H. Il est en effet classiquement admis que la synthèse des protéines est plus rapide au niveau des ribosomes attachés aux membranes qu'à celui des ribosomes libres (SIEKEVITCZ et PALADE, 1960).

L'hyper-développement des éléments du réticulum est suivi de leur différenciation en lamelles annelées. La relation morphologique entre ces deux éléments a été signalée par de nombreux auteurs (REBHUN, 1961 ; CHAMBERS et WIESER, 1964 ; KESSEL, 1965, 1966b ; KESSEL et BEAMS, 1969 ; FRASCA et al., 1967 ; BEAULATON, 1968 a).

Les lamelles annelées cytoplasmiques, d'autre part, ont été observées le plus souvent dans des cellules métaboliquement très actives, comme les gonocytes jeunes, ou présentant un métabolisme particulier : cellules soumises à l'action d'inhibiteurs métaboliques (HRUBAN et al., 1965), cellules tumorales (CHAMBERS et WIESER, 1964), cellules en dégénérescence (BAKER et FRANCHI, 1967).

Dans les ovocytes en expérimentation, les rôles respectifs du déséquilibre hormonal d'une part, les répercussions de ce facteur sur le métabolisme d'autre part, sont difficiles à préciser en ce qui concerne

l'élaboration des lamelles annelées.

L'action des substances hormonales (notamment des oestrogènes) a, en effet, été démontrée au niveau des lamelles annelées (ANCLA et DE BRUX, 1965 ; HERTIG et ADAMS, 1967) ; toutefois le mode d'action de ces substances au niveau cellulaire reste inconnu.

Chez les Néréidiens, il est indéniable par contre que le développement du réticulum et des lamelles annelées est étroitement associé aux conditions métaboliques auxquelles les ovocytes sont soumis. Ceux ayant évolué à basse température ne présentent qu'un développement restreint des formations membranaires, par contre celui-ci est plus important dans les ovocytes ayant évolué à 20° C ; il atteint son maximum de complexité en culture organotypique.

Le rôle de la température sur la morphologie cellulaire a, par ailleurs, été clairement démontré par MERKOW et LEIGHTON (1965) dans les cellules myocardiques d'embryons de poulet. Ces cellules, cultivées à une température inférieure à la normale, s'hypertrophient. Selon ces auteurs, l'élévation du métabolisme corrélative de ces conditions de culture se traduit par une augmentation du taux de protéines et de glycogène et un accroissement du nombre de lamelles annelées. MERKOW et LEIGHTON considèrent que les lamelles annelées pourraient constituer une indication morphologique de synthèses anormales de protéines.

Ce rôle éventuel des lamelles annelées dans la synthèse des protéines doit toutefois être discuté. Aucune évidence biochimique ou autoradiographique n'a, en effet, été apportée à ce sujet (KESSEL, 1968e). D'autre part, chez les Néréidiens, les lamelles annelées apparaissent tardivement au cours de l'évolution ovocytaire, à un stade où les synthèses cellulaires sont très ralenties. Il est vraisemblable (tout au moins en ce qui concerne notre matériel) que les lamelles annelées ne jouent pas de rôle actif dans les processus de synthèse. Les lamelles annelées représenteraient plutôt une forme de dégradation des citernes ergastoplasmiques, consécutive à la phase d'hyper-activité fonctionnelle de ces éléments. BEAULATON (1968a) considère de même les lamelles annelées comme une étape de la dégénérescence des citernes ergastoplasmiques.

Quelle serait alors la signification physiologique de telles formations ? SWIFT (1956), KESSEL (1968e), se fondant sur le fait que les lamelles annelées présentent une structure comparable à celle de l'enveloppe nucléaire, admettent qu'elles pourraient être porteuses d'informations nucléaires. Elles représenteraient, en quelque sorte, l'agent ou le messenger du noyau, suppléant celui-ci dans le cas de cellules présentant un développement extrême du

cytoplasme. Toutefois pour qu'une telle hypothèse soit plausible il faudrait démontrer la présence d'éléments géniques au niveau des pores annulaires, ce qui paraît peu probable. Il est plus sage actuellement d'avouer notre ignorance en ce qui concerne le rôle physiologique des lamelles annelées.

CONCLUSION

- L'évolution des ovocytes de Néréidiens en l'absence d'hormone s'accompagne d'un développement considérable des éléments du réticulum.

- Chez N. diversicolor, ce développement est fonction des conditions métaboliques auxquelles sont soumis les ovocytes. Il est d'autant plus important que la température est élevée (20° C in vitro ou in vivo) et que la croissance ovocytaire se trouve accélérée.

- L'examen d'ovocytes de N. diversicolor fixés à différents temps d'évolution a permis de montrer que l'apparition des lamelles annelées cytoplasmiques est postérieure à celle des citernes ergastoplasmiques. Dans la zone proche du noyau, les lames de réticulum s'orientent progressivement selon une disposition parallèle à l'enveloppe nucléaire ; on constate ensuite au niveau de ces éléments l'apparition de pores annulaires situés face à ceux de la paroi du noyau.

Cette disposition suggère, ainsi que l'ont envisagé récemment KESSEL et BEAMS (1969) qu'un matériel d'origine nucléaire pourrait induire la différenciation des structures annulaires.

- Le matériel situé au niveau des pores annulaires des lamelles cytoplasmiques présente une forte basophilie. La digestion par la pepsine, après inclusion au GMA indique en outre que ce matériel possède une teneur élevée en protéines, vraisemblablement à caractère acide.

- La chute du métabolisme ovocytaire lors de l'apparition des lamelles annelées semble indiquer que ces éléments ne joueraient pas de rôle dans les processus de synthèse, mais représenteraient plutôt une forme de dégradation ou de dégénérescence de l'ergastoplasme.

CHAPITRE XIV

L'APPAREIL DE GOLGI ET LES INCLUSIONS CYTOPLASMIQUES

L'étude de l'ovogenèse naturelle a montré que l'élaboration du vitellus et des organites corticaux résultait d'un processus sécrétoire de l'appareil de Golgi. Nous associerons par conséquent ces divers éléments dans notre examen de l'évolution ovocytaire en l'absence d'hormone.

I. L'APPAREIL DE GOLGI

Chez N. pelagica, l'appareil de Golgi subit, comme au cours de l'évolution naturelle des modifications morphologiques en rapport avec l'apparition des lobules mucopolysaccharidiques (Pl. 70, fig. a). La taille des dictyosomes s'accroît ; de 2,5 μ environ, elle atteint un maximum de 4 μ . Les saccules de la face distale acquièrent un aspect dilaté et libèrent par un processus de fragmentation des vacuoles golgiennes dans le cytoplasme (Pl. 70, fig. b).

Chez N. diversicolor, après une dizaine de jours d'évolution "in vivo" (15° C) en l'absence d'hormone, on observe à la face distale des dictyosomes, la présence de vacuoles renfermant un matériel dense de structure granulaire. Ce type de sécrétion est comparable à celui observé au niveau des dictyosomes spécialisés dans l'élaboration des granules corticaux lors de la maturation naturelle.

Très rapidement chez N. diversicolor (15 jours en moyenne, "in vivo" à 15 ° C), un peu plus tardivement chez N. pelagica (20 à 25 jours), les dictyosomes présentent des signes d'involution. Les saccules se vacuolisent et acquièrent un aspect dilaté. Ils se replient parfois sur eux mêmes et forment alors des structures annulaires concentriques, analogues à celles observées au cours des derniers stades de la maturation naturelle. Les corps golgiens en dégénérescence sont entourés par des vésicules de faible densité d'un diamètre d'environ 800 A°. Ces vésicules sont le plus souvent libres dans le cytoplasme mais on observe parfois leur association en corps multivésiculaires.

La mise en évidence des phosphatases acides, par la méthode de Gomori, montre, dans les dictyosomes en dégénérescence, la présence d'enzymes lytiques, à la fois au niveau des saccules golgiens et des amas de vésicules proches de ces derniers (Pl. 73, fig. g).

II. LES LOBULES DE VITELLUS PROTEIQUE

1 - N. diversicolor

Les lobules protéiques des ovocytes de N. diversicolor (évolution "in vivo" à 15° C) sont caractérisés par leur forme arrondie et un contenu homogène de densité très élevée. Les lobules sont entourés par une membrane lisse appliquée étroitement contre la matrice protéique. On ne décèle jamais dans leur zone corticale la présence de vésicules incomplètement fusionnées comme dans le cas des lobules de vitellus protéique en croissance.

Certains ovocytes très jeunes, de 30 à 35 μ de diamètre (stade d'apparition du vitellus) montrent, après 15 jours d'évolution sans hormone, la présence de lobules vitellins extrêmement volumineux (Pl. 71, fig. c) aux contours lobulés.

Le contenu de ces lobules est constitué d'une accumulation de vésicules et de saccules de petite taille. Il est à noter que l'appareil de Golgi de ces très jeunes ovocytes ne montre aucun signe de dégénérescence, contrairement à ce que l'on observe dans les ovocytes voisins de taille supérieure.

Les lobules de vitellus protéique des ovocytes ayant subi une croissance accélérée à 20° C ("in vivo" ou "in vitro") renferment fréquemment des enclaves cytoplasmiques de nature variée : fragments de hyaloplasme, mitochondries en dégénérescence et parfois lobules lipidiques ou protéiques de petite taille (Pl. 71, fig. b). La micrographie de la Pl. 71, fig. a illustre le processus de capture par lequel certains lobules vitellins acquièrent cette structure complexe.

2 - N. pelagica

Une morphologie comparable est parfois observée au niveau de certains lobules du vitellus protéique des ovocytes de N. pelagica. Ces lobules d'une densité électronique peu élevée, renferment de nombreuses vésicules de même densité que la matrice et parfois de corps multivésiculaires (Pl. 72, fig. a) On observe également, dans la zone corticale de ces lobules, des formations lamellaires à structure concentrique dont la morphologie rappelle celle des corps golgiens en involution. (Pl. 72, fig. b).

III. LIPIDES ET GLYCOGENE

1 - Lipides

Au cours de l'évolution expérimentale, les lobules lipidiques augmentent de volume, en particulier par suite de la fusion d'éléments

préalablement disséminés dans le cytoplasme. Dans les ovocytes de N. diversicolor, les lobules lipidiques de taille moyenne (environ 1 à 2 μ) apparaissent parfois entourés par des citernes de réticulum endoplasmique étroitement appliquées contre leur surface. Cet aspect est semblable à celui décrit par KESSEL (1968 a) dans les ovocytes d'Ophioderma panamensis ; selon cet auteur, il pourrait être l'indice éventuel d'une biosynthèse des lipides.

2 - Glycogène

Comme au cours de l'ovogenèse naturelle, le glycogène apparaît dans les ovocytes de N. diversicolor quand ceux-ci ont atteint une taille variant entre 120 et 150 μ (Pl. 66, fig. b). Localisé en majeure partie dans la zone périnucléaire, il est constitué essentiellement d'éléments particuliers (forme β) disséminés entre les ribosomes libres.

Dans les ovocytes de N. pelagica, nous avons constaté dans le cytoplasme des ovocytes ayant subi une évolution expérimentale d'une vingtaine de jours, l'apparition de nombreuses granulations, d'un diamètre légèrement supérieur à celui des ribosomes et très denses aux électrons. La détection des polysaccharides par la technique de la thiocarbohydrazide-protéinate d'argent (THIERY, 1967) a permis de confirmer la nature glycogénique de ces éléments (Pl. 70, fig. b). Cette réaction, par contre, est constamment négative au cours de l'ovogenèse naturelle. Chez N. pelagica l'apparition du glycogène cytoplasmique apparaît donc liée aux conditions an hormonales ; elle pourrait être une conséquence des processus accélérés de la croissance cellulaire.

IV. LES FORMATIONS CORTICALES (ALVEOLES ET GRANULES CORTICAUX)

1 - N. pelagica

L'étude effectuée en microscopie photonique nous a montré qu'en absence d'hormone, les ovocytes de N. pelagica élaborent des mucopolysaccharides acides qui se répartissent en une couche corticale. L'épaisseur de cette dernière toutefois est inférieure à la normale dans le cas d'ovocytes mesurant au départ moins de 70 μ de diamètre.

Les observations effectuées en microscopie électronique révèlent l'aspect irrégulier du contour des alvéoles ; le contenu de ces dernières, par suite d'interruptions de la membrane paraît souvent en relation avec le cytoplasme environnant (Pl. 70, fig. a). Dans les jeunes ovocytes, les lobules sont localisés uniquement, lors de leur apparition, dans la zone ovocytaire corticale. Ils restent séparés les uns des autres par de larges travées cytoplasmiques, ce qui confère à la gangue une structure hétérogène.

2 - N. diversicolor

Dans les ovocytes de N. diversicolor en expérimentation, on constate l'apparition de granules et d'alvéoles corticaux (Pl. 66, fig. a et Pl. 71, fig. b) dans un pourcentage nettement inférieur (5 à 6 fois moins) que celui enregistré au cours de l'ovogenèse naturelle. Les granules sont caractérisés par une densité plus faible que la normale ; leur structure paraît simplifiée : elle se résume parfois à des travées de matériel dense réunies par l'intermédiaire de minces filaments.

Moins nombreux encore que les granules, les alvéoles restent épars dans le cytoplasme cortical ; leur taille ne dépasse guère $0,4 \mu$ (Pl. 71, fig. b) (taille moyenne normale $0,6 \mu$). Ces formations toutefois sont relativement abondantes dans certains ovocytes ayant évolué en condition expérimentale. Dans ce cas, les granules corticaux sont très rares, voir absents. Un balancement semble donc s'opérer dans la répartition de ces deux catégories d'organites corticaux.

V. LES FORMATIONS LYSOSOMIALES

Au cours de l'ovogenèse expérimentale, on constate, particulièrement dans le cas des ovocytes ayant subi une croissance rapide à 20°C ("in vitro" ou "in vivo"), l'apparition de formations dont la structure évoque celle des lysosomes. D'une façon peut-être arbitraire, ces organites peuvent être répartis en plusieurs catégories distinctes :

- corps multivésiculaires de forme sub-sphérique ($0,6 \mu$ de diamètre), limités par une membrane plissée. Ils renferment des vésicules parfois aplaties, de faible densité.

- corps denses, dont le contenu homogène est séparé de la paroi par une mince zone de faible densité électronique (leur diamètre varie entre $0,3$ et $0,9 \mu$) (Pl. 73, fig. c).

- corps denses complexes, d'une taille pouvant atteindre environ $1,4 \mu$. On remarque à l'intérieur de leur matrice de densité élevée, l'existence de vacuoles, de granules denses (d'une morphologie rappelant les particules β de glycogène) et enfin de membranes parfois enroulées en formation myéliniques. (Pl. 73, fig. c).

L'éventualité d'une filiation entre ces divers organites cellulaires est possible ; elle n'a pu cependant être démontrée d'une façon certaine.

La mise en évidence des phosphatases acides par la technique de Gomori donne une réaction positive au niveau des corps multivésiculaires (Pl. 73, fig. d et e) et des corps denses de structure complexe. Il s'avère

donc que ces formations s'apparentent à des lysosomes ou à des cytolysosomes.

VI. L'ENVELOPPE OVOCYTAIRE

Pendant les quinze premiers jours d'évolution, sa structure ne présente pas de variations sensibles par rapport à celle des ovocytes témoins. Vers le vingtième jour, le diamètre des villosités augmente progressivement ; le contenu de ces dernières devient identique à celui du cytoplasme cortical (présence de ribosomes et de glycogène particulaire) (Pl. 70, fig. b). Des villosités d'une morphologie analogue à celle des ovocytes matures normaux (présence d'épaisses fibrilles) ont été observées dans les ovocytes ayant subi une évolution expérimentale prolongée (Pl. 73, fig. a et b). Toutefois dans les ovocytes de faible diamètre initial, on constate des irrégularités dans la répartition et l'évolution des villosités ; de même la structure alvéolaire du chorion reste parfois assez mal définie. Le chorion présente en outre, dans certains cas des décollements par rapport à la membrane plasmique.

VII. DISCUSSION

1 - Evolution de l'appareil de Golgi

Au cours de l'ovogenèse naturelle, l'appareil de Golgi est orienté dans un premier temps dans la synthèse des protéines du vitellus, puis, à l'approche de la maturité sexuelle, il subit de profonds remaniements en rapport avec l'élaboration des alvéoles mucopolysaccharidiques et des granules corticaux. Cette transformation est toutefois progressive. Lors de l'élaboration des mucopolysaccharides, quelques lobules vitellins continuent à se former à proximité des dictyosomes comme en témoigne l'incorporation d'acides aminés marqués.

En l'absence d'hormone cérébrale, l'appareil de Golgi montre une évolution comparable de sa spécialisation fonctionnelle. Peu de temps après l'opération, les dictyosomes de N. pelagica et de P. cultrifera (au-dessus de 140 μ) acquièrent l'aspect morphologique typique de la phase d'élaboration des mucopolysaccharides (dilatation et fragmentation des saccules golgiens). De même ceux de N. diversicolor montrent, à leur face distale, la présence d'un matériel granulaire en rapport avec l'élaboration des granules corticaux.

Il semble que, contrairement au cas de l'ovogenèse naturelle, cette évolution fonctionnelle soit extrêmement brutale, car d'une façon précoce, l'incorporation des acides aminés est stoppée au niveau des lobules vitellins. A la suite de cette transformation, l'appareil de Golgi se trouve engagé dans une phase de synthèses accélérées de matériel glucidique

(mucopolysaccharides en particulier) ; la gangue corticale de N. pelagica est formée en 30 jours environ au lieu de 3 ou 4 mois dans les conditions naturelles. Cette période d'activité est limitée par la dégénérescence des dictyosomes, qui survient précocement chez N. diversicolor, plus tardivement dans les deux autres espèces.

Ce cycle raccourci explique, semble-t-il, les modifications structurales observées au niveau des organites corticaux, de même que le développement restreint de ces formations dans le cas de N. diversicolor. Cette accélération du métabolisme est peut-être également une cause de l'apparition du glycogène dans le cytoplasme des ovocytes de N. pelagica en expérimentation.

En conclusion il semble donc que l'évolution golgienne soit liée à une variation du taux de substances hormonales. Dans certains cas, si le déséquilibre hormonal est trop brutal (ovocytes de P. cultrifera d'une taille inférieure à 140 μ) cette évolution ne peut s'effectuer ; elle nécessite, pour son accomplissement, la persistance d'une faible concentration hormonale. (PORCHET, 1969). Nous ne pouvons préciser actuellement si l'action hormonale s'exerce directement au niveau de l'appareil de Golgi, ou, plus vraisemblablement, par l'intermédiaire de réactions complexes impliquant une modification des informations nucléaires.

2 - Le vitellus

Dans la plupart des ovocytes ayant évolué en l'absence d'hormone, l'aspect morphologique des lobules de vitellus protéique (matrice homogène, membrane lisse) semble indiquer que la croissance de ces éléments est terminée. Ces critères sont en accord avec nos résultats autoradiographiques et nos connaissances sur l'évolution fonctionnelle de l'appareil de Golgi.

Les lobules vitellins des ovocytes ayant subi une évolution prolongée (ovocytes de N. pelagica après 40 jours d'évolution, ovocytes de N. diversicolor après un séjour de 20 jours à 20° C, "in vivo" ou "in vitro") présentent un développement particulier. Leur contenu renferme fréquemment des inclusions cytoplasmiques de nature diverse. On y observe en outre, dans le cas de N. pelagica, la présence de nombreuses vésicules, de corps multivésiculaires et de formations membranaires. On peut se demander quelle est la signification d'une telle structure. Lors de la maturation des ovocytes de Barnea, PASTEELS et de HARVEN (1963) constatent dans les lobules vitellins, l'apparition de vésicules qui se regroupent secondairement en corps multivésiculaires libres dans le cytoplasme. L'apparition d'une activité enzymatique

(phosphatase acide) dans certaines zones des lobules vitellins constituerait le prélude à la vésiculation (PASTEELS, 1966 a, 1969 b). Selon cet auteur : "la transformation de la plaquette vitelline peut ainsi être considérée comme une digestion, prélude de son utilisation par l'embryon". En est-il de même dans les ovocytes de Néréidiens en expérimentation ? On s'explique mal, dans le cadre d'une telle hypothèse, la présence de formations apparemment d'origine cytoplasmique au sein du vitellus. Ces inclusions résultent plus vraisemblablement d'une sorte d'activité phagocytaire exercée par les lobules protéiques. Ce comportement anormal, et dont nous n'avons pas trouvé l'équivalence dans les nombreuses études consacrées aux processus de vitellogenèse, pourrait correspondre à une forme de dégénérescence du vitellus. Il est en effet très rare dans les conditions naturelles et ne survient, en milieu an hormonal, qu'en fin d'évolution.

3 - Les formations lysosomiales

Dans les ovocytes de N. diversicolor ayant subi une évolution prolongée en l'absence d'hormone, nous voyons apparaître diverses catégories d'éléments : corps multivésiculaires, corps denses de structure simple ou complexe. Une filiation entre ces divers organites est difficile à établir à partir de données statiques. Il semble cependant que les corps multivésiculaires et les corps denses à contenu homogène participent à l'élaboration des corps de structure complexe. La présence d'organites cytoplasmiques au sein de ces derniers éléments semble indiquer que ceux-ci seraient l'équivalent de cytolysomes, selon la définition de NOVIKOFF (1961) ou de vacuoles autolytiques selon celle de DE DUVE (1963). Selon les types cellulaires, deux modes de formation principaux sont à l'origine de ces éléments :

- isolement d'une fraction du cytoplasme par un processus d'enroulement du réticulum endoplasmique lisse (NOVIKOFF et SHIN, 1964) ou granulaire (BEAULATON, 1967).

- évolution d'une aire cytoplasmique incluse dans une vacuole golgienne (NOVIKOFF et ESSNER, 1962) ou résultant de l'encerclement par un saccule distal (FRANK et CHRISTENSEN, 1968).

Dans les ovocytes en expérimentation, ce dernier processus semble être à l'origine des cytolysomes comme en témoigne la micrographie de la Pl. 73, fig. f.

Les phosphatases acides, présentes au niveau des corps multivésiculaires et des corps denses, semblent être stockées initialement au niveau des saccules de l'appareil de Golgi (Pl. 73, fig. g) ; une telle localisation

des enzymes lytiques a été signalée dans divers types cellulaires (voir bibliographie dans HOURDRY, 1968). Ces substances seraient libérées par l'intermédiaire des vésicules golgiennes ou par suite d'une fragmentation des saccules du dictyosome.

Dans les ovocytes évoluant en l'absence d'hormone, la présence d'éléments de nature lysosomiale peut être liée, soit à des processus métaboliques particuliers, tels la mobilisation des lipides (NAPOLITANO, 1963), soit à une dégénérescence cytoplasmique localisée, prélude éventuel à une désorganisation cellulaire générale.

Il est intéressant de rapprocher nos observations de travaux, portant comme dans le cas des ovocytes en expérimentation sur des cellules spécialisés dans les synthèses de glycoprotéines ou de mucopolysaccharides.

Dans les glandes multifides d'Hélix pomatia cultivées "in vitro" lors de l'arrêt des sécrétions glandulaires E. HOLLANDE (1969) constate l'apparition de cytolysomes et d'hétérolysomes liées à un processus de réabsorption des glycoprotéines. PASTEELS (1969) dans les cellules mucipares de la branchie de Mytilus edulis, note l'élaboration par les dictyosomes de substances phosphatasiques acides, libérées sous forme de grains de sécrétion.

Il semble donc que les corps de Golgi spécialisés dans l'élaboration des polysaccharides complexes aient la possibilité de s'orienter, soit au cours de leur sécrétion, soit après l'arrêt de cette dernière, dans l'élaboration d'enzymes lytiques.

CONCLUSION

- Au cours de l'évolution en condition anormale, les dictyosomes des ovocytes de N. pelagica et P. cultifera acquièrent rapidement la morphologie observée normalement au cours de l'ovogenèse naturelle, à l'approche de la maturité sexuelle. Cette évolution de l'appareil de Golgi est liée à l'élaboration des alvéoles mucopolysaccharidiques très abondantes dans ces deux espèces.

Chez N. diversicolor, l'appareil de Golgi après avoir élaboré un nombre restreint de granules et d'alvéoles corticaux présente rapidement des signes d'involution.

- Les villosités de l'enveloppe ovocytaire ont une évolution structurale comparable à celle de l'ovogenèse naturelle.

- L'apparition de formations particulières de glycogène dans le cytoplasme des ovocytes de N. pelagica en expérimentation pourrait être une conséquence de l'exacerbation de métabolisme des polysaccharides.

- Dans les ovocytes ayant subi une évolution prolongée en l'absence d'hormone, les lobules de vitellus protéique sont caractérisés par la présence au sein de leur matrice d'inclusions de nature variée, d'origine hyaloplasmique. Cette particularité des lobules protéiques semble liée à un processus de dégénérescence de ces éléments.

- Les ovocytes de N. diversicolor en fin d'évolution renferment des lysosomes et des cytolysosomes. La présence de phosphatases acides est décelée dans ces éléments de même qu'au niveau des saccules des dictyosomes en dégénérescence.

L'appareil de Golgi pourrait intervenir de façon active dans l'élaboration de ces organites.

CHAPITRE XV

INFLUENCE DE L'HORMONE CEREBRALE SUR LES SYNTHESES D'ADN AU COURS DE LA GAMETOGENESE

INTRODUCTION

L'influence de la levée de l'inhibition hormonale au cours de l'ovogenèse vient d'être envisagée en détail dans les chapitres précédents. Nous avons vu que l'absence d'hormone détermine dans les ovocytes une évolution cytologique caractéristique et entraîne de profondes modifications du métabolisme d'ARN et des protéines.

Chez les mâles, les travaux de DURCHON (1952) ont montré que l'absence d'hormone cérébrale détermine le déclenchement de la spermatogenèse. Ces résultats ont été confirmés en culture organotypique (DURCHON et SCHALLER, 1963). Cette évolution, corrélative d'un accroissement de divisions cellulaires, semblait indiquer que l'hormone était susceptible d'avoir une action sur les synthèses d'ADN. Il importait donc de déterminer à quel stade de la spermatogenèse s'effectuent ces synthèses et de préciser leur importance en présence et en l'absence d'hormone.

Chez les femelles, la duplication de l'ADN lors de la prophase méiotique (chapitre III) survient à une période où le taux des substances hormonales est très élevé. Il nous a paru intéressant de rechercher dans ce cas l'influence de la levée de l'inhibition hormonale et d'établir à ce sujet une comparaison entre les deux processus de la gamétogenèse.

I - SPERMATOGENESE

A - EVOLUTION "IN VITRO"

1 - Matériel et techniques

Les explants évoluant en l'absence d'hormone (parapodes isolés) ou en présence de cette dernière (parapodes associés à un prostomium) sont cultivés sur le milieu mis au point par DURCHON et SCHALLER (1963) à la température constante de 20° C. La thymidine tritiée (thymidine ³H-6, 3 Ci/mM ; C.E.A.) ajoutée à la dose de 2 µCi par saillère a été employée comme précurseur spécifique de l'ADN (AMANO et al., 1959). Les fixations sont effectuées à des temps variables s'échelonnant entre 24 heures à 8 jours. Les coupes sont colorées par l'hématoxyline de Heidenhain, celles destinées à l'autoradiographie sont préalablement colorées par la technique de Feulgen.

2 - Evolution des spermatocytes en l'absence d'hormone (parapodes isolés)

a) Observations cytologiques

Au moment de la mise en culture, les parapodes isolés renferment des amas de spermatogonies quiescentes. Ces amas, d'une taille comprise entre 20 et 50 µ, groupent en moyenne une vingtaine de spermatogonies.

Après un temps de latence variant selon les individus de 36 heures à 3 jours survient la phase d'accroissement. La taille des noyaux spermatocytaires passe de 3,2 à 4,5 µ. Les chromosomes s'individualisent et leur disposition rappelle à ce moment celle d'une prophase mitotique (Pl. 74, fig. a). Ce stade, d'une durée approximative de 36 heures intéresse simultanément tous les spermatocytes d'un même flot.

Les premiers stades de la prophase de méiose (leptotène, zygotène, pachytène) durent une trentaine d'heures. Au moment de la diacynèse, on assiste à une dissociation des amas de spermatocytes qui sont libérés isolément dans le coelome (Pl. 74, fig. b). Les mitoses hétérotypiques et homéotypiques conduisent à la formation de tétrades de spermatides (Pl. 74, fig. c). Selon l'état génital au moment de la mise en culture, les spermatozoïdes sont formés au bout de 6 à 8 jours.

b) Résultats autoradiographiques

Quatre séries portant sur 80 cultures ont été effectuées. Dans les deux premières, les explants ont été placés initialement sur milieu marqué. Dans les deux autres, après une évolution préalable sur milieu non radioactif (milieu froid), les parapodes sont repiqués de 24 heures en 24 heures sur milieu tritié.

Les résultats sont schématisés dans la figure xv. Les cultures placées initialement sur milieu marqué montrent, après 24 heures d'évolution, une radioactivité assez faible au niveau des amas de spermatocytes quiescents. Après 48 heures, le marquage devient interne dans les flots quiescents ou en tout début de phase d'accroissement (Pl. 74, fig. d). Il est plus restreint au niveau des spermatocytes présentant déjà un accroissement marqué. Les éléments avaient vraisemblablement réalisé une partie de leur synthèse d'ADN avant la mise en culture. Dans le cas de spermatocytes ayant évolué initialement pendant 24 heures sur milieu froid, puis repiqués pendant le même temps sur milieu tritié, les éléments les plus radioactifs sont ceux qui gardent un aspect quiescent. Par contre, ceux qui ont entamé leur phase d'accroissement immédiatement après le repiquage ne sont que peu marqués (Pl. 74, fig. f).

La comparaison des différentes séries expérimentales permet de considérer que la synthèse d'ADN survient très tôt après la mise en culture en l'absence d'hormone. Elle précède la phase d'accroissement et se termine au début de cette dernière.

3 - Evolution des spermatocytes en présence d'hormone (association parapode - prostomium)

Dans le cas des cultures de parapodes associés initialement à un prostomium, la majorité des spermatogonies restent quiescentes. Toutefois, les cellules spermatogoniales de certains flots sont l'objet de divisions mitotiques. Au cours des dix jours de culture, la proportion de ces éléments en division reste très faible.

Sur milieu marqué, on observe après une durée de 4 à 5 jours, une faible incorporation commune à tous les amas spermatogoniaux en quiescence ; elle traduit une synthèse très lente d'ADN (Pl. 74, fig. e). Par contre, un marquage important des spermatogonies en division mitotique visualise l'incorporation de thymidine ^3H pendant la période précédant immédiatement la prophase.

805
LULF

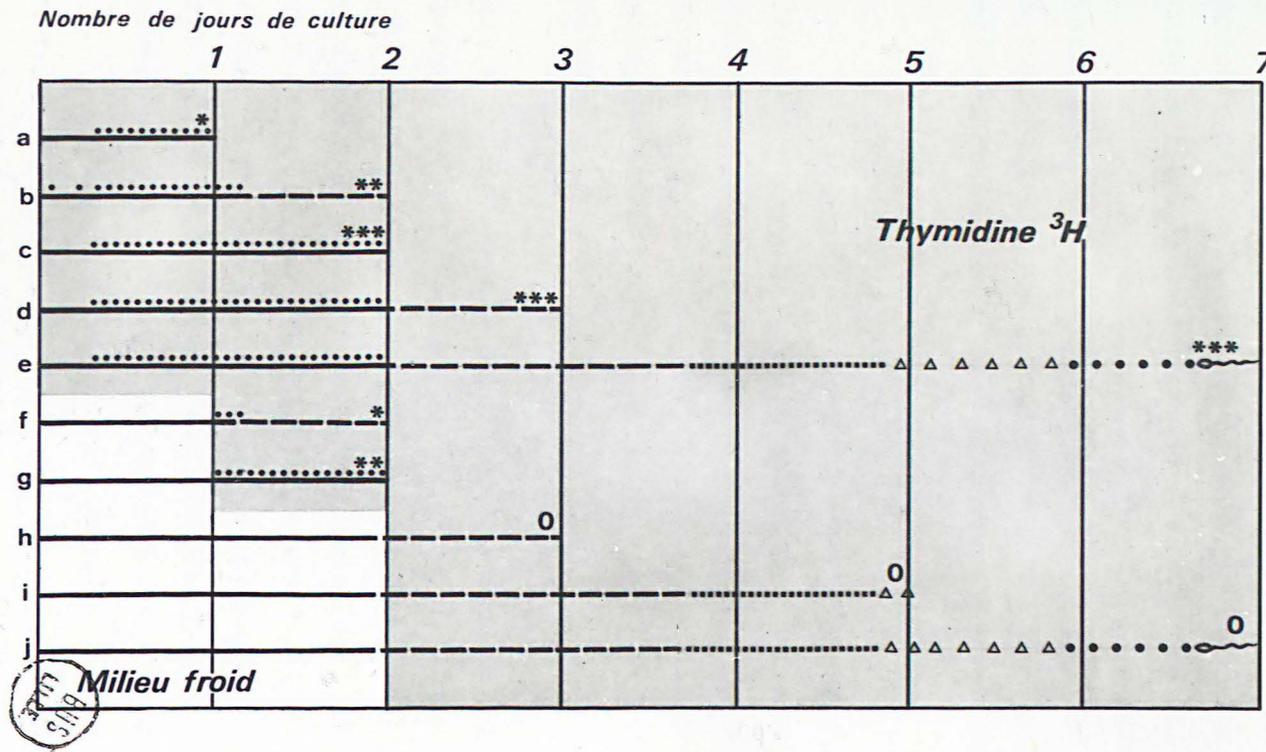
Figure XV - Evolution "in vitro" des spermatocytes en l'absence d'hormone cérébrale (parapodes isolés).

Diagramme montrant la localisation des synthèses d'ADN et la radioactivité des spermatocytes en fonction du temps de culture.

L'évolution initiale des séries f, g, h, i et j est effectuée sur milieu non radioactif ; le repiquage est intervenu le premier et le deuxième jour de culture.

Dans les séries p et f, les spermatocytes avaient entamé leur synthèse d'ADN lors de la mise en culture.

Fig. XV



- : phase de quiescence
- : synthèse d'ADN visualisé par incorporation de thymidine ³H
- : phase d'accroissement
- : prophase de méiose
- Δ Δ Δ : division hétéro et homéotypique
- • • • : spermiogenèse
- ~~~~~ : spermatozoïde

Intensité du marquage lors de la fixation:

- 0 nulle
- * faible
- ** moyenne
- *** maximum

4 - Incidence de la réintroduction du facteur hormonal sur le déroulement de la spermatogenèse

Deux types de culture ont été pratiqués simultanément sur la même souche de spermatogonies :

- Des parapodes isolés définitivement sont placés sur milieu marqué ; des fixations effectuées quotidiennement permettent de suivre l'évolution de la spermatogenèse et l'état corrélatif de l'incorporation.

- Des parapodes, primitivement isolés sur milieu froid, sont respectivement associés à un prostomium toutes les 12 heures après le début de la culture ; ils sont simultanément placés sur milieu marqué à la thymidine tritiée. Dans ce cas, les fixations sont réalisées après 14 jours de culture au total.

L'examen des spermatocytes définitivement soustraits à l'action de l'hormone montre que ces éléments sont parvenus en majorité à la phase d'accroissement après 3 jours de culture, ils présentent à ce moment leur incorporation maximum. Toutefois, un certain nombre d'flots gardent un aspect quiescent et ne parviennent à la phase d'accroissement qu'après 4 jours de culture.

Lorsque les éléments germinaux sont replacés sous influence hormonale au cours de leur évolution, on constate d'abord que l'inhibition de la spermatogenèse n'est obtenue que dans les associations parapode - prostomium effectuées pendant les 3 premiers jours de culture. Dans ce cas, les éléments quiescents au moment de l'introduction de l'hormone restent bloqués à ce stade. Ce résultat est valable en particulier pour les associations pratiquées pendant les premières 48 heures de culture. Après 15 jours d'évolution, la très faible radioactivité est comparable à celle observée dans une culture permanente en présence d'un cerveau (Fig. XVI d).

Si l'hormone est réintroduite au moment où la majorité des spermatocytes ont atteint la phase d'accroissement (3 jours), on observe 11 jours plus tard que les éléments germinaux sont essentiellement constitués par des spermatozoïdes indemnes de tout marquage (Pl. 74, fig. g et Fig. XVI c). Cependant il subsiste encore un certain nombre d'flots spermatocytaires présentant un marquage plus ou moins important. Certains sont encore à l'état quiescent, d'autres en début de phase d'accroissement.

Fig. XVI Influence de la réassociation d'un prostomium ou de l'actinomycine sur l'évolution des spermatoocytes (culture "in vitro").

- La phase initiale d'évolution s'effectue en l'absence d'hormone.
- Les parapodes des séries c, d et e évoluent primitivement sur milieu froid, puis sont reportés sur milieu tritié ; ils subissent simultanément une réassociation avec un prostomium.
- Les parapodes des séries f et g évoluent tout d'abord sur milieu froid, puis sont transplantés sur un milieu contenant de l'actinomycine D et de la thymidine ³H.

N.B. - Le cycle évolutif normal des spermatoocytes de cette série expérimentale est retardé d'environ 2 jours par rapport à celui représenté dans la figure XV.

Ces éléments doivent être considérés comme ayant été bloqués dans leur évolution ; la spermatogenèse est en effet complètement terminée au 8ème jour dans les parapodes témoins cultivés sur milieu marqué ou milieu froid.

L'inhibition hormonale peut donc intervenir au cours du déroulement de la spermatogenèse, mais uniquement avant la phase d'accroissement, c'est-à-dire avant que les synthèses d'ADN soient complètement effectuées.

5 - Action de l'actinomycine D

Trois séries de cultures portant sur un total de 90 explants ont été effectuées :

- La première comporte des parapodes isolés (témoins) évoluant sur milieu normal additionné de thymidine ^3H .

- La deuxième, des parapodes cultivés en présence d'actinomycine D (10 $\mu\text{g/ml}$) et de thymidine ^3H (2 $\mu\text{C/ml}$).

- Dans la troisième, des parapodes cultivés initialement sur milieu normal froid sont repiqués toutes les 24 heures sur le milieu contenant de l'actinomycine et de la thymidine ^3H .

Dans les parapodes isolés témoins, la plupart des spermatoocytes ont atteint leur phase d'accroissement vers le 3ème jour de culture ; les divisions hétérotypiques et homéotypiques sont effectuées vers le 7ème jour, enfin la spermiogenèse est achevée à la fin du 9ème jour.

Dans les parapodes ayant subi toute leur évolution en présence d'actinomycine D, les spermatoocytes restent bloqués au stade de la phase d'accroissement. Les chromosomes sont épanouis dans le nucléoplasme et présentent un aspect distendu. Un faible marquage est constaté au niveau de ces éléments.

Les noyaux de l'épiderme faiblement colorés par la technique de Feulgen présentent un aspect hypertrophié. L'incorporation de thymidine à leur niveau est beaucoup plus faible que la normale.

Dans la série où les parapodes sont repiqués sur le milieu actinomycine - thymidine, les spermatoocytes ayant subi initialement une évolution de 1 à 3 jours sur milieu normal restent bloqués, en présence d'actinomycine,

à l'état quiescent ou en phase d'accroissement (Fig. XVII f). Certains sont en prophase de méiose et présentent un marquage modéré.

Les spermatocytes ayant été transférés après le 3ème jour poursuivent leur évolution et donnent des spermatozoïdes non radioactifs (Fig. XVI g).

En résumé, les spermatocytes sont bloqués si leur culture s'effectue entièrement en présence d'actinomycine

(10 µg/ml)
- Cette dernière, à la dose employée, n'entraîne pas au niveau des cellules germinales un arrêt total des synthèses d'ADN mais semble les ralentir fortement. Ceci pourrait expliquer le blocage des spermatocytes à des stades cytologiques variés : quiescence ou phase d'accroissement.

- Dans les séries ayant subi un repiquage après la phase d'accroissement, la présence d'actinomycine, n'entrave pas les divisions hétérotypiques et homéotypiques. Les spermatozoïdes formés étant dépourvus de marquage, on peut en déduire que ces éléments avaient terminé leur synthèse d'ADN avant leur transfert.

B - EVOLUTION "IN VIVO" EN L'ABSENCE D'HORMONE. COMPARAISON AVEC LA SPERMATOGENESE NATURELLE.

1 - Evolution "in vivo"

Cette étude a porté à la fois sur N. pelagica et N. diversicolor. En l'absence d'hormone, l'évolution gamétogénétique s'effectuant sensiblement à la même vitesse chez les deux espèces étudiées, leur étude sera abordée conjointement.

- Matériel et techniques

L'expérimentation a porté chez N. pelagica sur un lot de quinze mâles récoltés en septembre (période de reproduction naturelle : février, mars). Chez N. diversicolor, où le nombre de mâles par rapport à celui des femelles est d'environ de 1 sur 7 (DALES, 1950), 12 individus seulement ont pu être utilisés. L'état quiescent de leurs spermatogonies a été contrôlé par examen préalable de ponctions coelomiques.

Dans chaque lot, des animaux sont respectivement décérébrés tous les 2 jours. L'évolution en condition anormonale varie donc selon les individus de 3 à 18 jours. Tous reçoivent en même temps, ainsi que les témoins, une injection de 25 µC de thymidine ³H. Ils sont sacrifiés après 24 heures d'incorporation.

- Résultats

Les spermatogonies des témoins présentent un marquage très faible mais généralisé. Quelques mitoses goniales sont observées.

Chez les animaux opérés, les observations, légèrement schématisées par suite des variations individuelles, sont les suivantes :

- Les spermatocytes, après 6 jours d'évolution, conservent un aspect quiescent mais leur marquage est important.

- Après 8 jours d'évolution, la majorité des flots de spermatocytes sont en phase d'accroissement. A l'intérieur d'un même massif, tous les éléments sont en général au même stade d'évolution. Sauf exception, ils ne présentent aucun marquage.

- Vers le 10ème jour, les spermatocytes sont en prophase de méiose : les stades zygotènes et diacinèses sont les plus fréquemment observés.

- Vers le 12ème jour, la plupart des gonocytes sont en cours de divisions hétérotypiques et homéotypiques. Les figures de métaphase et d'anaphase sont nombreuses. On observe également l'apparition de tétrades de spermatides.

- A partir du 14ème jour, les éléments germinaux sont constitués en majeure partie par des spermatozoïdes libres.

En l'absence d'hormone, l'évolution spermatocytaire "in vivo" est donc plus longue que celle s'effectuant "in vitro" (14 à 16 jours en moyenne au lieu de 6 à 8 en culture).

Ce décalage résulte surtout de l'allongement de la période de préprophase méiotique pendant laquelle s'effectuent les synthèses d'ADN. La phase d'accroissement n'apparaît qu'après 7 à 8 jours d'évolution. Par contre, la vitesse du déroulement des processus méiotiques proprement dit est sensiblement analogue à celle de l'évolution "in vitro". Comme dans ce cas, le cycle des divisions hétérotypiques et homéotypiques s'échelonne sur une période d'environ 48 heures.

2 - Spermatogenèse naturelle

La vitesse du déroulement des processus spermatogénétiques est difficile à évaluer avec précision pour plusieurs raisons :

- La période de reproduction naturelle s'étale sur une période assez longue, de l'ordre de plusieurs mois dans le cas de N. diversicolor

- Spermatogonies et spermatocytes quiescents sont libres dans le coelome et aucun caractère cytologique ne permet de les différencier.

- Si à l'intérieur d'un flot de spermatocytes, l'évolution des différentes cellules est généralement synchrone, des variations notables peuvent être constatées dans l'évolution cytologique des gonocytes d'un même individu.

Des nombreuses observations effectuées, il ressort cependant qu'un pourcentage élevé de spermatocytes en phase d'accroissement est constaté un mois environ avant la maturité sexuelle. Cette fréquence semble indiquer que ce stade serait particulièrement long et pourrait représenter l'équivalent d'une phase de repos dans l'évolution spermatocytaire. Par ailleurs, aucune différence cytologique n'a été constatée entre la spermatogenèse naturelle ou expérimentale. Rappelons à ce sujet que les spermatozoïdes issus d'une évolution "in vitro" en condition an hormonale se sont montrés aptes à la fécondation.

II - OVOGENESE

1 - Matériel et techniques

Cette étude a été réalisée "in vitro" sur de jeunes femelles de N. diversicolor renfermant uniquement des ovogonies et des ovocytes en prophase de méiose. Deux séries de manipulation ont été effectuées :

- Dans la première, les parapodes témoins (associés à un prostomium) et les parapodes isolés sont cultivés en présence de thymidine ^3H (3 Ci/mM) à la dose de 2 $\mu\text{C}/\text{ml}$. Des fixations quotidiennes sont échelonnées sur 15 jours.

- La deuxième manipulation comporte une évolution préalable des explants sur milieu froid pendant 6 jours. A ce moment les parapodes sont repiqués sur milieu tritié. Ils sont fixés après une évolution totale de 12 jours.

2 - Résultats

a) Culture initiale sur milieu marqué

Après 24 heures d'incorporation, la radioactivité est décelée, dans les parapodes isolés comme dans les parapodes associés à un prostomium, au niveau des ovogonies et des ovocytes au stade préleptotène.

Le stade zygotène apparaît marqué dans les deux cas après une période de culture de 3 jours. Jusqu'au 6ème jour environ, seules les cellules au stade préleptotène, leptotène et zygotène sont marquées. La radioactivité n'apparaît dans les ovocytes au stade pachytène que vers le 7ème jour (Pl. 74, fig. 1).

Par suite du nombre restreint des flots de gonocytes femelles dans les parapodes (un ou deux dans les cas favorables) il n'a pas été possible d'effectuer une analyse statistique comparative entre les ovocytes ayant évolué en l'absence d'hormone et les témoins. Il semble cependant que le nombre de cellules marquées soit sensiblement équivalent dans les deux cas.

b) Repiquage sur milieu radioactif après évolution
préalable sur milieu froid

Cette manipulation a été effectuée pour étudier l'évolution des synthèses d'ADN en condition an hormonale.

Après une évolution totale de 12 jours, le nombre de cellules marquées est assez restreint. Cependant on observe à la fois dans les parapodes associés et dans les parapodes isolés des ovocytes ayant réalisé leur synthèse d'ADN après 6 jours de culture ; un certain nombre sont parvenus au stade zygotène.

En conclusion, l'absence d'hormone cérébrale n'entrave pas le déroulement cytologique normal de la prophase de méiose. Les synthèses d'ADN s'effectuent au même stade et apparemment à la même vitesse qu'en présence d'hormone.

III- DISCUSSION

Les résultats de nos expériences permettent d'aboutir aux conclusions suivantes : la duplication de l'ADN lors de la méiose intervient, comme dans la plupart des espèces animales ou végétales durant l'interphase préméiotique. Chez les Nereis mâles, l'hormone cérébrale inhibe la spermatogenèse. Cette action s'exerce par un contrôle des synthèses d'ADN. Lorsque celles-ci sont achevées et que les spermatocytes parviennent en phase d'accroissement, l'hormone est sans effet sur le déroulement des divisions hétéro- et homéotypiques et sur celui de la spermiogenèse.

L'action de l'actinomycine D est comparable dans une certaine mesure à celle de l'hormone cérébrale. Cette action ne semble pas résulter d'un blocage des synthèses d'ARN ; on sait, en effet, que ces dernières se prolongent au cours de la prophase méiotique, bien après l'achèvement de la duplication de l'ADN (STERN et HOTTA, 1969).

En fait, dans le cas de parapodes isolés, cultivés initialement sur milieu actinomycine, le blocage de la spermatogenèse semble résulter d'un ralentissement des synthèses d'ADN. Cette action de l'actinomycine est particulièrement spectaculaire au niveau des cellules de l'épiderme dont le marquage, par la thymidine ^3H , régresse considérablement. L'inhibition de ces synthèses n'est cependant pas totale ; l'actinomycine ne bloquant les synthèses d'ADN qu'à des doses très élevées, dix fois plus fortes que celles qui agissent sur les synthèses d'ARN (HURWITZ et al., 1962). Ce fait pourrait expliquer la diversité des stades cytologiques auxquels parviennent les spermatoocytes cultivés sur ce milieu.

L'action de l'hormone cérébrale apparaît d'autre part beaucoup plus sélective que celle des inhibiteurs de synthèse d'ADN ; sa présence n'inhibe en effet chez le mâle qu'un type particulier de ces synthèses, elle ne bloque pas celles des mitoses que ce soit au niveau des cellules goniales ou des cellules somatiques. En ce qui concerne ces dernières, il ne semble pas exister "in vitro" de différences notables d'incorporation entre les cellules épidermiques des parapodes associés et des parapodes isolés. "In vivo", cependant l'absence d'hormone déclenche au niveau des cirres parapodiaux de N. pelagica, les divisions cellulaires corrélatives de l'évolution morphologique de ces formations à l'approche de l'épitoque (BOILLY-MARER, 1966).

Lors de la levée de l'inhibition hormonale, l'évolution des cellules germinales mâles peut se dissocier en deux séquences distinctes : d'une part, toutes les spermatogonies sont activées et réalisent leur synthèse d'ADN, d'autre part toutes vont s'engager dans la voie de la division méiotique et donc se transformer en spermatoocytes.

Ce mode d'action de l'hormone cérébrale nous conduit à envisager le déterminisme de l'orientation des divisions goniales ; en d'autres termes, à examiner les facteurs qui induisent une cellule ayant réalisé la duplication de son ADN à évoluer, soit dans le sens mitose (clivage des chromosomes en chromatides), soit dans le sens méiose (appariement des chromosomes homologues).

Les données de la biologie moléculaire sont, à ce sujet, extrêmement limitées. Certains auteurs ont envisagé l'existence éventuelle de gènes récessifs inhibiteurs de la méiose, dont l'action s'exercerait par un contrôle du rapport $\frac{RNA}{DNA}$ (SINHA, 1960 - étude du maïs homozygote). D'autres, tel ANSLEY (1957) invoquent les variations du rapport $\frac{DNA}{\text{histones}}$.

Des travaux plus récents envisagent un processus différent de ce déterminisme. Dans les anthères de Liliacés, STERN et HOTTA (1969) constatent qu'immédiatement après la synthèse préméiotique les cellules sont encore capables d'évoluer dans le sens d'une division mitotique. Cependant le stock d'ADN de ces cellules serait incomplet. Une nouvelle synthèse d'ADN de faible importance (0,5 % au total) surviendrait au stade zygotène. Pour STERN et HOTTA, cet ADN formé tardivement serait localisé au niveau de l'élément axial des chromosomes, élément responsable de la formation du complexe synaptonéma^{lique} et de l'appariement des chromosomes.

La détection de synthèses d'ADN de si faible importance est impossible par les techniques autoradiographiques usuelles. Il est cependant intéressant de rapprocher de ces données, les résultats obtenus sur notre matériel lors d'une expérience préliminaire au cours de laquelle une concentration plus élevée d'actinomycine avait été employée (20 µg/ml). De nombreux spermatocytes transplantés sur milieu actinomycine lors de la phase d'accroissement restaient bloqués en métaphase hétérotypique. A cette dose, l'actinomycine avait peut être inhibé les synthèses survenant en cours de prophase méiotique.

Chez la femelle, les synthèses d'ADN ovocytaires s'effectuent normalement chez des animaux jeunes, où la teneur en hormone cérébrale est très élevée. La levée de l'inhibition hormonale pouvait entraîner "à priori" soit un arrêt des synthèses d'ADN, soit leur accélération, ou encore induire toutes les ovogonies à entrer en prophase de méiose. Les résultats de l'expérimentation montrent qu'en l'absence d'hormone, les synthèses d'ADN s'effectuent au même stade et apparemment à la même vitesse que chez les témoins.

En définitive, le rôle de l'hormone cérébrale s'avère donc extrêmement complexe puisque son action est différente au niveau des cellules germinales des mâles et des femelles. Cette action sélective est difficile à expliquer. Certes on peut envisager une différence de structure moléculaire entre l'hormone cérébrale des mâles et des femelles. En fait une telle conception est peu vraisemblable, les prostomiums des femelles étant capables, en effet, d'inhiber la spermatogenèse. Il faudrait donc envisager que, selon

les sexes, les mécanismes enzymatiques intervenant dans la duplication de l'ADN puissent être différents.

CONCLUSION

L'étude autoradiographique effectuée "in vitro" montre que chez le mâle, la levée de l'inhibition hormonale entraîne toutes les cellules germinales à réaliser leur synthèse d'ADN. Ces cellules s'engagent alors dans une phase d'accroissement qui prélude à la prophase méiotique et aux divisions de maturation.

Par contre, dans le cas d'une association parapode-prostomium, les spermatogonies soumises à l'action hormonale sont le siège d'une incorporation lente et continue, corrélative des mitoses de multiplication goniale.

L'association de prostomiums à des parapodes, en cours de culture, montre que la réintroduction du facteur hormonal inhibe la spermatogenèse tant que les synthèses d'ADN ne sont pas achevées. Passé ce stade, l'hormone est sans effet sur le déroulement de la spermatogenèse.

L'action de l'actinomycine D sur des parapodes isolés est comparable dans une certaine mesure à celle de l'hormone cérébrale. Cette action ne résulterait pas d'un blocage des synthèses d'ARN, mais d'un ralentissement de la duplication de l'ADN.

Chez la femelle, les synthèses d'ADN et le déroulement de la prophase de méiose ne subissent pas de variation en l'absence d'hormone. Cette dernière d'autre part est sans action sur le taux des mitoses des cellules somatiques. La fonction de l'hormone cérébrale apparaît donc hautement spécifique ; elle exerce au niveau des cellules germinales mâles une double action : régulation des synthèses d'ADN et déterminisme des divisions méiotiques.

CHAPITRE XVI

INFLUENCE DE LA LEVÉE DE L'INHIBITION HORMONALE SUR L'ÉVOLUTION ÉLÉOCYTAIRE

Au cours de la gamétogenèse naturelle, les éléocytes de N. pelagica présentent de profonds remaniements morphologiques à l'approche de la maturité sexuelle. Lors de l'épitoque, un dimorphisme très net oppose les éléocytes des individus mâles et femelles ; ceux des Heteronereis femelles se caractérisent en particulier par la présence d'amas importants d'ergastoplasme.

La levée expérimentale de l'inhibition cérébrale entraîne de même une évolution rapide de la structure des éléocytes.

La technique d'expérimentation est la même que celle utilisée pour l'étude expérimentale "in vivo". Les vers sont sectionnés dans la région moyenne du corps. La partie postérieure évolue ainsi en l'absence d'hormones ; la partie antérieure sert de témoin.



I. OBSERVATIONS AU MICROSCOPE PROTOPLA-

15 jours environ après l'opération des femelles de N. pelagica, des modifications morphologiques spectaculaires sont observées au niveau des éléocytes en formation, accolés à la paroi des vaisseaux sanguins. Ces cellules présentent un nucléole extrêmement volumineux, très riche en ARN ; leur cytoplasme très basophile se caractérise par un aspect filamenteux.

Ces transformations s'observent également dans les éléocytes libres du coelome après une vingtaine de jours d'expérimentation. Ces cellules renferment dans leur cytoplasme de nombreux sarcoïytes. Elles présentent d'autre part une réaction intense à la technique du PAS. Le glycogène (contrôle par l'amylase salivaire) forme des flaques de grandes dimensions, d'une étendue et d'une coloration supérieure à celles observées dans les éléocytes des individus sub-épitoques normaux.

Les éléocytes de la région antérieure (témoin) n'apparaissent par contre que faiblement basophiles, le glycogène n'y présente qu'une réaction de moyenne intensité après coloration par le P.A.S.

Après 30 à 40 jours d'évolution, la basophilie cytoplasmique des éléocytes de la région postérieure persiste, mais elle a régressé par rapport au stade précédent. Le glycogène a pratiquement disparu, les vacuoles à inclusions puriques ont atteint par contre un développement considérable.

Chez les mâles, les réactions sont moins spectaculaires. Les formations basophiles restent discrètes et le taux de glycogène ne semble pas présenter de variations très importantes.

II. OBSERVATIONS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

La micrographie de la planche 75 résume en partie les transformations morphologiques subies par les éléocytes au cours de leur évolution en conditions an hormonales.

L'ergastoplasme présente un développement extrêmement important. Les citernes d'une longueur d'environ 8 à 10 μ sont empilées en des amas groupant parfois une vingtaine d'éléments. Ceux-ci sont fréquemment disposés à la périphérie du noyau mais comme le montre la micrographie de la planche 75, ils apparaissent parfois étroitement appliqués contre les parois de la vacuole à inclusions puriques. Cette dernière présente souvent à ce stade un aspect comprimé et aplati ce qui lui confère une forme étoilée.

La détection des polysaccharides par la thiocarbohydrazide-protéinate d'argent (THIERY, 1967) confirme les données de la microscopie optique en ce qui concerne l'abondance du glycogène dans ces éléocytes. Ce dernier se présente dans les zones d'accumulation sous forme de rosettes d'un diamètre variant entre 1500 et 2000 Å (Pl. 76, figs a et b). Cependant, on constate l'existence entre les citernes ergastoplasmiques de nombreuses particules polysaccharidiques de petite taille (Pl. 76, figs b et c). Ces dernières ont le plus souvent un diamètre d'environ 200 Å; certaines d'entre-elles cependant ont une dimension nettement inférieure (environ 90 à 100 Å).

Les sarcolytes sont extrêmement nombreux dans les éléocytes des individus ayant subi une épitoquie expérimentale. Leur évolution intracytoplasmique ne présente cependant pas de différences par rapport aux observations effectuées chez les individus sub-épitoques témoins.

Les granules protéiques sont à la fois plus rares et de taille plus restreinte qu'au cours de l'ovogenèse naturelle. Cette particularité est vraisemblablement liée à la libération précoce de leur matériel, corrélative de l'accélération des processus métaboliques et gamétogénétiques.

III. DISCUSSION

En l'absence d'hormone cérébrale, l'évolution des éléocytes est sensiblement comparable à celle observée au cours de l'ovogenèse naturelle. Cependant l'accumulation du glycogène dans ces cellules est particulièrement spectaculaire et retiendra notre attention. D'autre part, les éléocytes, à la lumière de cette expérience apparaissent étroitement soumis, de même que les ovocytes aux conditions hormonales.

1) Les modalités d'accumulation du glycogène.

La teneur élevée du glycogène dans les éléocytes en expérimentation relève d'observations cytochimiques effectuées à la fois en microscopie photonique et électronique.

Cette augmentation brutale des polysaccharides est surprenante puisqu'elle survient dans des tronçons de vers inanitiés. La question se pose par conséquent de savoir où se trouvent localisées initialement les substances mobilisées au niveau des éléocytes lors de la levée de l'inhibition hormonale. Nos connaissances à ce sujet sont assez fragmentaires. Nous ne savons pas en particulier dans quelle mesure le matériel des sarcolytes peut être réutilisé dans les synthèses éléocytaires. Par contre l'histolyse du tube digestif à ce stade est bien connue, or celui-ci renferme d'abondantes substances de réserves, particulièrement de nature lipidique (DALES, 1957). Il est possible que celles-ci puissent se trouver libérées à ce moment par un processus qui reste à déterminer par des méthodes biochimiques.

Au niveau cellulaire, les organites impliqués dans la synthèse du glycogène sont encore l'objet de discussions. Pour la majorité des auteurs (voir références bibliographiques dans VRENSSEN et KUYPER, 1969), le réticulum endoplasmique lisse serait responsable de la synthèse du glycogène et de sa dégradation. Il est possible également que ce dernier s'édifie au niveau de

particules déjà présentes (LELOIR, 1964 ; COIMBRA et LEBLOND, 1966). Pour VRENSSEN et KUYPER, par contre, l'élaboration du glycogène serait liée à la présence de ribosomes. Cette divergence des interprétations peut s'expliquer par le fait que les études consacrées à ce sujet ont porté, en quasi-totalité, sur des hépatocytes, cellules dans lesquelles les réticulums de nature granulaire et agranulaire sont étroitement intriqués. Il est difficile d'autre part, avec les techniques usuelles de microscopie électronique, de différencier avec certitude le glycogène particulaire des ribosomes.

La technique de détection des polysaccharides par la thiocarbohydrazide-protéinate d'argent (THIERY) lève toute ambiguïté à ce sujet. Dans les éléocytes, ^{myoblastes} entre les citernes ergastoplasmiques, de nombreuses particules d'environ 200 Å, taille des particules β et quelques particules d'une taille inférieure qui pourraient être l'équivalent de particules γ (terminologie de DROCHMANS, 1962) ou résulter d'un assemblage de ces dernières. Ces images rappellent étroitement celles observées par THIERY (1967) dans des hépatocytes après traitement par la thiocarbohydrazide. Cet auteur émet l'hypothèse que les particules de petite taille représentent peut-être les premières chaînes de polysaccharides, précurseurs des particules plus grosses de glycogène.

Ces observations semblent apporter un argument en faveur de l'hypothèse émise par VRENSSEN et KUYPER. Ceux-ci se basant sur les travaux biochimiques de STADHOUDERS (1965) considèrent que l'augmentation du taux du glycogène résulte "d'une néo-synthèse de glycogène-synthétases formées par l'intermédiaire de l'ARN messenger et ses ribosomes". Il est à noter également que dans les ovocytes de Néréidiens, de même que dans ceux de Batraciens (VAN GANSEN et SCHRAM, 1969) les particules de glycogène sont fréquemment associées aux ribosomes.

Tout en restant extrêmement prudent dans l'énoncé d'une hypothèse qui demande à être étayée par d'autres techniques (autoradiographiques en particulier), il n'en reste pas moins que les éléocytes constituent un excellent matériel pour l'étude de ce problème. Le déclenchement des synthèses de glycogène peut être effectué à volonté dans ces cellules ; ces dernières, d'autre part, ne présentent pas les difficultés d'interprétation inhérentes à l'intrication des réticulums lisses et granulaires.

2) Evolution des éléocytes en condition an hormonale

Comme les gamètes, les éléocytes apparaissent extrêmement sensibles aux variations du taux de substances hormonales. Des observations similaires ont été effectuées par SCHROEDER (1967b) qui constate, après décé- rébration, un accroissement du nucléole dans les éléocytes de N. grubei et signale que cette évolution peut être suivie "in vitro".

Nous avons signalé antérieurement (Chapitre IX) l'analogie structurale et métabolique qui existe entre les éléocytes et les cellules adipeuses des Insectes. Chez ces derniers, des modifications ultrastructurales ont été constatées lors de la métamorphose, notamment au niveau du noyau et dans l'ac- cumulation du glycogène (ISHIZAKI, 1965). D'autre part, les processus de syn- thèses sont régis, particulièrement en ce qui concerne les protéines, par l'hormone juvénile (LÜSCHER, 1968). L'absence de cette dernière entraîne une chute brutale du métabolisme et un blocage de la libération et du transfert des substances de réserves vers les ovocytes (BROOKES, 1969). Les sécrétions endocrines des corps allates s'exercent simultanément sur les cellules et sur les ovaires.

De même, chez les Néréidiens, l'inhibition cérébrale semble contrô- ler le synchronisme évolutif des ovocytes et des éléocytes.

CONCLUSION

En l'absence de l'hormone cérébrale, les éléocytes de N. pelagica présentent une évolution morphologique comparable à celle survenant au cours de l'ovogenèse naturelle.

Ces éléocytes sont caractérisés en particulier par un développement spectaculaire du nombre et de la dimension des citernes ergastoplasmiques. Ils présentent d'autre part un accroissement du taux de leur réserve de glycogène. A ce stade, de très petites particules de ce polysaccharide sont détectées, par la technique de la thiocarbohydrazide-protéinate d'argent, à proximité des ribosomes de l'ergastoplasme. Leur relation éventuelle avec cet organe est discutée.

CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE

La levée de l'inhibition hormonale se traduit (sauf pour les ovocytes de P. cultrifera, en période estivale) par une augmentation rapide de taille après une période de latence de 5 à 10 jours.

Sous l'angle cytologique, la réponse ovocytaire est variable selon les espèces et le degré d'évolution des cellules germinales.

- Les ovocytes de N. pelagica et de P. cultrifera atteignent, à partir d'une taille respective de 50 et de 140 μ , une morphologie analogue à celle des ovocytes matures normaux (ségrégation des éléments cytoplasmiques, élaboration d'une couche corticale de mucopolysaccharides).

- Les ovocytes de N. diversicolor et ceux de P. cultrifera d'une taille inférieure à 130 μ n'acquièrent pas, malgré l'augmentation de leur taille, les caractères cytologiques des ovocytes témoins d'une taille équivalente. Toutefois les jeunes ovocytes de P. cultrifera ont un comportement analogue à ceux d'un diamètre supérieur à 140 μ en présence d'un faible taux d'hormone (implantation de cerveaux de femelles sub-matures) (PORCHET, 1969). Ceux de N. diversicolor, par contre, ne parviennent jamais à un état de maturation comparable à celui qui survient dans les conditions naturelles. Après la différenciation d'une zone basophile péri-nucléaire, ces ovocytes finissent par dégénérer.

L'examen au microscope électronique montre qu'en l'absence d'hormone, l'évolution ovocytaire semble être le résultat d'une interaction entre plusieurs facteurs dont l'importance respective varie selon l'espèce considérée. Ces facteurs, d'une façon peut-être un peu schématique, peuvent être subdivisés en trois catégories, à savoir : les transformations cytologiques analogues à celles de l'ovogenèse naturelle, les conséquences de l'accélération des processus de croissance, les indices d'une dégénérescence cellulaire.

1 - Les modifications morphologiques et physiologiques analogues à celles survenant au cours de l'ovogenèse naturelle.

En dehors de l'évolution des villosités de la paroi ovocytaire, les modifications les plus caractéristiques concernent l'appareil de Golgi. En l'absence d'hormone, celui-ci acquiert rapidement la morphologie observée à l'approche de la maturité sexuelle dans les ovocytes ayant subi une évolution normale. La taille des dictyosomes augmente ; les saccules de la face distale présentent un aspect dilaté. Ils se fragmentent pour donner naissance à des vacuoles d'un contenu riche en mucopolysaccharides. Cette évolution de l'activité fonctionnelle de l'appareil de Golgi est particulièrement typique dans les ovocytes de N. pelagica et de P. cultrifera, espèces qui normalement élaborent une quantité importante de matériel mucopolysaccharidique. Par contre chez N. diversicolor, espèce où les inclusions cytoplasmiques sont constituées essentiellement de lobules de vitellus lipidique et protéique, l'appareil de Golgi, après avoir élaboré des granules et des alvéoles corticaux en nombre plus restreint qu'au cours de l'ovogenèse naturelle, entre rapidement en dégénérescence.

2 - Les répercussions morphologiques dues à l'accélération des processus de croissance.

En l'espace de 30 à 40 jours, le diamètre ovocytaire initial est multiplié, selon les espèces, par un coefficient variant entre 2 et 3,5. C'est ainsi que les ovocytes de N. pelagica subissent en un mois un accroissement de volume 30 fois plus important que dans les conditions normales. Cette croissance accélérée permet, semble-t-il, d'expliquer certaines particularités cytologiques (réduction de taille entre autres) constatées au niveau des organites corticaux élaborés à une cadence extrêmement rapide. De même le développement considérable des citernes ergastoplasmiques semble corrélatif de l'accélération des processus métaboliques liée à la croissance rapide des ovocytes.

Chez N. diversicolor, l'hypertrophie des formations ergastoplasmiques est particulièrement spectaculaire. Elle se traduit par l'apparition d'empilements de citernes groupant une trentaine d'éléments dont la taille atteint 10 μ environ. Cependant, chez cette espèce, cette évolution du cytoplasme semble liée à une déviation du métabolisme. En effet, 10 jours environ après la levée de l'inhibition hormonale, on constate l'arrêt des processus de vitellogenèse ;

l'incorporation d'acides aminés radioactifs n'est plus suivie de marquage au niveau des lobules vitellins. Tout se passe comme si la cellule déséquilibrée emmagasinait, non plus les substances de réserves (vitellus), mais les éléments chargés de l'édification de ces réserves (ribosomes, ergastoplasmes). Deux hypothèses peuvent être émises à ce sujet :

- la dégénérescence précoce de l'appareil de Golgi chez cette espèce entraîne la disparition d'un maillon indispensable à la chaîne des synthèses protéiques.

- l'absence d'hormone bloque la dissociation ARN ribosomal-protéines basiques, ce qui détermine progressivement une baisse des synthèses protéiques (chute de l'incorporation des acides aminés marqués) malgré l'accumulation spectaculaire des ribosomes.

En fait, il est vraisemblable que ces deux facteurs pourraient être liés et résulter d'un déséquilibre concernant à la fois le métabolisme du noyau et celui du cytoplasme.

Au cours de l'évolution ovocytaire en condition anormale, on constate d'autre part une prolifération des inclusions intra-nucléaires et des lamelles annelées cytoplasmiques. En ce qui concerne ces dernières, l'examen d'ovocytes de N. diversicolor fixés après des temps variés d'évolution en condition anormale a permis de montrer que l'apparition des lamelles annelées cytoplasmiques est postérieure à celle des citernes de l'ergastoplasme et résulte d'une différenciation de ces éléments. Dans le cas des citernes situées à proximité du noyau, les pores annulaires apparaissent face à ceux de l'enveloppe nucléaire. Cette disposition suggère, ainsi que l'ort envisagé récemment KESSEL et BEAMS (1969), qu'un matériel d'origine nucléaire pourrait induire la différenciation des structures annulaires. Ce matériel pourrait être de même origine que celui localisé dans les granules des inclusions intra-nucléaires. Dans les deux cas en effet, une digestion par la pepsine est constatée à ce niveau, de même qu'à celui de certaines granulations du nucléoplasme.

L'augmentation numérique et l'hypertrophie des inclusions nucléaires et des lamelles annelées cytoplasmiques semblent être une conséquence de la phase d'hyperfonctionnement subie par les ovocytes lors de leur croissance accélérée. Ces organites en effet ont été décrits le plus souvent dans des cellules très actives (gonocytes jeunes) ou présentant un déséquilibre résultant de causes virales, tumorales ou de conditions hormonales particulières.

3 - Les indices d'une dégénérescence cellulaire.

Ils sont discrets dans les ovocytes de N. pelagica ayant subi une croissance accélérée, beaucoup plus nets dans ceux de N. diversicolor. Dans ces ovocytes, on constate dans le cytoplasme, l'apparition d'un nombre élevé de lysosomes et de cytolysomes. La présence de phosphatases acides a été montrée non seulement au niveau de ces éléments, mais encore au niveau des saccules de l'appareil de Golgi. Il semble, comme cela a été signalé dans d'autres types cellulaires (NOVIKOFF et ESSNER, 1962 ; FRANK et CHRISTENSEN, 1968) que les cytolysomes puissent résulter de l'isolement d'une fraction du cytoplasme par un repli des saccules golgiens.

Dans les ovocytes de N. pelagica et de N. diversicolor en fin d'évolution, on constate en outre, dans certains lobules vitellins, la présence d'inclusions vésiculaires ou lamellaires qui semblent constituer des indices de dégénérescence.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Depuis quelques années, les recherches expérimentales ont permis de réaliser chez les Annélides des progrès considérables dans la connaissance de l'endocrinologie des Oligochètes (HERLANT-MEEWIS, 1959 ; SAUSSEY, 1966), des Hirudinées (HAGADORN, 1962, 1969 ; MALECHA, 1967 b, 1970) et des Polychètes Arenicolidae (HOWIE, 1963) et Syllinae (HAUENSCHILD, 1959 ; DURCHON, 1959 ; DURCHON et WISSOCQ, 1964).

Il est démontré que chez les Néréidiens l'hormone cérébrale joue un rôle inhibiteur à la fois en ce qui concerne les processus de la sexualité et les transformations morphologiques liées à l'épitoque (DURCHON, 1952).

Jusqu'à présent cependant, aucune étude expérimentale n'avait été suivie d'études cytologiques précises, relatives à l'influence des sécrétions endocrines sur l'évolution de la gamétogenèse. En fait, l'évolution des cellules germinales des Néréidiens restait mal connue, même à l'échelle de la microscopie optique. La complexité du développement ovocytaire en particulier nécessitait une étude approfondie, de façon à permettre une comparaison efficace entre l'évolution naturelle des gamètes femelles et les modifications corrélatives de la levée de l'inhibition cérébrale. Le but poursuivi dans cette étude était d'arriver, si possible, à déterminer au niveau cellulaire, le mode de contrôle de l'hormone inhibitrice sur les processus de gamétogenèse.

I. EVOLUTION CYTOLOGIQUE ET FONCTIONNELLE DU CYTOPLASME OVOCYTAIRE

La longue période pendant laquelle s'effectue la croissance du cytoplasme (1 an chez N. pelagica et N. diversicolor, 2 ans chez P. cultrifera) peut être décomposée en deux étapes principales : élaboration du vitellus protéique, développement des organites corticaux riches en mucopolysaccharides. Après un bref rappel des processus par lesquels sont élaborés successivement les formations protéiques puis mucopolysaccharidiques, nous envisagerons les répercussions cytologiques et métaboliques entraînées par la chute rapide du taux d'hormone cérébrale.

Le mode de délaboration des protéines du vitellus est comparable à celui des sécrétions protéiques des cellules exocrines (CARO et PALADE, 1964 ; DROZ 1966 a ; JAMIESON et PALADE, 1967 a et b).

L'incorporation de leucine ^3H , visualisée en autoradiographie à haute résolution, nous a permis de montrer que les protéines sont synthétisées initialement au niveau des ribosomes de la zone corticale du cytoplasme. Ces protéines sont ensuite remaniées et condensées au niveau des dictyosomes. Les vésicules élaborées par les saccules golgiens représentent le support morphologique par lequel les protéines précurseurs du vitellus sont ensuite acheminées vers les lobules vitellins en croissance.

La levée de l'inhibition hormonale (ablation du prostomium) entraîne très rapidement l'arrêt de la croissance des éléments vitellins (10 jours environ). Cet arrêt pourrait être précédé chez N. pelagica et dans les très jeunes ovocytes de N. diversicolor d'une courte phase d'hyper-accumulation de vitellus. Après ce stade, l'incorporation d'acides aminés radioactifs n'est plus suivie d'aucun marquage au niveau des lobules protéiques.

Le blocage de la vitellogenèse s'accompagne, en condition an hormonale, d'une rapide transformation morphologique de l'appareil de Golgi. Les saccules de la face distale des dictyosomes acquièrent un aspect dilaté. Ils donnent naissance, par fragmentation, à des vacuoles golgiennes qui se fusionnent pour former les alvéoles ^{de} mucopolysaccharides, particulièrement abondants chez N. pelagica et P. cultrifera.

Cette évolution de l'appareil de Golgi est analogue à celle qui s'effectue au cours de l'ovogenèse naturelle, à l'approche de la maturité sexuelle. L'injection de glucose ^3H dans des ovocytes parvenus à ce stade est suivie d'une incorporation localisée initialement au niveau des saccules golgiens (autoradiographie à haute résolution). C'est donc à ce niveau, ainsi que cela a été démontré dans d'autres types cellulaires par cette même technique (NEUTRA et LEBLOND, 1966) et confirmé par détection cytochimique (REVEL, 1964 ; WETZEL et WETZEL, 1966 ; THIERY, 1967) que s'effectue la synthèse des hydrates de carbone complexes (mucopolysaccharides).

Dans le cas de l'ovogenèse naturelle, cette transformation de l'appareil de Golgi semble régie par une diminution de l'activité inhibitrice. Les résultats très récents de DURCHON et PORCHET (1970) ont permis en effet, chez P. cultrifera, d'établir une courbe de l'activité cérébrale en fonction de l'âge des vers et du diamètre des ovocytes. L'apparition des mucopolysaccharides semble coïncider avec la fin de l'activité endocrine cérébrale.

Il apparaît donc que les synthèses de l'appareil de Golgi sont contrôlées par un taux déterminé d'hormone.

Cependant pour que la levée de l'inhibition hormonale puisse entraîner l'évolution fonctionnelle des dictyosomes, il semble nécessaire que les ovocytes soient parvenus à un seuil de compétence, variable selon les espèces. C'est ainsi qu'à partir d'un diamètre de 50 μ , les ovocytes de N. pelagica sont capables d'élaborer des formations mucopolysaccharidiques qui n'apparaissent normalement que pour une taille ovocytaire de 150 μ . Par contre, chez P. cultrifera, seuls les ovocytes d'un diamètre supérieur à 140-150 μ , (stade d'apparition des mucopolysaccharides) ont une évolution parallèle à la normale. Ceux d'une taille inférieure à 130 μ augmentent de taille mais sont dans l'incapacité d'élaborer ce type de matériel. Cependant, en présence d'un faible taux d'hormone (réimplantation de cerveaux de femelles sub-épi-toques), l'appareil de Golgi de ces jeunes ovocytes est capable d'opérer sa reconversion ; les ovocytes parviennent alors à une maturation anticipée (PORCHET, 1969). Chez P. cultrifera, tout se passe donc comme si une diminution progressive de l'inhibition était indispensable pour permettre à l'ovocyte d'accéder à l'étape suivante de ses synthèses cytoplasmiques.

Chez N. pelagica et P. cultrifera, l'accumulation des mucopolysaccharides intervient pour une grande part dans l'accroissement de taille des ovocytes. Chez N. diversicolor, le processus est assez différent et mérite un examen particulier. Le développement des formations corticales (granules et alvéoles) est beaucoup plus restreint dans cet ovocyte que dans celui des deux espèces précédemment citées. Les inclusions cytoplasmiques sont représentées en majeure partie par les lobules de vitellus protéique et lipidique. En l'absence d'hormone, l'appareil de Golgi après avoir élaboré un nombre très réduit d'organites corticaux dégénère rapidement. Or cet ovocyte, comme l'avaient signalé antérieurement CLARK et RUSTON (1963), augmente rapidement de volume en condition an hormonale. Nous avons pu constater de même, que selon sa taille initiale, l'ovocyte subissait un accroissement dont le coefficient varie entre 1,5 et 2. La cause principale de cette augmentation de volume est représentée par une accumulation dans la zone péri-nucléaire, de mitochondries, de nombreux ribosomes libres et par des empilements de citernes ergastoplasmiques. Tout se passe comme si l'ovocyte, au lieu d'accumuler les substances de réserve, emmagasinait les éléments chargés de la synthèse de ces réserves. Cette déviation du métabolisme est vraisemblablement liée à la dégénérescence précoce de l'appareil de Golgi entraînant la disparition d'un maillon indispensable à la chaîne des synthèses protéiques.

Cette évolution ovocytaire semble se dérouler en deux étapes. Tout d'abord l'accélération de taille se traduit par le développement des éléments du réticulum, puis quand l'ovocyte atteint son développement maximum, une chute du taux d'incorporation des acides aminés survient ; simultanément on constate alors la prolifération des inclusions intra-nucléaires et des lamelles annelées cytoplasmiques. Ces formations ne semblent donc pas jouer un rôle direct dans les processus de synthèse. Leur présence paraît plutôt devoir être interprétée comme la conséquence de la phase d'hyper-activité cellulaire initiale. Cette hypothèse semble corroborée par la présence fréquente de tels organites dans les cellules ayant subi une phase de croissance rapide (gonocytes jeunes) ou présentant un déséquilibre fonctionnel résultant de causes virales, tumorales ou de conditions hormonales particulières.

Parallèlement à l'étude de l'évolution ovocytaire, nous avons envisagé les rapports existant entre les cellules germinales et les éléocytes. Ces cellules coelomiques avaient été en effet considérées par les anciens auteurs (KUKENTHAL, 1885 ; Mc INTOSH, 1907 ; ROMIEU, 1923) comme jouant un rôle actif dans l'apport de substances nourricières vers l'ovocyte. L'examen au microscope électronique montre qu'il n'existe toujours que des rapports de contiguïté entre les ovocytes et les éléocytes. Ces derniers ne peuvent donc être assimilés à des cellules folliculeuses. Cependant l'intense activité métabolique de ces cellules, la diminution progressive de leurs substances de réserve, leurs transformations morphologiques particulièrement spectaculaires chez N. pelagica à l'approche de la maturation sexuelle ou en l'absence d'hormone, semblent indiquer que les éléocytes pourraient jouer un rôle comparable à celui des corps gras des Insectes. Par la libération de substances nutritives (acides aminés, glucides) dans le liquide coelomique, ils contribueraient à l'élaboration de substances précurseurs du matériel vitellin (lipides et protides) des ovocytes.

En conclusion à cette étude de l'évolution du cytoplasme ovocytaire, il est utile d'établir une comparaison avec les modes de corrélations connus chez divers Invertébrés, entre les substances neuro-endocrines et les processus de vitellogenèse. Chez les Hirudinées, les ovocytes en phase de vitellogenèse semblent échapper à tout contrôle hormonal (HAGADORN, 1962). L'accroissement du vitellus, chez les Crustacés, est freiné par les sécrétions des pédoncules oculaires qui jouent un rôle inhibiteur (PANOUSE, 1943 ; DEMEUSY et VEILLET, 1952 ; DEMEUSY 1958 ; DE LERSNYDER, 1966) ; l'hormone de mue, par

contre, ne semble pas indispensable au dépôt du vitellus (DEMEUSY, 1952).

Chez les Gastéropodes (STREIFF, 1967 ; CHOQUET, 1969), l'accroissement des ovocytes serait contrôlé par une gonadostimuline d'origine cérébrale. De même, chez les Insectes, à l'exception de quelques cas particuliers tels les Chéleutoptères, les Diptères et les Lépidoptères (voir bibliographie dans CASSIER, 1967 et JOLY, 1968), les synthèses protéiques corrélatives de la vitellogenèse ne peuvent s'effectuer que sous l'action d'une hormone gonadotrope élaborée par les corps allates (JOLY, 1958 ; HIGNAM et al., 1963 ; LENDER et LAVERDURE, 1964).

Chez les Insectes comme chez les Néréidiens, les processus de vitellogenèse sont donc soumis à un déterminisme endocrine.

En fait, à l'échelle cellulaire le mode d'action de ce contrôle hormonal semble s'exercer d'une façon très différente. Chez les Insectes, le matériel protéique du vitellus est d'origine exogène, comme l'ont montré les observations morphologiques (ANDERSON, 1964 ; FAVARD-SERENO, 1964 ; ROTH et PORTER, 1964 ; BEAMS et KESSEL, 1969), autoradiographiques (TELFER et MELIUS, 1963) et immunologiques (BROOKS, 1969). Il est connu d'autre part que le matériel protéique présent dans l'hémolymphe est élaboré en majeure partie au niveau des cellules adipeuses (LUSCHER, 1968 ; PAN et al., 1969). Or l'ablation des corps allates entraîne une chute brutale de l'activité métabolique de ces cellules et un blocage de la libération et du transfert des substances de réserves vers l'ovocyte (HIGNAM et al., 1963 ; BROOKS, 1969). L'arrêt des processus de vitellogenèse pourrait donc n'être, en partie, qu'une conséquence secondaire de la suppression de l'activation hormonale des cellules des corps gras.

Chez les Néréidiens, par contre, la levée de l'inhibition hormonale entraîne une activation des éléocytes. D'autre part, au niveau de l'ovocyte, les rapports de grosses molécules de protéines exogènes sont peu importants ; la synthèse des protéines du vitellus s'effectue initialement à partir d'acides aminés libres. L'hormone cérébrale semble donc exercer une action directe sur l'ovocyte, d'une part en contrôlant les synthèses effectuées au niveau des ribosomes, d'autre part en empêchant l'évolution de l'appareil de Golgi vers un autre type d'activité sécrétoire, à savoir l'élaboration des polysaccharides complexes.

La question qui se pose à ce stade de notre étude est de savoir si le contrôle de l'hormone cérébrale s'exerce directement au niveau des organites cytoplasmiques ou par l'intermédiaire d'une modification des informations nucléaires. Ce problème, concernant l'action de l'hormone inhibitrice au niveau du noyau, nous a conduit à envisager tout d'abord l'évolution en condition an hormonale des cellules germinales mâles, cellules où le développement du cytoplasme est très restreint, puis à considérer les répercussions cytologiques et métaboliques entraînées par une variation du taux d'hormone inhibitrice au niveau de la vésicule germinative des ovocytes.

II. EVOLUTION NUCLEAIRE

A - MODE D'ACTION DE L'HORMONE CEREBRALE SUR L'EVOLUTION NUCLEAIRE AU COURS DE LA SPERMATOGENESE

Chez les mâles, l'hormone cérébrale inhibe la spermatogenèse (DURCHON, 1962). Nous avons pu démontrer, par incorporation de thymidine ³H en culture organotypique, que cette action s'effectue par le blocage des synthèses d'ADN survenant lors de l'interphase préméiotique. In vitro, l'association de prostomiums, à des temps variés d'évolution, à des parapodes initialement isolés montre, que lorsque les synthèses d'ADN sont achevées et que les spermatocytes parviennent en phase d'accroissement, l'hormone est sans effet sur le déroulement des divisions hétéro et homéotypiques et sur celui de la spermiogenèse.

Il est intéressant de rapprocher ces résultats, des observations effectuées chez d'autres Annélides : Oligochètes et Hirudinées en particulier.

Chez les Oligochètes, HERLANT-MEEWIS (1959) constate chez Eisenia foetida, un blocage de la spermatogenèse consécutif à l'ablation des centres nerveux antérieurs. Les testicules ne libèrent plus de spermatogonies et les spermatocytes de premier ordre restent bloqués à ce stade. Seules les cellules ayant franchi le seuil de la méiose (spermatocytes de 2ème ordre et spermatides) poursuivent leur évolution spermiogénétique. Chez Allobophora icterica, SAUSSEY (1966) observe un phénomène semblable. Après ablation des ganglions cérébroïdes, la reprise des mitoses goniales et des divisions de maturation spermatocytaire coïncide avec la régénération des éléments neurosécréteurs du cerveau.

De même chez les Hirudinées, HAGADORN (1962) et MALECHA (1967 b, 1970) constatent que l'ablation des ganglions cérébroïdes entraîne un blocage de la

formation des spermatozoïdes. Les éléments germinaux restent alors bloqués en début de prophase de méiose (MALECHA, 1970). Quoique les auteurs précédemment cités n'aient point précisé ce point dans leurs travaux, il semble que le stade critique de l'action hormonale corresponde à la période des synthèses d'ADN préméiotiques. Mais contrairement au cas des Néréidiens, l'hormone des ganglions cérébroïdes aurait un rôle stimulateur (gonadostimuline) dans le déroulement de ces synthèses. Chez les Insectes, dans un certain nombre d'espèces (voir bibliographie dans CASSIER, 1967), l'hormone des corps allates semble sans action sur l'évolution de la lignée germinale mâle. Cependant chez Bombyx mori, TAKEUCHI (1969) conclut à un effet inhibiteur de l'hormone juvénile sur la spermatogenèse. L'action d'une surcharge en hormone juvénile sur la formation des spermatozoïdes a également été constatée par CANTACUZENE et SEUREAU (1970) chez Locusta migratoria migratorioides. Cet effet, comparable à celui entraîné par une exposition aux rayons γ , s'exercerait toutefois d'une façon plus critique sur les processus de spermiogenèse que sur ceux de la spermatogenèse. D'autre part, chez les Insectes, le rôle de l'ecdysone comme agent stimulateur de la spermatogenèse est bien connu depuis les travaux de SCHMIDT et WILLIAMS (1953) et l'action réciproque des facteurs antagonistes reste difficile à déterminer avec précision.

B - MODE D'ACTION DE L'HORMONE CEREBRALE SUR L'EVOLUTION NUCLEAIRE AU COURS DE L'OVOGENESE

1 - Action sur les synthèses d'ADN ovocytaire

Comme dans le cas de la spermatogenèse, nous avons constaté, par incorporation de thymidine ^3H , que les synthèses d'ADN s'effectuent durant la prophase de méiose et se terminent au stade préleptotène. Cependant, contrairement à ce qui se passe chez les mâles, les synthèses d'ADN surviennent chez les femelles à une période où la teneur en hormone inhibitrice est très élevée.

Le facteur hormonal ne semble toutefois pas indispensable à la différenciation des ovogonies et au déroulement de la prophase de méiose :

- Après ablation du cerveau, des Nereis indifférenciées sexuellement deviennent épitoques en l'espace de deux mois. Les produits génitaux mâles et femelles sont alors présents dans 92 % des cas chez P. cultrifera et 94 % chez N. pelagica (BOILLY-MARER, 1969).

- La cinétique d'incorporation de thymidine ^3H montre que le marquage des divers stades de la prophase de méiose s'effectue simultanément dans les ovocytes des parapodes isolés et des parapodes associés à un prostomium.

Ces résultats sont à rapprocher de ce qui a été observé chez les Insectes. Chez ces derniers, après ablation des corps allates, la croissance des ovocytes se poursuit jusqu'à un stade qui correspond au début de la formation du vitellus ; l'absence d'hormone juvénile est sans action sur la continuité de la production des ovocytes au niveau du germarium (JOLY, 1948). Par contre, chez les Gastéropodes (STREIFF, 1967 ; CHOQUET, 1969), les divisions goniales nécessitent la présence d'une gonado-stimuline d'origine cérébrale. De même chez les Crustacés, la multiplication des ovogonies, même après libération du contrôle inhibiteur exercé par les pédoncules oculaires, semble nécessiter la présence d'hormone de mue (DEMEUSY, 1958).

En conclusion, les divisions goniales (mâles ou femelles) des Néréidiens, semblent, comme chez les Insectes, ne pas être contrôlées par une hormone mitogène. L'hormone cérébrale exerce par contre, chez les mâles, un rôle inhibiteur spécifique des synthèses d'ADN liées à la méiose.

2 - Action de l'hormone cérébrale sur l'évolution nucléaire de l'ovocyte au cours de la phase de grand accroissement

Au cours de la phase de grand accroissement de l'ovocyte, l'activité métabolique du nucléole est particulièrement intense comme en témoignent les incorporations d'uridine ^3H , de leucine ^3H et d'arginine ^3H .

La démonstration d'un transfert de matériel nucléaire vers le cytoplasme a pu être effectuée par l'étude cinétique, en autoradiographie à haute résolution, de l'incorporation d'uridine tritiée. Le marquage, localisé initialement au niveau du nucléole, puis dans le nucléoplasme, n'apparaît que tardivement dans le cytoplasme (3 jours environ). Il coïncide alors avec les agrégats cytoplasmiques de densité élevée dont l'origine nucléaire est ainsi démontrée. Les extrusions nucléaires semblent se dissocier progressivement dans le cytoplasme en libérant un matériel fibrillaire dans lequel on décèle de petites particules qui pourraient représenter un stade intermédiaire dans l'édification des ribosomes.

Par comparaison avec les travaux biochimiques effectués dans divers ovocytes (BROWN et LITINA, 1964 ; DAVIDSON et al., 1964 ; PIATIGORSKY et TYLER, 1967) et en particulier avec ceux obtenus chez une espèce voisine de Néréidiens (N. grubei) par GOULD-SOMERO et SCHROEDER (1969), il semble que la majeure partie de l'ARN synthétisé par le nucléole au cours de l'ovogenèse soit de nature ribosomale. Cependant il est connu que chez les ovocytes (cf. les auteurs précédemment cités), l'ARN messager et l'ARN de transfert

représentent une fraction non négligeable des produits du métabolisme nucléaire. Une partie de ces ARN pouvant, de même que l'ARN ribosomal (DAVIDSON et al. 1964), être stockée dans l'ovocyte sous une forme inactive jusque la fécondation (SPIRIN, 1966).

La libération du matériel nucléaire semble s'accroître à certains stades de l'évolution ovocytaire. Après une phase de croissance au cours de laquelle il acquiert un aspect hypertrophique, le nucléole de N. nelagica se dissocie vers la fin de la vitellogenèse, ce qui entraîne la disparition du composant granulaire. Lors de l'apparition des mucopolysaccharides se reconstitue un nouvel édifice nucléolaire à partir des éléments fibrillaires persistant. La dislocation ultime du complexe nucléolaire précède la maturation ovocytaire. Les diverses phases de l'évolution nucléolaire, vraisemblablement corrélatives d'un accroissement ou d'une variation de la nature des échanges nucléo-cytoplasmiques, coïncident avec les étapes successives de l'activité cytoplasmique.

Ce synchronisme fonctionnel semble régi par une diminution du taux de l'hormone inhibitrice. La courbe de l'activité cérébrale établie par DURCHON et PORCHET (1970) chez P. cultrifera montre en effet deux points d'inflexion qui correspondent respectivement à l'élaboration du vitellus protéique et à celle des mucopolysaccharides. Deux questions se posent à ce sujet : Une telle corrélation nucléo-cytoplasmique se manifeste-t-elle en condition an hormonale ? Par quel processus l'hormone cérébrale est-elle capable d'exercer un éventuel contrôle au niveau du noyau ?

- L'examen au microscope optique montre, qu'en l'absence d'hormone, l'évolution morphologique du nucléole est comparable à celle observée dans les conditions naturelles. Nous nous proposons de reprendre prochainement ces investigations à l'échelle de la microscopie électronique pour déceler les modifications éventuelles survenant, en condition an hormonale, au niveau des composants nucléolaires.

- Le mode d'action de l'hormone cérébrale au niveau du noyau a été envisagé, en particulier au niveau des histones. Il est connu en effet que les protéines basiques en se combinant à l'ADN peuvent bloquer l'ARN polymérase et donc la libération des ARN messagers (ALLFREY et al., 1963). Dans des noyaux isolés, après extraction des histones par la trypsine, ces auteurs constatent une augmentation des synthèses d'ARN messagers. D'autre

part, l'addition d'histones à des embryons d'oursins (VOROBYEV, 1969) ou à des ovocytes de tritons (IZAWA et al., 1963) entraîne un ralentissement des synthèses d'ARN et de protéines. Ces protéines basiques, par suite de leur rôle important sur l'activation génique et la différenciation cellulaire (BRACHET, 1965), pouvaient être considérées chez les Néréidiens, comme responsables du contrôle de l'évolution ovocytaire ; l'action de l'hormone cérébrale s'exerçant alors par leur intermédiaire. Nous avons effectivement constaté que la levée de l'inhibition hormonale entraîne une disparition de la coloration du nucléoplasme par les techniques de mise en évidence des protéines basiques. Toutefois, l'interprétation de ces résultats reste délicate, car au cours de l'ovogenèse naturelle, nous avons relevé, dans certains cas, d'importantes variations individuelles au niveau des divers ovocytes issus d'un même ver.

L'étude du mode d'action de l'hormone des Néréidiens au niveau du noyau semble donc devoir être reprise sur des bases nouvelles. A titre d'hypothèse de travail, on peut envisager le fait que, si l'hormone exerce son contrôle par l'intermédiaire des informations nucléaires, le blocage sélectif de ces dernières par l'utilisation d'inhibiteurs métaboliques spécifiques doit avoir un retentissement sur le déroulement maintenant bien connu de l'évolution ovocytaire en condition an hormonale. Les renseignements recueillis permettront peut-être d'arriver à une meilleure compréhension du processus par lequel s'effectue le contrôle endocrine au niveau des ovocytes.



BIBLIOGRAPHIE

- 1 AFZELIUS B.A., 1955 - The ultrastructure of the nuclear membrane of the sea
urchin oocyte as studied with the electron microscope. Exp.
Cell Res. 8, 147-158.
- 2 AFZELIUS B.A., 1956 a - The ultrastructure of the cortical granules and their
products in the sea urchin egg as studied with the electron
microscope. Exp. Cell Res. 10, 257-285.
- 3 AFZELIUS B.A., 1956 b - Electron microscopy of Golgi elements in sea urchin
eggs. Exp. Cell Res. 11, 67-85.
- 4 AFZELIUS B.A., 1957 - Electron microscopy on the basophilic structures of the
sea urchin egg. Z. Zellforsch. 45, 660-675.
- 5 AFZELIUS B.A., NICANDER L. et SJÖDEN I., 1968 - Fine structure of egg envelopes
and the activation changes of cortical alveoli in the river
lamprey, Lampetra fluviatilis. J. Embryol. exp. Morph. 19,
311-318.
- 6 ALFERT M. et GESCHWIND I.I., 1953 - A selective staining method for the basic
proteins of cell nuclei. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 39,
991-999.
- 7 ALLEN M.J., 1967 - Nucleic acid and protein synthesis in the developing oocytes
of the budding form of the syllid Autolytus edwardsi (Class
Polychaeta). Biol. Bull., 133, 287-302.
- 8 ALLEN E.R. et CAVE M.D., 1968 - Formation, transport and storage of ribonucleic
acid containing structures in oocytes of Acheta domesticus
(Orthoptera). Z. Zellforsch., 92, 477-487.
- 9 ALLFREY V.G., LITTAU V.C. et MIRSKY A.E., 1963 - On the role of histones in
regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 49, 414-421.
- 10 ALLFREY V.G., LITTAU V.C. et MIRSKY A.E., 1964 - Methods for the purification
of thymus nuclei and their application to studies of nuclear
protein synthesis. J. Cell Biol. 21, 213-231.
- 11 AMANO M., MESSIER B. et LEBLOND C.P., 1959 - Specificity of labelled thymidine
as a desoxyribonucleic acids precursor in autoradiography.
J. Histochem. Cytochem. U.S.A. 7, n° 3, 153-5.
- 12 AMANO M. et LEBLOND C.P., 1960 - Comparaison of the specific activity time
curves of ribonucleic acid in chromatin, nucleolus and cyto-
plasm. Exp. Cell Res., 20, 250-253.
- 13 ANCLA M. et DE BRUX J., 1965 - Occurrence of intranuclear tubular structures
in the human endometrium during the secretory phase, and
of annulate lamellae in human hyperestrogenic states. Obstet.
Gynecol. 26, 23.

- 14 ANDERSON E., 1964 - Oocyte differentiation and vitellogenesis in the roach
Periplaneta americana. J. Cell Biol., 20, 131-155.
- 15 ANDERSON E., 1966 - The origin of cortical granules and their participation
in the fertilization phenomenon in Echinoderms (Arbacia
punctulata, Strongylocentrus purpuratus and Asterias forbesii).
J. Cell Biol., 31, 5 A.
- 16 ANDERSON E., 1968 a - Oocyte differentiation in the sea urchin, Arbacia
punctulata, with particular reference to the origin of cortical
granules and their participation in the cortical reaction. J.
Cell Biol., 37, 514-539.
- 17 ANDERSON E., 1968 b - Cortical alveoli formation and vitellogenesis during
oocyte differentiation in the Pipefish, Syngnathus fuscus,
and the Killifish, Fundulus heteroclitus. J. Morph. 125, 1,
23-60.
- 18 ANDRE J., 1962 - Contribution à la connaissance du chondriome. J. Ultrastruc-
ture Res., suppl. 3, 1-185.
- 19 ANSLEY, 1957 - Cité par E. HOLLANDE in "Biologie générale". Masson Ed. (1966)
- 20 BACA M. et ZAMBONI L., 1967 - The fine structure of human follicular oocyte.
J. Ultrastructure Res., 19, 354-381.
- 21 BACKSTROM S., 1965 - Basic proteins during sea urchin ovogenesis (Psammechinus
miliaris). Acta Embryol. Morph. Exp. Ital. 8, n° 2, 178-82.
- 22 BACKSTROM S., 1966 - A complex between basic proteins and acid polysaccharides
in sea urchin oocytes and eggs. Acta Embryol. Morphol. exper. Ital.
9, n° 1, 37-43.
- 23 BAINTON D.F. et FARQUHAR M., 1966 - Origin of granules in polymorphonuclear
leucocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi
complex in developing granulocytes. J. Cell. Biol. 28, 277-301.
- 24 BAKER T.G. et FRANCHI L.L., 1967 - The fine structure of oogonia and oocytes
in human ovaries. J. Cell.Sci. 2, 213-224.
- 25 BAL A.K., JUBINVILLE F., COUSINEAU G.H. et INOUE S., 1968 - Origin and fate
of Annulate lamellae in Arbacia punctulata eggs. J. Ultrastructure
Res. 25, 15-28.
- 26 BALINSKY B.I. et DAVIS R.J., 1963 - Origin and differentiation of cytoplasmic
structures in the oocytes of Xenopus laevis. Acta Embryol.
Morphol. Exptl. 6, 55-108.
- 27 BEAMS H.W. et KESSEL R.G., 1963 - Electron microscope studies on developing
crayfish oocytes with special references to the origin of
Yolk. J. Cell Biol. 18, 621-649.

- 28 BEAMS H.W. et SEKHON S.S., 1966 - Electron microscope studies on the oocyte of the fresh water Mussel (Anodonta) with special references to the stalk and mechanism of Yolk deposition. J. Morph. 119, n° 4, 477-502.
- 29 BEAMS H.W. et KESSEL R.G., 1968 - The Golgi apparatus : structure and function. Intern. Rev. Cytol. 23, 209-276.
- 30 BEAMS H.W. et KESSEL R.G., 1969 - Synthesis and deposition of oocytes envelopes (vitelline membrane, chorion) and the uptake of yolk in the dragonfly (Odonata : Aeschnidae). J. Cell Sci. 4, n° 1, 241-264.
- 31 BEAMS H.W. et SEKHON S.S., 1968 - Fine structure of the nucleolus in the young oocyte of a Centipede. Z. Zellforsch., 85, 237-242.
- 32 BEAULATON J., 1967 - Localisation d'activités lytiques dans la glande prothoracique du ver à soie du chêne (Antheraea pernyi Guer), au stade prénympgal. II Les vacuoles autolytiques (cytolysomes). J. Microscopie 6, 349-370.
- 33 BEAULATON J., 1968 a - Modifications ultrastructurales des cellules sécrétrices de la glande prothoraciques de vers à soie aux cours des deux derniers âges larvaires. III. Les lamelles annelées et leur dégradation. J. Microscopie 7, n° 6, 895-906.
- 34 BEAULATON J., 1968 b - Sur l'action d'enzymes au niveau des pores nucléaires et d'autres structures de cellules sécrétrices prothoraciques incluses en épon. Z. Zellforsch. 89, 4, 453-461.
- 35 BEDFORD L., 1966 - The electron microscopy and cytochemistry of oogenesis and the cytochemistry of embryonic development of the Prosobranch Gastropod, Bembicus nanum L.J. Embryol. exp. Morph. 15, 15-37.
- 36 BENNETT H.S., 1963 - Morphological aspects of extracellular polysaccharides. J. Histochem. Cytochem. 11, 14-23.
- 37 BENNETT H.S., 1969 - The cell surface : components and configuration. In "Handbook of Molecular cytology". Lima de Faria Ed. North-Holland Publish. C. Amsterdam - London, 1508 p.
- 38 BERGERON M. et DROZ B., 1968 - Analyse critique des conditions de fixation et de préparation des tissus pour la détection radioautographique des protéines néoformées en microscopie électronique. J. Microscopie, 7, 51-62.
- 39 BERLIN J.D., 1967 - The localization of acid mucopolysaccharides in the Golgi complex of intestinal goblet cells. J. Cell Biol., 32, 760-766.

- 40 BERNHARD W., 1959 - Ultrastructural aspects of nucleo-cytoplasmic relation-
ship. Exp. Cell Res., suppl., 6, 17-50.
- 41 BERNHARD W., 1969 - A new staining procedure for electron microscopical
cytology. J. Ultrastructure Res., 27, 250-265.
- 42 BERNHARD W. et GRANBOULAN N., 1968 - Electron microscopy of the nucleolus
in vertebrate cells. In "The Nucleus". A.J. DALTON et F.
HAGUENEAU ed. Acad. Press. NEW-YORK-LONDON, 81-149.
- 43 BIER K., 1954 - Uber phasen gesteigerter protein and kohlenhydratein lagerung
und die fettverleitun im Hymenopterenovar. Verh. dent. Zool.
Ges. 18, 422-429.
- 44 BIER K., 1963 - Synthese, interzellulärer Transport, und Abban von Ribonuk-
leinsäure im Ovar der Stubenfliege Musca domestica. J. Cell
Biol. U.S.A. 16, n° 2, 436-40.
- 45 BIERNE J., 1964 - Maturation sexuelle anticipée par décapitation de la femelle
chez l'Hétéronemerte Lineus ruber Müller. C.R. Acad. Sci. Fr.
259, n° 25, 4841-3.
- 46 BIRBECK M.S.C. et MERCER E.H., 1961 - Cytology of cells which synthesize
proteins. Nature 189, 558-560.
- 47 BIRNSTIEL M.L. et HYDE B.B., 1963 - Protein synthesis by isolated pea nucleoli.
J. Cell Biol. vol. 18, 41-50.
- 48 BIRNSTIEL M.L., CHIPCHASE M.I.H. et FLAMM W.G., 1964 - On the chemistry and
organisation of nucleolar proteins. Biochem. Biophys. Acta.
87, 111-122.
- 49 BOILLY B., 1964 - Structure de la membrane des oocytes de Nereis diversicolor
O.F. MULLER (Annélide Polychète). J. Microscopie 1964, 3, 25.
- 50 BOILLY B., 1967 - Contribution à l'étude ultrastructurale de la cuticule
épidermique et pharyngienne chez une Annélide Polychète (Syllis
amica Quatrefages). J. Microscopie, 6, 469-484.
- 51 BOILLY-MARER Y., 1966 - Contribution à l'étude des cirres parapodiaux dorsaux
des formes épitoques chez Nereis pelagica L. (Annélide Polychète).
C.R. Acad. Sci. 262, 2052-2054.
- 52 BOILLY-MARER Y., 1969 - Rôle des produits génitaux dans la différenciation des
caractères sexuels secondaires chez quelques Néréidiens. C.R.
Acad. Sci. 268, 2071-2073.
- 53 BOUTEILLE M., KALIFAT S.R. et DELARUE J., 1967 - Ultrastructural variations
of nuclear bodies in human diseases. J. Ultrastructure Res. 19
474-86.
- 54 BRACHET J., 1965 - Le rôle des acides nucléiques dans la morphogénèse.
Année Biol. Fr. 4, n° 1-2, 21-48.

- 55 BRAFIELD A.E. et CHAPMAN G., 1967 - Gametogenesis and breeding in a natural population of Nereis virens. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 47, 619-627.
- 56 BRANDT P.W. et PAPPAS G.D., 1960 - An electron microscopic study of pinocytosis in Ameoba. I. The surface attachment phase. J. Biophys. Biochem. Cytol. 8, 675-687.
- 57 BRETON-GORIUS J., 1963 - Etude au microscope électronique des cellules chlorogènes de Arenicola marina L. Leur rôle dans la synthèse de l'hémoglobine. Ann. Sc. Nat. 12e série, 5, 211-272.
- 58 BROOKES V.J., 1969 - The induction of yolk protein synthesis in the fat body of an Insect, Leucophaea maderae by an analog of the juvenile hormone. Developmental Biol. 20, 459-67.
- 59 BROWN D.D. et LITINA E., 1964 - Variations in the synthesis of stable RNA's during oogenesis and development of Xenopus laevis. J. Mol. Biol. 8, 688-695.
- 60 BUSSON MABILLOT S., 1967 - Structure ovarienne de la lamproie adulte. II. Les enveloppes de l'ovocyte : cellules folliculaires et stroma ovarien. J. Microscopie 6, 807-838.
- 61 BUSSON MABILLOT S., 1969 - Données récentes sur la vitellogénèse. Année Biologique, 8, 199-228.
- 62 CALLEBAUT M., 1967 - Premeiosis and premeiotic DNA synthesis in the left ovary of the female chick embryo. J. Embryol. exper. Morph. 18, 3, 299-304.
- 63 CANTACUZENE A.M. et SEUREAU C., 1970 - Altérations de la spermiogénèse de Locusta migratoria migratorioïdes après implantation de corps allates et après irradiation. Z. Zellforsch. 103, 3, 351-364.
- 64 CARASSO N., FAVARD P. et GOLDFISCHER S., 1964 - Localisation, à l'échelle des ultrastructures, d'activité de phosphatases en rapport avec les processus digestifs chez un Cilié Campanella umbellaria. J. Microscopie 3, 297-322.
- 65 CARDELL R.R., BADENHAUSEN S. et PORTER K.R., 1967 - Intestinal triglyceride absorption in the rat. J. Cell Biol. 34, n° 1, 123-155.
- 66 CARLIER H., CLEMENT G. et NOIROT-TIMOTHEE C., 1969 - Application de la technique de radioautographie en microscopie électronique à l'étude de l'absorption intestinale des lipides chez le rat. C.R. Acad. Sci. 268, 12, 1627-29.
- 67 CARO L.G. et PALADE G.E., 1964 - Protein synthesis storage and discharge in the pancreas exocrine cell. An autoradiographic study. J. Cell Biol. 20, 473-495.

- 68 CASSIER P., 1967 - La reproduction des Insectes et la régulation de l'activité
des corps allates. Année Biologique, 6, 595-670.
- 69 CHAMBERS V.C. et WEISER R., 1964 - Annulate lamellae in Sarcoma I. Cells.
J. Cell Biol. 21, 133-139.
- 70 CHOQUET M., 1962 - Effet inhibiteur de l'hormone cérébrale sur l'évolution
des cellules sexuelles chez Nereis pelagica L. (Annélide
Polychète). C.R. Soc. Biol. 156, III2-III4.
- 71 CHOQUET M., 1969 - Contribution à l'étude du cycle biologique et de l'inver-
sion du sexe chez Patella vulgata L. Thèse de Sciences, Lille
n° 185, 234 p.
- 72 CLAPAREDE E., 1868 - Annélides Chétopodes du Golfe de Naples. Mém. Soc. Phys.
Genève, t. 19.
- 73 CLARK M.E., 1964 - Biochemical studies on the coelomic fluid of Nephtys
hombergi (Polychaeta : Nephtyidae) with observations on
changes during different physiological states. Biol. Bull.
U.S.A. 127, n° 1, 63-84.
- 74 CLARK M.E., 1968 - Free amino-acid levels in the coelomic fluid and body
wall of polychaetes. Biol. Bull. 134, 1, 35-47.
- 75 CLARK R.B. et RUSTON R.J.G., 1963 - The influence of brain extirpation on
oogenesis in the polychaete Nereis diversicolor. Gen. comp.
Endocrinol. U.S.A. 3, n° 5, 529-41.
- 76 CLEROT J.C., 1968 - Mise en évidence par cytochimie ultrastructurale de
l'émission de protéines par le noyau d'auxocytes de Batraciens.
J. Microscopie, 7, 973-992.
- 77 COHN Z.A. et BENSON B., - 1965 - The in vitro differentiation of mononuclear
phagocytes. I. The influence of inhibitors and the results
of autoradiography. J. Exptl. Med. 121, 279-287.
- 78 COIMBRA A. et LEBLOND C.P., 1966 - Sites of glycogen synthesis in rat liver
cells as shown by electron microscope radioautography after
administration of glucose 3H. J. Cell Biol. 30, 161-175.
- 79 COSTELLO D.P., 1949 - The relations of the plasma membrane, vitellin membrane
and jelly in the egg of Nereis limbata. J. Gen. Physiol. 32,
351.
- 80 COWDEN R.R., - 1966 - Cytochemical studies on cytoplasmic RNA associated
basic proteins in oocytes, somatic cells and ribosomes.
Histochemie Dtsch. 6, n° 3, 226-42.
- 81 COWDEN R.R., 1967 - Quantitative cytochemical studies of oocyte growth in the
Ascidian Aséidia nigra. Acta embryol. morph. exp. 9, 235-245.

- 82 CRAIG N. et GOLDSTEIN L., 1969 - Studies on the origin of ribosomes in
Amoeba proteus. J. Cell Biol., 40, 622-632.
- 83 DALES R.P., 1950 - The reproduction and larval development of Nereis diversicolor O.F. MULLER. J. mar. biol. Ass. U.K. 29, 321-360.
- 84 DALES R.P., 1957 - Preliminary observations on the role of the coelomic cells
in foods storage and transport in certain Polychaetes. J. mar.
biol. Assoc. U.K. 36, 91-110.
- 85 DALES R.P., 1964 - The coelomocytes of the Terebellid Polychaete Amphitrite
johnstoni. Quart. J. micr. Sci. G.B. 105, n° 2, 263-79.
- 86 DAVENPORT R., 1967 - Basic ribonucleo protein granules in the Haliotis oocyte.
Exp. Cell Res. 47, 606-667.
- 87 DAVENPORT R. et DAVENPORT J.C., 1965 - A cytochemical study of cytoplasmic
basic proteins in the Ascidian oocytes. J. Cell. Biol. 25,
2, 319-326.
- 88 DAVENPORT R. et DAVENPORT J.C., 1966 - A cytochemical study of cytoplasmic
basic proteins in Echinoderm oogenesis. Exp. Cell Res. 42
429-437.
- 89 DAVIDSON E.H., ALLFREY V.G. et MIRSKY A.E., 1964 - On the RNA synthesized
during the lampbrush phase of Amphibian oogenesis. Proc.
Natl Acad. Sc. 56, 856-863.
- 90 DE DUVE C., 1961 - The lysosome concept. In "Symposium on lysosomes". Ciba
Foundations. A. de REUCK et M.P. CAMERON ed. (Londres 1-31).
- 91 DEFRETIN R., 1949 - Recherches sur la musculature de Nereidiens au cours de
l'épitoquie, sur les glandes parapodiales et sur la spermio-
genèse. Ann. Inst. Oceanog. Monaco, 24, 117-257.
- 92 DEHORNE A., 1911 - Recherches sur la division de la cellule. II Homéotypie
et hétérotypie chez les Annélides Polychètes et les Trématodes.
Thèse, Univ. de Paris, Editions Archives Zool. expt. 1-175.
- 93 DEHORNE A., 1922 - Histolyse et phagocytose musculaire dans le coelome des
Néréides à maturité sexuelle. C.R. Acad. Sci. 164, 1043.
- 94 DEHORNE A., 1930 - La grande vacuole des éléocytes chez les Néréides, les
néphro-éléocytes. C.R. Soc. Biol. 103, 663-665.
- 95 DEHORNE A., et DEFRETIN R., 1933 - Phagocytose active des sarcoles amphioxes
chez Heteronereis Pelagica L. C.R. Soc. Biol. Paris, 113,
667-680.
- 96 DELBOS M., 1969 - Etude ultrastructurale des phénomènes de réabsorption dans
la néphridie de N. diversicolor. C.R. Acad. Sci. 269-3, 362-64.

- 97 De LEERSNYDER M., 1966 - Influence de quelques facteurs externes et internes sur le milieu intérieur, la mue et le développement ovarien d'Eriocheir sinensis H. Milne Edwards. Thèse doctorat Sc. Lille n° 147, 133 p.
- 98 DEMEUSY N., 1958 - Recherches sur la mue de puberté du Décapode Brachyoure Carcinus maenas Linné. Arch. Zool. Exp. Gen. 95, 253-491.
- 99 DEMEUSY N. et VEILLET A., 1952 - Déclenchement de la ponte chez le Crabe Carcinus maenas Pennant par ablation des pédoncules oculaires. C.R. Acad. Sci. Paris 254, 1224-1226.
- 100 DE ROBERTIS E. et LASANSKY A., 1958 - Submicroscopie organization of retinal cones of the rabbit. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 743.
- 101 DESVEAUX-CHABROL J., 1968 - Acquisitions récentes sur la biologie des histones. Année Biologique 7, 7-8, 369-428.
- 102 DHAINAUT A., 1964 - Contribution à l'étude du métabolisme de l'ARN, par incorporation de ³H-Uracile, au cours de l'ovogenèse chez Nereis diversicolor O.F. Müller (Annélide Polychète). Bull. Soc. Zool. Fr., 89, 408-413.
- 103 DHAINAUT A., 1966a - Présence de membranes annelées extra et intra-nucléaires au cours de l'ovogenèse naturelle et expérimentale chez Nereis pelagica L. (Annélide polychète). C.R. Soc. Biol. 160, 749-752.
- 104 DHAINAUT A., 1966b - Etude ultrastructurale de l'évolution des éléocytes chez Nereis pelagica L. (Annélide Polychète) à l'approche de la maturité sexuelle. C.R. Acad. Sci. . 262, 2740-2743.
- 105 DHAINAUT A., 1966c - Etude ultrastructurale de l'évolution cytoplasmique au cours des premiers stades de l'ovogenèse chez Nereis pelagica L. (Annélide Polychète). C.R. Acad. Sc., 262, 2616-2619.
- 106 DHAINAUT A., 1967 - Etude de la vitellogenèse chez Nereis diversicolor O.F. Müller (Annélide Polychète) par autoradiographie à haute résolution. C.R. Acad. Sc. 265 D, 434-436.
- 107 DHAINAUT A., 1968 - Etude par autoradiographie à haute résolution de l'élaboration des mucopolysaccharides acides au cours de l'ovogenèse de Nereis pelagica L. (Annélide Polychète) J. Microscopie, 7, 1075-1080.
- 108 DHAINAUT A., 1969a - Etude ultrastructurale et cytochimique de la formation des inclusions intra-nucléaires dans les ovocytes de l'Annélide Nereis diversicolor O.F. Müller. Z. Zellforsch. 96, 75-86.
- 109 DHAINAUT A., 1969b - Origine et structure des formations mucopolysaccharidiques de la zone corticale de Nereis diversicolor O.F. Müller (Annélide Polychète). J. Microscopie, 8 , 69-86.

- 110 DHAINAUT A., 1970 a - Etude en microscopie électronique et par autoradiographie à haute résolution des extrusions nucléaires au cours de l'ovogénèse de Nereis pelagica L. J. Microscopie, 9, 99-118.
- 111 DHAINAUT A., 1970 b - Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution ovocytaire de Nereis pelagica L. (Annélide Polychète). I. Ovogénèse naturelle. Z.Zellforsch. 104, 375-389.
- 112 DHAINAUT A., 1970 c - Etude cytochimique et ultrastructurale de l'évolution ovocytaire de Nereis pelagica L. (Annélide Polychète). II. Evolution expérimentale en l'absence d'hormone cérébrale. Z. Zellforsch. 104, 390-404.
- 113 DHAINAUT-COURTOIS N., 1966 - Le complexe cérébro-vasculaire de Nereis pelagica L. Origine des cellules infra-cérébrales et structure de la paroi du réseau vasculaire. C.R. Soc. Biol. 160, n° 6, 1232-4.
- 114 DROCHMANS P., 1962 - Morphologie du glycogène. Etude au microscope électronique de colorations négatives du glycogène particulaire. J. Ultrastructure Res. 6, 141-163.
- 115 DROLLER M.J. et ROTH T.F., 1966 - An electron microscope study of yolk formation during oogenesis in Lebistes reticulatus Guppyi. J. Cell Biol. 28, n° 2, 209-232.
- 116 DROZ B., 1966 a - Sites de synthèse et migration de protéines dans les cellules hépatiques du Rat ; Etude radioautographique en microscopie électronique. C.R. Acad. Sci. 262, p. 1654-1656.
- 117 DROZ B., 1966 b - Elaboration de glycoprotéines dans l'appareil de Golgi des cellules hépatiques chez le rat ; étude autoradiographique en microscopie électronique après injection de galactose -3 H. C.R. Acad. Sci, 262 D, 1766-1768.
- 118 DROZ B., 1967 a - Synthèse et transfert des protéines cellulaires dans les neurones ganglionnaires. Etude radioautographique quantitative en microscopie électronique. J. Microscopie, 6, 201-228.
- 119 DROZ B., 1967 b - L'appareil de Golgi comme site d'incorporation du galactose 3H dans les neurones ganglionnaires spinaux chez le rat. J. Microscopie 6, 3, 419-424.
- 120 DUMONT J.N. et ANDERSON E., 1968 - Vitellogenesis in the Horseshoe Crab Limulus polyphemus. J. Microscopie 6, 159-174.
- 121 DURCHON M., 1948 - Epitoquie expérimentale chez deux Polychètes : Perinereis cultrifera Grube et Nereis irrorata Malmgren. C.R. Acad. Sci. 227, 157-158.
- 122 DURCHON M., 1952 - Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les Annélides Polychètes : l'épitoquie et la stolonisation. Ann. Sc. Nat. 11ème Série, 14, 119-206.

- 123 DURCHON M., 1956 - Rôle du cerveau dans la maturation génitale et le déclenchement de l'épitoque chez les Néréidiens. Ann. Sc. nat. Zool. Biol. Animale 18, 269-73.
- 124 DURCHON M., 1959 - Contribution à l'étude de la stolonisation chez les Syllidiens (Annélides Polychètes) I. Syllinae. Bull. Biol. France et Belgique, 93, 155-219.
- 125 DURCHON M. et BOILLY B., 1964 - Etude ultrastructurale de l'influence de l'hormone cérébrale des Néréidiens sur le développement des oocytes de Nereis diversicolor O.F. Müller (Annélide Polychète) en culture organotypique. C.R. Acad. Sci. 259, 1245-1247.
- 126 DURCHON M., BOILLY B. et DHAINAUT A., 1965 - Recherches en culture organotypique sur l'action de l'hormone cérébrale des Néréidiens. C.R. Soc. Biol. 159, 106-109.
- 127 DURCHON M. et DHAINAUT A., 1964 - Influence de l'hormone cérébrale des Néréidiens sur la croissance des ovocytes. Etude en culture organotypique. C.R. Acad. Sci. 259, 917-19.
- 128 DURCHON M. et PORCHET M., 1970 - Premières données quantitatives sur l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens au cours de leur cycle sexuel. Gen. comp. Endoc. (sous presse).
- 129 DURCHON M. et RICHARD A., 1967 - Etude en culture organotypique, du rôle endocrine de la gl. optique dans la maturation ovarienne chez sepia officinalis L. (Mollusque Céphalopode). C.R. Acad. Sci. 264, n° 11, 1497-500).
- 130 DURCHON M. et SCHALLER F., 1963 - Application de la méthode de culture organotypique aux recherches endocrinologiques chez les Annélides Polychètes. C.R. Acad. Sci. 256, 5616-5617.
- 131 DURCHON M. et VIVIER E., 1961 - Déterminisme de la gamogonie chez une grégarine parasite de P. cultifera Gr. (Annélide Polychète). C.R. Acad. Sci. 253, 318-320.
- 132 DURCHON M. et VIVIER E., 1964 - Influence des sécrétions endocrines sur le cycle des Grégarines chez les Néréidiens (Annélides Polychètes). Ann. Endoc. Paris, 25, 43-48.
- 133 DURCHON M. et WISSOCQ J.C., 1964 - Contribution à l'étude de la stolonisation chez les Syllidiens (Annélides Polychètes). II Autolytinae. Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Animale Fr. 6, n° 1, 159-208.
- 134 EBSTEIN B.S., 1969 - The distribution of DNA within the nucleoli of the Amphibian oocyte as demonstrated by triated actinomycin D radioautography. J. Cell Sci. 5, 27-44.

- 135 EISENSTADT T.B., 1965 - En russe : quelques particularités de l'ultrastructure des ovocytes en rapport avec la synthèse du vitellus. Zh. Obschch. Biol. S.S.S.R. 26, n° 2, 230-6;
- 136 EMANUELSSON H., 1969 - Electromicroscopical observations on yolk and yolk formation in Ophiothrocha labronica La Greca and Bacci. Z. Zellforsch. 95, 1, 19-36.
- 137 ENDO Y., 1961 - Changes in the cortical layer of sea urchin as studied with the electron microscope I. Clypeaster japonicus. Exp. Cell Res. 25, 383-397.
- 138 ESSNER E. et NOVIKOFF A.B., 1962 - Cytological studies on two functional hepatomas. Interrelations of endoplasmic reticulum, Golgi and lysosomes. J. Cell Biol., 15, 289-312.
- 139 EVANS J.J.T., 1967 - Development and ultrastructure of the fat body cells and oenocytes of the Queensland fruit fly. Dacus tryoni (Frogg). Z. Zellforsch. mikr. Anat. 81, n° 1, 49-61.
- 140 EVERINGHAM J.W., 1968 - Attachment of intranuclear annulate lamellae to the nuclear envelope. J. Cell Biol. 37, 2, 540-550.
- 141 FAIN-MAUREL M.A., 1967 - Caractères infrastructuraux de la glande hypobranchiale des Ptéropodes Thécosomes. J. Microscopie 6, 599-616.
- 142 FAIN MAUREL M.A., 1969 - Etude infrastructurale et genèse de la volumineuse inclusion des cellules acidophiles des glandes salivaires de Limnea stagnalis -Gastéropode Pulmoné). Z. Zellforsch. 98, 1, 33-53.
- 143 FALLON J.F. et AUSTIN C.R., 1967 - Fine structure of gametes of Nereis limbata (Annelida) before and after interaction. J. Exp. Zool. 166, 225-242.
- 144 FARQUHAR M.G. et PALADE G.E., 1962 - Functional evidence for the existence of a third cell type in the renal glomerulus. J. Cell Biol. 13, 55-87.
- 145 FAURE-FREMIET, 1924 - L'oeuf de Sabellaria alveolata. Arch. anat. Micr. Paris 20, 211-342.
- 146 FAVARD P. et CARASSO N., 1958 - Origine et ultrastructure des plaquettes vitellines de la Planorbe. Arch. Anat. Micr. 47, 211-234.
- 147 FAVARD P. et CARASSO N., 1964 - Etude de la pinocytose au niveau des vacuoles digestives des Ciliés Péritriches. J. Microscopie 3, n° 6, 671-696.
- 148 FAVARD-SERENO C., 1964 - Phénomène de pinocytose au cours de la vitellogenèse protéique chez le Grillon (Orthoptère). J. Microscopie, 3, 323-38.

- 149 FAVARD-SERENO C., 1968 - Evolution des structures nucléolaires au cours de la phase d'accroissement cytoplasmique chez le Grillon (Insecte, Orthoptère). *J. Microscopie*, 7, 205-230.
- 150 FAVARD-SERENO C., 1969 - Capture de polysaccharides par micropinocytose dans l'ovocyte du Grillon en vitellogenèse. *J. Microscopie* 8, n° 3, 401-414.
- 151 FAVARD-SERENO C., et DURAND M., 1963 - L'utilisation des nucléosides dans l'ovaire du Grillon et ses variations au cours de l'ovogenèse. *Developmental Biol.* 6, 2, 184-218.
- 152 FICQ A., 1955 - Etude autoradiographique du métabolisme de l'oocyte d'Asterias rubens au cours de la croissance. *Arch. Biol. Belge*, 66, 509-24.
- 153 FICQ A., 1961 - Contribution à l'étude du métabolisme cellulaire au moyen de la méthode autoradiographique. *Inst. Inter. Univ. Sc. Nucl. Bruxelles. Monographie n° 9*, 121 p.
- 154 FICQ A., 1968 - Synthesis and detection of DNA in early oogenesis. *Exp. Cell Res.* 53, 691-693.
- 155 FOLLENIUS E., 1965 - Cytologie fine des spermatocytes de l'épinoche (Gasterosteus aculeatus) : échange nucléo-cytoplasmique et formation d'amas de mitochondries. *C.R. Acad. Sc.*, 261, 4849-4852.
- 156 FOLLIOU R., 1968 - Les lamelles annélées intranucléaires des cellules du tissu germinal mâle avant la méiose chez Philaenus spumarius L. (Insecte Homoptère). *Z. Zellforsch.* 92, 1, 115-129.
- 157 FRANKLIN L.E., 1966 - An egg cell membrane derivative on the vitelline membrane of Annelide eggs. *Expt. Cell Res.* 43, n° 3, 673-5.
- 158 FRASCA J.M., AUERBACH O., PARKS V.R. et STOECKENIUS W., 1967 - Electron microscopic observations of bronchial epithelium. I Annulate lamellae. *Exper. Molec. Pathol.* 6, 261-273.
- 159 FRIEND D.S., 1965 - The fine structure of Brunner's glands in the mouse. *J. Cell Biol.* 25, 563-576.
- 160 FULLMER H.M., 1960 - Effect of peracetic acid on the enzymatic digestion of various mucopolysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.* 8, 113-121.
- 161 GABE M., 1968 - Techniques histologiques. Masson et Cie, ed. Paris
- 162 GAUDECKER B. Von, 1967 - RNA synthesis in the nucleolus of Chironomus thumi, as studied by high resolution autoradiography. *Z. Zellforsch.* 82, 536-557.
- 163 GEUSKENS M., 1963 - Accumulation nucléolaire d'acide ribonucléique (RNA) dans l'oocyte d'Astérie. *Exp. Cell Res.* 30, 322-330.
- 164 GEUSKENS M. et BERNHARD W., 1966 - Cytochimie ultrastructurale du nucléole. III Action de l'actinomycine D sur le métabolisme du RNA nucléolaire. *Exp. Cell Res.*, 44, 579-598.

- 165 GILBERT L.I., 1967 - Changes in lipid content during the reproductive cycle of Leucophaea maderae and effects of the juvenile hormone on lipid metabolism in vitro. Comp. Biochem. Physiol. 2I 237-257.
- 166 GOULD-SOMERO M.C. et SCHROEDER P.C., 1969 - Studies on oogenesis in the Polychaete Annelid Nereis grubei Kinberg. I. Some aspect of RNA synthesis. Biol. Bull. 136, 216-225.
- 167 GOURANTON J., 1967. Elaboration d'une mucoprotéine acide dans l'appareil de Golgi des cellules d'une portion de l'intestin moyen de divers Cercopidae. C.R. Acad. Sc. 264 D, 2584-2587.
- 168 GOURANTON J., 1969 a - Observations cytochimiques et ultrastructurales sur les cristaux intranucléaires de l'intestin moyen de la larve de Tenebrio molitor L. C.R. Acad. Sci. 268, 24, 2948-2951.
- 169 GOURANTON J., 1969 b - L'enveloppe nucléaire. Année Biol. 8, n° 7-8, 385-409.
- 170 GRANBOULAN P., 1965 - Comparison of emulsions and techniques in electron microscope autoradiography. Dans : "The use of radioautography in investigation protein synthesis", Leblond C.P. et Warren K.B., ed., Acad. Press, New-York, 4, 43-63.
- 171 GRANBOULAN N. et GRANBOULAN P., 1963 - Mise en évidence de chromatine intranucléolaire par autoradiographie et cytochimie ultrastructurale. J. microscopie 2, 32-33.
- 172 GRANBOULAN N. et GRANBOULAN P., 1964 - Cytochimie ultrastructurale du nucléole I. Mise en évidence de chromatine à l'intérieur du nucléole. Exp. Cell Res. U.S.A. 34, n° 1, 71-87.
- 173 GRANBOULAN N. et GRANBOULAN P., 1965 - Cytochimie ultrastructurale du nucléole. II Etude des sites de synthèse du RNA dans le nucléole et le noyau. Exp. Cell Res., 38, 604-619.
- 174 GRASSE P.P., 1957 - Ultrastructure, polarité et reproduction de l'appareil de Golgi. C.R. Acad. Sc. 245, 1278-1281.
- 175 GRESSON R.A.R. et THREADGOLD L.T., 1962 - Extrusion of nuclear material during oogenesis in Blatta orientalis. Quart. J. Micr., 103, 141-145.
- 176 GURDON J.B. et BROWN D.D., 1965 - Cytoplasmic regulation of RNA synthesis and nucleolus formation in developing embryos of Xenopus laevis. J. Mol. Biol. 12, 27-35.
- 177 HADEK R., 1963 - Submicroscopic Study of the Cortical Granules in the Rabbit Ovum. J. Ultrastructure Res., 8, 170-175.
- 178 HADEK R. et SWIFT H., 1962 - Nuclear extrusion and intracisternal inclusions in the rabbit blastocyst. J. Cell Biol. 13, 445-451.

- 179 HAGADORN I.R., 1962 - Functional correlates of neurosecretion in the Rhynchobdellid leech, Theromyzon rude. Gen. Comp. Endoc. 2, 516-40.
- 180 HAGADORN I.R., 1969 - Hormonal control of spermatogenesis in Hirudo medicinalis. II. Testicular response to brain removal during the phase of testicular maturity. Gen. Comp. End. 12-3, 469-78.
- 181 HAMA K., 1960 - The fine structure of some blood vessels of the earthworm Eisenia foetida. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 717-723.
- 182 HARRISON G.A., 1966 - Some observations on the presence of annulate lamellae in Alligator and sea gull adrenal cortical cells. J. Ultrastructure Res. 14, 158-166.
- 183 HASEGAWA K. et YAMASHITA O., 1965 - Studies on the mode of action of the diapause hormone in the silkworm, Bombyx mori L. VI. The target organ of the diapause hormone. J. Exp. Biol. 43, 271-77.
- 184 HAUENSCHILD C., 1959 - Hemmender Einfluß der Proventrikebregion auf Stolonsation und oocyten. Entwicklung beim Polychaeten Autolytus prolifer. Z. Naturforsch. 14 b, 87-89.
- 185 HAUENSCHILD C., 1963 - Postembryonale Entwicklungstenerung durch ein Gehirn. Hormon bei Pl. dumerilii. Verhandl. Dtsch. Zool. Gesellsch. (München) 3-120.
- 186 HAUENSCHILD C., 1964 - L'influence de l'hormone du cerveau sur le développement post-embryonnaire de Platynereis dumerilii. Ann. Endoc. 25, 49-56.
- 187 HAUENSCHILD C., 1965 - Hormone bei Nereiden und anderen niederen Wirbellosen. Zool. Jb. Abt. Allg. Zool. Physiol. Tiere. 71, n° 4, 511-44.
- 188 HAY E.D., 1968 - Structure and function of the nucleolar in developing cells. in "The nucleus" Dalton P.J. et Hagueneau F. ed. Acad. Press. New York - London.
- 189 HEBRARD C.N. et HEROLD R.C., 1967 - The ultrastructure of the cortical cytoplasm in the unfertilized egg and first cleavage zygote in Xenopus laevis. Exp. Cell Res., 46, 553-570.
- 190 HEINONEN L. et HALKKA O., 1964 - Early stages of oogenesis and metabolic DNA in the oocytes of the house cricket Acheta domesticus (L). Ann. Med. exp. Fenn. 45, 101-109.
- 191 HERLANT-MEEWIS H., 1959 - Phénomènes neurosécrétoires et sexualité chez Eisenia foetida. C.R. Acad. Sc. 248, 1405-07.
- 192 HERPIN R., 1925 - Recherches biologiques sur la reproduction et le développement de quelques Annélides Polychètes. Bull. Soc. Sc. Nat. Ouest France 4e série, 5, 1-250.
- 193 HERTIG A.T. et ADAMS E.C., 1967 - Studies on the human oocyte and its follicle. I. Ultrastructural and histochemical observations on the primordial follicle stage. J. Cell Biol. 34, n° 2, 647-76.

- 194 HIGHNAM K.C., LUSIS O. et HILL L., 1963 - The role of the Corpora allata during oocyte growth in the desert Locust, Schistocerca gregaria Forskål. J. Insect Physiol. 9, 587-596.
- 195 HILL L., 1965 - The incorporation of C14 glycine into the proteins of the fat body of the desert locust during ovarian development. J. Insect Physiol. 11, n° 12, 1605.
- 196 HINSCH G.W. et CONE M.V., 1969 - Ultrastructural observations of vitellogenesis in the spider crab, Libinia emarginata L. J. Cell Biol. 40, 2, 336-342.
- 197 HOLLAND N.D. et GIESE A.C., 1965 - An autoradiographic investigation of the purple sea urchin (Strongylocentrotus purpuratus). Biol. Bull. 128, 241-258.
- 198 HOLLANDE E., 1969 - Formation des hétérolysosomes et des cytolysosomes ds les glandes multifides d'Hélix pomatia L. : étude ultrastructurale des processus de réabsorption de glycoprotéines. C.R. Acad. Sci. 268, 341-344.
- 199 HORSTMANN E. RICHTER R., et ROOSEN-RUNGE E., 1966 - Zur elektronenmikroskopie der Kerneinschlüsse in menschlichen nebenhodene epithel. Z. Zellforsch. 69, 69-79.
- 200 HOURDRY J., 1968 - Données cytologiques et cytochimiques sur l'évolution des lysosomes. Année Biol. 7, fas. 9-10, 485-512.
- 201 HOWIE D.I.D., 1963 - Experimental evidence for the humoral stimulation of ripening of the gametes and spawning in Arenicola marina L. Gen. Comp. Endoc. 3, 660-668.
- 202 HRUBAN Z., SWIFT H., DUNN F.W. et LEWIS D.E., 1965 - Effects of - 3 - furylalanine on the ultrastructure of the hepatocytes and pancreatic acinar cells. Lab. Invest. 14, 70.
- 203 HSU W.S., 1962 - An electron microscopic study of the origin of yolk in the oocytes of the Ascidian Boltenia villosa Stimpson. Cellule 62, 145-163.
- 204 HSU W.S., 1963 - The nuclear envelope in the developing oocytes, of the tunicate, Boltenia villosa Z.Zellforsch. 58, n° 5, 660-78.
- 205 HSU W.S., 1967 - The origin of Annulate lamellae in the oocyte of the Ascidian, Boltenia villosa stimpson. Z. Zellforsch. 82, 3, 379-91.
- 206 HUANG.R.C. et BONNER J.M., 1962 - Histone, a suppressor of chromosomal synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48, 216-22.

- 207 HUMPHREYS W.J., 1962 - Electron microscope studies on eggs of
Mytilus edulis. J. Ultrastructure, Res. 7, 467-487
- 208 HUMPHREYS W.J., 1967 - The fine structure of cortical granule in egg and
gastrulae of Mytilus edulis. J. Ultrastructure Res., 17, 314-326.
- 209 HURWITZ J., FURTH J.S., MALANY M. et ALEXANDER M., 1962 - The rôle of deoxy-
ribonucleic acid in RNA synthesis. III The inhibition of the
enzymatic synthesis of RNA and DNA by actinomycin D and proflavin.
Proc. Natl. Acad. Sc. 48, 1222-1230.
- 210 ISHIMOTO K., MAEKAWA K. et SAWADA N., 1968 - Jelly substance extruded from
eggs of Nereis japonica Izuka. Memoirs College of Agriculture
Ehime University Vol. 13, 1-13.
- 211 ISHIZAKI H., 1965 - Electron microscope study of changes in the sub-cellular
organization during metamorphosis of fat body cell of Philosomia
cynthia ricini. (Lepidoptère). J. Insect Physiol. II, 845-856.
- 212 ITO S. et WINCHESTER R.J., 1963 - The fine structure of the gastric mucosa
in the bat. J. Cell Biol. 16, 541-577.
- 213 IZAWA M., ALLFREY V.G. et MIRSKY A.E., 1963 - The relationship between RNA
synthesis and loop structure in lampbrush chromosomes. Proc.
Natl. Acad. Sc. 49, 544-51.
- 214 IZQUIERDO L. et VIAL J.D., 1962 - Electron microscope observations on the
early development of the Rat. Z.Zellforsch. 56, 157-179.
- 215 JACOB J. et SIRLIN J.L., 1964 - Electron microscope studies on salivary gland
cells. IV The nucleus of Smittia parthenogenetica (Chironomidae)
with special reference to the nucleolus and the effects of
Actinomycin Thereon. J. Ultrastructure Res., 11, 315-328.
- 216 JAMIESON J.D. et PALADE G.E., 1967 a - Intracellular transport of secretory
proteins in the pancreatic exocrine cell. I. Role of the
peripheral elements of the Golgi complex. J. Cell Biol. 34,
577-596.
- 217 JAMIESON J.D. et PALADE G.E., 1967 b - Intracellular transport of secretory
proteins in the pancreatic exocrine cell. II. Transport to
condensing vacuoles and zymogene granules. J. Cell Biol. 34,
597-615.
- 218 JOHNSON J.M., 1969 - A study of nucleolar vacuoles in cultured tobacco cells
using radioautography, actinomycin D and electron microscopy.
J. Cell Biol. 43, 2, 1 et 2, 197-206.
- 219 JOLY P., 1948 - Les hormones sexuelles des Insectes. Bull. Biol. Fr. et Belg.
suppl. 33, 81-86.

- 220 JOLY P., 1958 - Les corrélations humorales chez les Acridiens. *Année Biol.* 34,
97-II8.
- 221 JOLY P., 1968 - Endocrinologie des Insectes. Monographie n° 7, MASSON et Cie,
ed. Paris, 344 p.
- 222 JONES K.W., 1965 - The role of the nucleolus in the formation of ribosomes.
J. Ultrastructure Res., 13, 257-262.
- 223 KARASAKI S., 1965 - Electron microscopic examination of the sites of nuclear
RNA synthesis during Amphibian embryogenesis. *J. Cell Biol.*,
26, 937-958.
- 224 KARASAKI S., 1968 - The ultrastructure and RNA metabolism of nucleoli in early
sea urchin embryos. *Exp. Cell Res.*, 52, 13-26.
- 225 KEMP N. et ISTOCK N.L., 1967 - Cortical changes in growing oocytes and in
fertilized or pricked eggs of Rana pipiens. *J. Cell Biol.*,
34, III-I22.
- 226 KESSEL R.C., 1963 - Electron microscope studies on the origin of annulate
lamellae in oocyte of Necturus. *J. Cell. Biol. U.S.A.* 19,
n° 2, 391-414.
- 227 KESSEL R.G., 1964 a - Intranuclear annulate lamellae in oocytes of the Tunicate,
Styela partita. *Z. Zellforsch.* 63, 37.
- 228 KESSEL R.G., 1964 b - Electron microscope on oocytes of an echinoderm, Thyone
briareus, with special reference to origine and structure of the
annulate lamellae. *J. Ultrastructure Res.* 10, n° 5-6, 498-514.
- 229 KESSEL R.G., 1965 - Intranuclear and cytoplasmic annulate lamellae in Tunicate
oocytes. *J. Cell Biol.* 24, 471-487.
- 230 KESSEL R.G., 1966 a - Electron microscope studies on the origin and maturation
of yolk in oocytes of the tunicate Ciona intestinalis. *Z. Zell-*
forsch., 71, 525-544.
- 231 KESSEL R.G., 1966 b - Some observations on the ultrastructure of the oocyte
of Thione briareus with special reference to the relationship
of the Golgi complex and endoplasmic reticulum in the formation
of yolk. *J. Ultrastructure Res.*, 16, 305-319.
- 232 KESSEL R.G., 1966 c - An electron microscope study of nuclear-cytoplasmic
exchange in oocytes of Ciona intestinalis. *J. Ultrastructure*
Res., 15, 181-196.
- 233 KESSEL R.G., 1968 a - An electron microscope study of differentiation and
growth in oocytes of Ophioderma panamensis. *J. Ultrastructure*
Res., 22, 63-89.
- 234 KESSEL R.G., 1968 b - Electron microscope studies on developing oocytes of
a Coelenterate Medusa with special references to vitellogenesis.
J. Morph. 126-2, p. 211.

- 235 KESSEL R.G., 1968 c - Mechanism of protein yolk synthesis and deposition in Crustacean oocytes. *Z. Zellforsch. Mikr. Anat.* 89, 1, 17-38.
- 236 KESSEL R.G., 1968 d - Fine structure of Annulate lamellae. *J. Cell Biol.* 36, 3, 658-664.
- 237 KESSEL R.G., 1968 e - Annulate lamellae. *J. Ultrast. Res. Suppl.* 10, 5-82.
- 238 KESSEL R.G. et BEAMS H.W., 1963 - Nucleolar extrusion in oocytes of Thyone briareus. *Exp. Cell Res.*, 32, 612-615.
- 239 KESSEL R.G. et BEAMS H.W., 1965 - An unusual configuration of the Golgi complex in pigment-producing "test" cells of the ovary of the Tunicate Styela. *J. Cell Biol.* 25, 55-67.
- 240 KESSEL R.G. et BEAMS H.W., 1968 - Intranucleolar membranes and nuclear-cytoplasmic exchange in young crayfish oocytes. *J. Cell Biol.* 39, 735-741.
- 241 KESSEL R.G. et BEAMS H.W., 1969 - Annulate lamellae and "Yolk Nuclei" in oocytes of the dragonfly, Libellula pulchella. *J. Cell Biol.* 42, 1, 185-201.
- 242 KIERSZENBAUM A.L., 1969 - Relationship between nucleolus and nuclear bodies in human mixed salivary tumors. *J. Ultrastructure Res.* 29, 5-6, 459-469.
- 243 KOECHLIN N., 1969 - Transfert de particules de thorotrast incluses dans les vésicules intracellulaires ou extracellulaires de la paroi néphridienne chez Sabella pavonina Savigny (Annélide Polychète). *C.R. Acad. Sc.* 268, 1321-23.
- 244 KOLLMANN M., 1908 - Recherches sur les leucocytes et le tissu lymphoïde des Invertébrés. *Ann. Sc. Nat. Zool.* Volume 8.
- 245 KOPAK M.J. et MATEYKO G.M., 1964 - Nucleolar chromosomes : structures, interaction, perspectives. *Adv. Cancer. Res.*, 8, 121-190.
- 246 KOULISH S., 1965 - Ultrastructure of differentiating oocytes in the Trematode Gorgoderina attenuata. I. The "Nucleoluslike" cytoplasmic body and some lamellar membrane systems. *Development. Biol.* 12, 248-268.
- 247 KRISHAN A., UZMAN B.G. et HEDLEY-WHYTE E.T., 1967 - Nuclear bodies : a component of cell nuclei in hamster tissues and human tumors. *J. Ultrastructure Res.* 19, 563-72.
- 248 KUKENTHAL W., 1885 - Über die lymphoiden Zellen der Anneliden. *Jena Z. Naturw.* 18, 319-364.
- 249 KUSA M., 1953 - Occurrence of a neutral mucopolysaccharide in the cortical alveoli of lamprey eggs. *J. Fac. Sc. Hokkaido Univ. Sér.* 6, 13, 455-457.

- 250 LAFONTAINE J.G. et CHOUINARD L.A., 1963 - A correlated light and electron
microscope study on the nucleolar material during mitosis in
Vicia faba. J. Cell Biol. 17, 167-201.
- 251 LANE L.N., 1966 - Uridine incorporation in Amphibian oocyte nucleoli. J.
Cell Biol., 31, 65 A.
- 252 LANE N.J., 1967 - Spheroidal and ring nucleoli in Amphibian oocytes.
Patterns of uridine incorporation and fine structural features.
J. Cell Biol. 35, 2, 421-434.
- 253 LANE N., CARO L., OTERO-VILARDEBO L.R. et GODMAN G.C., 1964 - On the site
of sulfatation in colomic goblet cells. J. Cell Biol., 21,
339-351.
- 254 LATTA H. et MAUNSBACH A.B., 1962 - The juxtaglomerular apparatus as studied
electron microscopically. J. Ultrastructure Res. 6, 542-561.
- 255 LECHENAULT H., 1967 - Proteines basiques cytoplasmiques au cours de l'ovo-
genèse d'Eisenia foetida (Oligochète) et de Lineus ruber
(Nemerte). C.R. Acad. Sci. 264, 751-754.
- 256 LECHENAULT H., 1968 - Etude cytochimique et ultrastructurale de l'ovocyte
d'Eisenia foetida (Sav.). Z. Zellforsch., 90, 96-112.
- 257 LEDUC E.H. et BERNHARD W., 1967 - Recent modifications of the glycol
methacrylate embedding procedure. J. Ultrastructure Res.,
19, 196-199.
- 258 LELOIR L.F., 1964 - Control of glycogen metabolism. In "Ciba Foundation
Symposium" Whelan and M.P. Cameron ed. London - J. et A.
Churchill Ltd, 68.
- 259 LE MOIGNE A., 1966 - Etude au microscope électronique de cellules d'embryons
de Polycelis (Turbellarié, Triclade) au début de leur déve-
loppement. C.R. Acad. Sc. 263, 550-553.
- 260 LE MOIGNE A., 1967 - Présence d'émissions nucléaires fréquemment associées
à des mitochondries dans les cellules embryonnaires de Planaires
C.R. Soc. Biol. 161, 508-511.
- 261 LENDER J. et LAVERDURE A.M., 1964 - La vitellogenèse et la sécrétion des
corpora allata de Tenebrio molitor (Coléoptère). C.R. Acad.
Sci. Fr. 258, n° 3, 1086-8.
- 262 LILLIE F.R., 1911 - Studies of fertilization in Nereis I The cortical change
in the egg. J. Morph., 22, 361-393.
- 263 LIMA de FARIA A. et BORUM K., 1962 - The period of DNA synthesis prior
to meiosis in the mouse. J. Cell Biol. 14, 381-388.

- 264 LISON L., 1960 - Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes.
Gauthier-Villards, ed. Paris (2 volumes).
- 265 LOCKE M. et COLLINS J.V., 1965 - The structure and formation of protein
granules in the fat body of an Insect. J. Cell. Biol. 26, 857-884.
- 266 LOCKE M. et COLLINS J.V., 1968 - Protein uptake into multivesicular bodies
and storage granules in the fat body of an Insect. J. Cell
Biol. 36, 453-483.
- 267 LUBET P., 1965 - Incidences de l'ablation bilatérale des ganglions cérébroïdes
sur la gamétogenèse et le développement du tissu conjonctif
chez la moule Mytilus galloprovincialis Lmk. (Mollusque
Lamellibranche). C.R.Soc. Biol. 159, 397-99.
- 268 LUSCHER M., 1968 - Hormonal control of respiration and protein synthesis
in the fat body of the cockroach Nauphoeta cinerea during
oocyte growth. J. Insect Physiol. 14, 4, 499-512.
- 269 MAC GREGOR H.C., 1967 - Pattern of incorporation of ³H uridine into
RNA of Amphibian oocyte nucleoli. J. Cell. Sci. 2, 145-150.
- 270 MAC GREGOR H.C., 1968 - Nucleolar DNA in oocytes of Xenopus laevis.
J. Cell Sci. 3, 437-444.
- 271 MAC INTOSH W.C., 1907 - Notes from the Gatty Marine Laboratory, St Andrews,
n° 28, on the reproduction of Nereis diversicolor O.F. Müller
Ann. Mag. Nat. Hist. Série 7, 20, 176-85.
- 272 MAGGIO R., MONROY A., RINALDI A.M. et VITTORELLI M.L., 1965 - Activation
"in vitro" des ribosomes des oeufs vierges d'oursin. C.R.
Acad. Sci. 260, 1293-1295.
- 273 MALECHA J., 1967a- Transformation hétéronéridienne et gamétogenèse chez
Nereis succinea Leuckart (Annélide Polychète) en culture
organotypique. C.R. Acad. Sci. 265, 613-15.
- 274 MALECHA J., 1967b- Etude en culture organotypique de l'influence endocrine
de la masse nerveuse péripharyngienne sur la maturation
testiculaire chez Hirudo medicinalis. C.R. Acad. Sci. 265,
1806-08.
- 275 MALECHA J., 1970 - Etude en culture organotypique, du contrôle hormonal
de la spermatogenèse chez Hirudo medicinalis (Hirudinée
Gnathobdelliforme). Gen. comp. Endoc. (sous presse).
- 276 MALONE T.E. et HISOAKA K.K., 1963 - A histochemical study of the formation
of deutoplasmic components in developing oocytes of the zebra-
fish, Brachydanio rerio. J. Morph. 112, 61-76.
- 277 MANCINI R.E., VILAR O., HEINRICH J.J., DAVIDSON O.W. et ALVAREZ B., 1963 -
Transference of circulating labeled proteins to the follicule
of the rat ovary. J. Histochem. Cytochem. 11 80-88.

- 278 MARCHESI V.T. et PALADE G.E., 1967 - The localization of Mg-Na-K- activated adenosine triphosphatase on red cell ghost membranes. J. Cell Biol., 35, 385-404.
- 279 MARINOZZI, 1964 - Cytochimie ultrastructurale du nucléole, RNA et protéines intranucléolaires. J. Ultrastructure Res. U.S.A. 10, n° 5-6, 433-56.
- 280 MARINOZZI V., 1967 - Réaction de l'acide phosphotungstique avec la mucine et les glycoprotéines des plasmamembranes. J. Microscopie, 6, 68 a.
- 281 MARINOZZI V., 1968 - Phosphotungstic acid (PTA) as a stain for polysaccharides and glycoproteins in electron microscopy. IV th. Eur. Reg. Conf. on Electron Microscopy, Rome, Steve Bocciarelli D., ed., II, 55-56.
- 282 MARINOZZI V., et BERNHARD W., 1963 - Présence dans le nucléole de deux types de ribonucléoprotéines morphologiquement distinctes. Exp. Cell Res., 32, 595-598.
- 283 MATTEI C., BOISSON C. et MATTEI X., 1967 - Présence de lamelles annelées dans les spermatoocytes de Lycodontis afer (Muraenidae). C.R. Soc. Biol. 161, 1761-1767.
- 284 MAZIA D., HAYASHI T. et YUDOWITCH K., 1947 - Fiber structure in chromosomes. Cold spring Harbor Symp. on Quant. Biol. Frish. L., Ed., 12, 122.
- 285 MERKOW L. et LEIGHTON J., 1966 - Increased numbers of annulate lamellae in myocardium of chick embryos incubated at abnormal temperatures. J. Cell Biol. 22, 127-137.
- 286 MERRIAM R.W., 1959 - The origin and fate of annulate lamellae in maturing sand dollar eggs. J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 117.
- 287 MERRIAM R.W., 1969 - The intracellular distribution of the free amino acid pool in frog oocytes. Exp. Cell Res., 56, 2-3, 259-264.
- 288 MILLER O.L., 1965 - Structure and composition of peripheral nucleoli of Salamander oocytes. N. C.I. Monog. 23, p. 53.
- 289 MILLER F., PALADE G.E., 1964 - Lytic activities in renal protein absorption droplets. J. Cell Biol. 23, p. 519.
- 290 MILLONIG G., 1966 - The morphological changes of the nucleolus during oogenesis and embryogenesis of Echinoderms. 6e congrès Int. M.E. Kyoto, Ryozi Uyeda Ed. p. 435.
- 291 MILLONIG G., BOSCO M. et GIAMBERTONE L., 1968 - Fine structure analysis of oogenesis in sea urchins. J. Exp. Zool. 169, 293-314.

- 292 MONNE L. et SLAUTTERBACK D.B., 1950 - Differential staining of various
polysaccharides in sea urchin eggs. *Exp. Cell Res.*, I, 477-91.
- 293 MONNERON M. et BERNHARD W., 1966 - Action de certaines enzymes sur des
tissus inclus en épon *J. Microscopie*, 5, 697-714.
- 294 MONNERON M. et MOULE Y., 1969 - Critical evaluation of specificity in
electron microscopical radiography in animal tissues.
Exp. Cell. Res., 56, 179-193.
- 295 MONROY A. et TOLIS H., 1964 - Uptake of radioactive glucose and amino
acids and their utilization for incorporation into proteins
during maturation and fertilization of the eggs of Asterias
forbesii and Spisula solidissima. *Biol. Bull.* 126, 456-66.
- 296 MORATO M.J.X., 1964 - Le nucléole de l'oocyte I de la chatte étudié au
microscope électronique. *Bull. Assoc. Anat.* 49e réunion
1243-1244.
- 297 MORITA M., BEST J.B. et NOEL J., 1969 - Electron microscopic studies
of planarian regeneration. I. Fine structure of neoblast in
Dugesia dorotocephala. *J. Ultrastructure Res.*, 27, 7-23.
- 298 MORRE D.J. et MOLLENHAUER H.H., 1964 - Isolation of the Golgi apparatus
from plant cells. *J. Cell Biol.* 23, 295-305.
- 299 MORRE D.J., MOLLENHAUER H.H. et CHAMBERS J.E., 1965 - Glutaraldehyde
stabilisation as an aid to Golgi apparatus isolation. *Exp.
Cell Res.*, 38, 672-675.
- 300 MORRE D.J. et VANDERWOUDE W.J., 1966 - Studies on the metabolism of Choline
by plant Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 31, 78 A.
- 301 NADLER N.J., 1953 - The quantitative estimation of radioactive isotopes
by radioautography. *Am. J. Roentgenol.* 70, 814-823.
- 302 NAGABHUSHANAM R., 1964 - Effect of removal of neurosecretory cells on
spawning in the Mussel, Modiolus demissus (Mollusca Lamelli-
branchiata). *Curr. Sc.* 33, 215-216.
- 303 NAPOLITANO L., 1963 - Cytolysosomes in metabolically active cells. *J. Cell
Biol.* 18, 478-481.
- 304 NEUTRA M. et LEBLOND C.P., 1966 - Synthesis of the carbohydrate of mucus
in the Golgi complex as shown by electron microscope radio-
autography of goblet cells from rat injected with glucose ³H
J. Cell Biol. 30, 119-136.
- 305 NICANDER L., 1964 - Fine structure and cytochemistry of nuclear inclusions
in the dog epididymis. *Exp. Cell. Res.* 34, 533-41.
- 306 NORDBACK K., 1956 - On the oogenesis and fertilization of the Serpulid
Hydroides norvegica (Gunnerus). *Nytt. Mag. Zool.* 4. 121-123.

- 307 NØRREVANG A., 1965 - Oogenesis in Priapulus caudatus Lamark. An electron
microscopical study correlated with light microscopical and
histochemical finding. Vid. Medd. Dansk. Naturhist. Foren.
128, 1-83.
- 308 NØRREVANG A., 1968 - Electron microscopic morphology of oogenesis. Intern.
Rev. Cytology. 28, 113-186.
- 309 NOVIKOFF A.B., 1961 - Lysosomes and related particles in "The cell". J.
Brachet et A.E. Mirsky ed. Academic Press, NEW YORK, 2, 423-88.
- 310 NOVIKOFF A.B., ESSNER E., GOLFISCHER G. et HEUS M., 1962 - Nucleosidephos-
phatase activities of cytomembranes. In "The interpretation
of ultrastructure", R.J.C. HARRIS éd. Acad. Press. N.Y., 149-92.
- 311 NOVIKOFF A.B., et SHIN W.Y., 1964 - The endoplasmic reticulum in the Golgi
zone and its relations to microbodies Golgi apparatus and
autophagic vacuoles in rat liver cells. J. Microscopie Fr. 3
187-206.
- 312 ODHIAMBO T.R., 1967 - The fine structure and histochemistry of the fat
body in the locust Schistocerca gregaria. J. Cell Sci. 2,
235-242.
- 313 OVTRACHT L., 1967 - Ultrastructure des cellules sécrétrices de la glande
multifide de l'Escargot. J. Microscopie, 6, 773-790.
- 314 PALEKAR S. et BERNHARD W., 1968 - Coloration préférentielle de structures
cellulaires contenant du RNA. J. Microscopie, 7, 48 a.
- 315 PAN M.L., BELL W.J. et TELFER W.H., 1969 - Vitellogenic blood protein
synthesis by Insect fat body. Science 165, 3891-393.
- 316 PANGE W.R. et KESSEL R.G., 1967 - Soluble proteins and quantitative analysis
of protein and RNA during oogenesis in Necturus maculosus.
Exp. Cell Res. 51, 313-322.
- 317 PANOUSE J.B., 1943 - Influence de l'ablation du pédoncule oculaire sur
la croissance de l'ovaire chez la crevette Leander serratus.
C.R. Acad. Sci. 217, 553-555.
- 318 PASTEELS J.J., 1965 a - Etude au Microscope électronique de la réaction
corticale. I La réaction corticale de fécondation chez
Paracentrotus et sa chronologie. II La réaction corticale de
l'oeuf vierge de Sabellaria alveolata. J. Embryol. exper.
Morph. 13, n° 3, 327-39.
- 319 PASTEELS J.J., 1965 b - Etude au microscope électronique de la vésicule
germinative et de son flétrissement dans l'oeuf de Barnea
gandida (Mollusque Bivalve). Arch. Biol. Belg. 76, n° 1, 5-24.

- 320 PASTEELS J.J., 1966 a - Les corps multivésiculaires de l'oeuf de Barnea candida (Mollusque Bivalve) étudiés au microscope électronique. Activité phosphatasique acide et accumulation de rouge neutre. J. Embryol. exp. Morphol. 16, part. 2, 301-310.
- 321 PASTEELS J.J., 1966 b - La réaction corticale de l'oeuf de Nereis diversicolor étudiée au microscope électronique. Acta Embryol. Morph. Exp. 6, 155-163.
- 322 PASTEELS J.J., 1969 a - Excrétion de phosphatase acide par les cellules mucipares de la branchie de Mvtilus edulis L. Etude au microscope électronique. Z. Zellforsch., 102, 4, 594-600.
- 323 PASTEELS J.J., 1969 b - L'activité phosphatasique acide, étudiée au microscope électronique dans les oeufs de Barnea candida (Mollusque, Bivalve). Arch. Biol. Belg. 80, 1-17.
- 324 PASTEELS J.J. et de HARVEN E., 1962 - Etude au microscope électronique du cortex de l'oeuf de Barnea candida (Mollusque Bivalve) et son évolution au moment de la fécondation, de la maturation et de la segmentation. Arch. Biol. Belg., 73, 465-90.
- 325 PASTEELS J.J. et de HARVEN E., 1963 - Etude au microscope électronique du cytoplasme de l'oeuf vierge et fécondé de Barnea candida (Mollusque Bivalve). Arch. Biol. Belg, 74, 3, 415-437.
- 326 PEARSE A.G.E., 1960 - In "Histochemistry Theoretical and Applied". J.A. Churchill; Ltd, London, 623-625.
- 327 PEASE D.C., 1966 - Polysaccharides associated with the exterior surface of epithelial cells : kidney, intestine, brain. J. Ultrastructure Res., 15, 555-588.
- 328 PELLUET D., LANE N.J., 1961 - The relation between neurosecretion and cell differentiation in the ovotestis of slugs (Gasteropoda, Pulmonata). Canad. J. Zool. 39, 789-805.
- 329 PENMAN S., SMITH L. et HOLTZMAN E., 1966 - Ribosomal RNA synthesis and processing in a particular site in the Hela cell nucleus, Science, 154, 786-789.
- 330 PERRY M., 1967 - Identification of glycogen in thin sections of Amphibian embryos. J. Cell Sci., 2, 257-264.
- 331 PERRY R.P., 1965 - The nucleolus and the synthesis of ribosomes. Natl. Cancer Inst. Monograph., 18, 325-340.
- 332 PERRY R.P., 1969 - Nucleoli : the cellular sites of ribosome production. In "Handbook of molecular Cytology". A. LIMA de FARIA ed. NORTH-HOLLAND Cie, Amsterdam-London, 620-639.

- 333 PERRY R.P. et ERRERA M., 1960 - The influence of nucleolar ribonucleic acid metabolism on that of the nucleus and cytoplasm. In "The cell nucleus". J.S. Mitchell, Butterworth, ed. 24-29 p., London and Washington.
- 334 PETERS T. jr. et ASHLEY C.A., 1967 - An artefact in radioautography due to binding of free amino acids to tissues by fixation. J. Cell Biol., 33, 1, 53-60.
- 335 PETERS H. et CRONE M., 1968 - DNA synthesis in oocytes of Mammals. In "La physiologie de la reproduction chez les Mammifères". Edition du C.N.R.S. Paris, p. 160-170.
- 336 PHILLIPS D.M. et SWIFT H., 1965 - Cytoplasmic fine structure of Sciara salivary glands. J. Cell Biol., 27, 395-409.
- 337 PIATIGORSKY J. et TYLER A., 1967 - Radioactive labeling of RNA's of sea urchin eggs during oogenesis. Biol. Bull., 133, 229-244.
- 338 POLLACK S.B. et TELFER W.H., 1969 - RNA in Cecropia moth ovaries : sites of synthesis transport and storage. J. Exp. Zool. 170, 1, 1-23.
- 339 PORCHET M., 1966 - Etude de la maturation naturelle et expérimentale des ovocytes de Perinereis cultrifera Gr. D.E.A., Faculté des Sciences de Lille.
- 340 PORCHET M., 1967 - Rôle des ovocytes submatures dans l'arrêt de l'inhibition cérébrale chez P. cultrifera G. (Annélide polychète). C.R. Acad. Sci. 265, 1394-1396.
- 341 PORCHET M., 1969 - Interactions entre l'activité endocrine du cerveau et l'état génital, chez Perinereis cultrifera Grube (Annélide polychète). Thèse de 3e cycle, Université de Lille.
- 342 PORCHET M. et DHAINAUT A., 1969 - Formation et migration des mucopolysaccharides au cours de l'ovogenèse de Perinereis cultrifera Grube et Nereis pelagica L. (Annélides Polychètes). Etude histochimique et ultrastructurale. C.R. Soc; biol. 163, 418-421.
- 343 PORCHET-HENNERE E., 1969 - Corrélations entre le cycle de Coelotropha durchoni (Coccidie, Eimeriidae) et celui de son hôte Nereis diversicolor (Annélide Polychète). Etude expérimentale. Z. Parasitenk. 31, 299-314.
- 344 POTSWALD H.E., 1969 - Cytological observations on the So-called neoblast in the Serpulid Spirorbis. J. Morphol. 128, 241-260.
- 345 PRENANT M., 1922 - Sur une nouvelle série de pigments animaux. Bull. Soc. Zool. Fr. 47, p. 140.

- 346 RAMBOURG A., 1967 - Détection des glycoprotéines en microscopie électronique : coloration de la surface cellulaire et de l'appareil de Golgi par un mélange acide chromique-phosphotungstique. C.R. Acad. Sc., 265 D, I426-I428.
- 347 RAMBOURG A., 1968 - Détection des glycoprotéines en microscopie électronique à bas pH. IV th Eur. Reg. Conf. on Electron Microscopy, Rome Steve-Bocciarelli D, ed. II, 57-58.
- 348 RAMBOURG A., 1969 - Localisation ultrastructurale et nature du matériel coloré au niveau de la surface cellulaire par le mélange chromique-phosphotungstique. J. Microscopie 8, 325-342.
- 349 RAVEN C.R., 1961 - Oogenesis : the storage of developmental information. Pergamon Press, London, 274 p.
- 350 REBHUN L.I., 1956 - Electron microscopy of basophilic structure of some Invertebrate oocytes. I. Periodic lamellae and the nuclear membrane. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 93-104.
- 351 REBHUN L.I., 1961 - Some electron microscope observations on membranous basophilic elements of Invertebrate eggs. J. Ultrastructure Res., 5, 208-225.
- 352 REBHUN L.I., 1962 - Electron microscope studies on the vitelline membrane of the surf Clam, Spisula solidissima. J. Ultrastructure Res., 6, 107-122.
- 353 REDMAN C.M. et SABATINI D.D., 1966 - Transfer of peptides across microsomal membranes in vitro. Federation Proc. 25, 216.
- 354 REDMAN C.M., SIEKEVITZ P. et PALADE G.E., 1966 - Synthesis and transfer of amylase in pigeon pancreatic microsomes. J. Biol. Chem. 241, 1150.
- 355 REVEL J.P. et ITO S., 1965 - The surface components of cells. in "The specificity of cell surfaces". B.D. DAVIS and L. WARREN Ed. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.
- 356 REYNOLDS E.S., 1963 - The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208-213.
- 357 ROBERTSON J.D., 1959 - The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. Biochem. Soc. Symp. (Cambridge, Engl.) 16, 3.
- 358 ROCHE J., BESSIS M. et THIEFY J.P., 1960 - Etude au microscope électronique d'hémoglobines et de chlorocruorines d'Annélides. C.R. Soc. Biol. 154, 949-952.

- 359 ROMIEU M., 1923 - Recherches histophysiologiques sur le sang et sur le
corps cardiaque des Annélides Polychètes. Contribution à
l'histologie comparée du sang. Arch. Morphol. Gener. Exp. 336 p.
- 360 ROSS M.H., 1962 - Annulate lamellae in the adrenal cortex of the fetal
rat. J. Ultrastructure Res., 7, 373-382.
- 361 ROTH T.F. et PORTER K.R., 1964 - Yolk protein uptake in the oocyte of the
Mosquito Aedes aegypti, L. J. Cell Biol. 20, 313-332.
- 362 RUNNSTROM J., 1966 - The vitelline membrane and cortical particles in sea
urchin eggs and their function in maturation and fertilization.
In Advances in morphogenesis, 5, 221-325.
- 363 RUTHMANN A., 1958 - Basophilic lamellar systems in the Crayfish spermatocytes.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 267-274.
- 364 SALPETER M.M. et BACHMANN L., 1965 - Assessment of technical steps in
electron microscope radioautography. Dans "The use of radioautography in investigation protein synthesis". Leblond C.P. et
WATTEN K.B., ed., Acad. Press, New York, 4, 23-41.
- 365 SANCHEZ S., 1969 - Formation et rôle des nucléoles des ovocytes de Triturus
helveticus Raz - Etude autoradiographique et ultramicroscopique.
J. Embryol. Exp. Morphol., 22, 1, 127-43.
- 366 SAUSSEY M., 1966 - Contribution à l'étude des phénomènes de diapause et
de régénération caudale chez Allobophora icterica Sav. (Oligochète Lombricien). Thèse Caen, Mém. Soc. Linn. de Normandie
Nouv. Sér. Sect. Zool. 3, II-158.
- 367 SAUZIN M.J., 1968 - Présence d'émissions nucléaires dans les cellules
différenciées et en différenciation de la planaire adulte
Dugesia gonocephala. C.R. Acad. Sc. 267, II46-II48.
- 368 SAWADA N., NODA Y. et OCHI O., 1968 - An electron microscope study on the
oogenesis of Golfingia ikedai. Memoirs of the Ehime Univ.
Science, Série B, Vol. VI, I, 25-39.
- 369 SCHARRER B. et WURZELMANN S., 1969 - Ultrastructural study on nuclear-
cytoplasmic relationships in oocytes of the African Lungfish,
Protopterus aethiopicus. Z. Zellforsch. 96, 325-343.
- 370 SCHJEIDE O.A., WILKENS M., MC CANDLESS R.G., MUNN R., PETERSON M. et
CARLSEN E., 1963 - Liver synthesis, plasma transport and structural alterations accompanying passage of yolk protein. Amer. Zool.
3, 167-184.
- 371 SCHMALBECK J. et ROHR H., 1967 - Die Mukopolysaccharid Synthese in ihrer
Beziehung zur Eiweiß-synthese in der Brunnerschen Drüse der
Maus (Electronenmikroskopisch-Autoradiographische Untersuchung
mit ³H Glukose). Z. Zellforsch., 80, 329-344.

- 372 SCHMIDT E.L. et WILLIAMS C.M., 1953 - Physiology of Insect diapause. V. Assay of the growth and differentiation hormone of Lepidoptera by method of tissue culture. Biol. Bull. 105, 174-187.
- 373 SCHOEFL G.I., 1964 - The effect of actinomycin D on the fine structure of the nucleolus. J. Ultrastructure Res., 10, 224-243.
- 374 SCHROEDER P.C., 1967 a - Morphogenesis of epitokous setae during normal and induced metamorphosis in the Polychaete Annelid Nereis Grubei (Kinberg). Biol. Bull. 133, 426-437.
- 375 SCHROEDER P.C., 1967 b - Eleocyte nucleolus formation in relation to development of female Nereis Polychaete. Amer. Zool. 7, 724.
- 376 SCHROEDER P.C., 1970 - Studies on oogenesis in the Polychaete Annelid Nereis grubei (Kinberg). II The occurrence of multiple size classes. III Oocyte growth rates. Biol. Bull. (sous presse).
- 377 SENTEIN P. et HUMEAU C., 1968 - Origine mitochondriale du vitellus dans l'ovocyte de Triturus helveticus Raz. C.R. Acad. Sci. 267, 7, 753-54.
- 378 SENTEIN P. et REBOULIN P., 1969 - Origine mitochondriale du vitellus dans l'ovocyte d'Esox lucius L. C.R. Acad. Sci. 268, 2, 345-347.
- 379 SICHEL G., 1966 - Modificazioni ultrastrutturali dell' ooplasma, in rapporto alla vitellogenesi, in Mercierella enigmatica Fauvel (Annelida Polychaeta). Boll. Sed. Acad. Gioenica Sci. nat. 7, 21.
- 380 SIDDEBOTTOM E. et HARRIS H., 1969 - The role of the nucleolus in the transfer of RNA from nucleus to cytoplasm. J. Cell. Sci. 5, 2, 351-65.
- 381 SIEKEVITZ P. et PALADE G.E., 1960 - Cytochemical studies on the pancreas of the Guinea pig. VI. Release of enzymes and ribonucleic acid from ribonucleoprotein particles. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 631-44.
- 382 SIMAR L. et LEMAIRE R., 1966 - Etude ultrastructurale des inclusions nucléaires de l'épididyme du chien. C.R. Acad. Sci. 262, 1455-57.
- 383 SIMARD R. et BERNHARD W., 1967 - A heat-sensitive cellular function located in the nucleolus. J. Cell Biol. 34, 61-76.
- 384 SINHA, 1960 - Cité par A. HOLLANDE in "Biologie Générale". Masson et Cie ed. (1966).
- 385 SIRLIN J.L. et JACOB J., 1960 - Cell function in the ovary of Drosophila. Exp. Cell Res. 20, 283-293.

- 386 SJOSTRAND F.S., 1962 - In "Ciba Foundation Symposium of the Exocrine
Pancreas". (A.W.S. de REUK and M.P. CAMERON, eds) p. I-22,
Churchill, London.
- 387 SOTELO J.R. et PORTER K.R., 1959 - An electron microscope study of the
Rat ovum. J. Biochem. Biophys. Cytol. 5, 327-342.
- 388 SPIRIN A.S., 1966 - On "masked" forms of messenger RNA in early embryoge-
nesis and in other differentiating systems. In "Current topics
in developmental biology". Monroy and Moscona, ed., Acad.,
Press, I-38.
- 389 STADHOUDERS A.M., 1965 - Particulate glycogen, a correlated electron-micros-
copic and biochemical study. Thesis Nijmegen, 1-160.
- 390 STAY B., 1965 - Protein uptake in the oocytes of the Cecropia moth. J. Cell
Biol., 26, 49-62.
- 391 STERN H. et HOTTA Y., 1969 - Biochemistry of meiosis. In "Handbook of
molecular cytology". A. Lima de Faria ed., Nth Holland publish
Cie, Amsterdam - London.
- 392 STEVENS B.J. et SWIFT H., 1966 - RNA transport from nucleus to cytoplasm
in Chironomus salivary gland. J. Cell Biol. 31, 55-77.
- 393 STREIFF W., 1967 - Recherches cytologiques et endocrinologiques sur le
cycle sexuel de Calyptra sinensis L. Mollusque Prosobranchie
hermaphrodite protandre. Thèse de Sciences, Toulouse, n° 294,
261 p.
- 394 SUSKIN R.G., 1965 - Autoradiographic and cytochemical evidence for synthesis
of a lysine-containing ribonucleoprotein in nucleoli inhibited
by actinomycin D. J. Cell Biol. 24, 309-316.
- 395 SUTTON J.S. et WEISS L., 1966 - Transformation of monocytes in tissue
culture into macrophages, epithelioid cells, and multinucleated
giant cells. J. Cell Biol. 28, n° 2, 303-332.
- 396 SWIFT H., 1956 - The fine structure of annulate lamellae. J. Biophys. Biochem.
Cytol. 2 (suppl.) 415-418.
- 397 SZOLLOSI D., 1962 - Cortical granules : a general feature of Mammal eggs.
J. reproduction Fertility, 4, 223-224.
- 398 SZOLLOSI D., 1965 - Extrusion of nucleoli from pronuclei of the Rat.
J. Cell Biol. 25, 545-562.
- 399 TAKASHIMA Y., 1962 - On the ultrastructure of the vitelline membrane and
fertilization membrane of Nereis eggs (Nereis japonica).
Medical J. of Osaka University 12, 203-216.
- 400 TAKASHIMA R., TAKASHIMA Y., et NODA Y., 1966 - Ultrastructure of the cortical
granules and the cortical reaction of sea urchin eggs. In 6 th
Internation. Congr. Electron. Microsc., Kyotot, Ueyda R., ed.,
Maruzen Co. Tokyo, II, 647-648.

- 401 TAKEUCHI S., 1969 - Endocrinological studies on spermatogenesis in the
silkworm Bombyx mori. Develop. Growth and Different. II,
1, 1-7.
- 402 TASHIRO Y., MATSUURA S., MORIMOTO T. et NAGATA S., 1968 - Extrusion of
nuclear materials into cytoplasm in the posterior silk gland
cells of silkworm Bombyx mori. J. Cell Biol., 36, C 5 à C 10.
- 403 TELFER W.H. et MELIUS M.E. Jr., 1963 - The mechanism of blood protein
uptake by Insectes oocytes. Amer. Zoologist., 3, n° 2, 185-91.
- 404 THIERY J.P., 1967 - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines
en microscopie électronique. J. Microscopie, 6, 987-1018.
- 405 THOMAS C., 1969 - Etude cytochimique, au microscope électronique, des
structure à ARN et du glycogène dans le cytoplasme des oocytes
de Xenopus laevis. J. Embr. exp. Morph., 21, 165-176.
- 406 TIXIER-VIDAL A., FISKE S., PICART R. et HAGUENAU F., 1965 - Autoradiographie
au microscope électronique de l'incorporation de leucine tritiée
par l'hypophyse du canard en culture organotypique. C.R. Acad.
Sci. 261, 1133-1136.
- 407 TRUMP B.F., GOLDBLATT P.J. et STOWELL R.E., 1965 - Studies on mouse liver
necrosis "in vitro". Ultrastructural and cytochemical altera-
tions in hepatic parenchymal cell nuclei. Lab. Invest. 14,
1969-1999.
- 408 TWEEDELL K., 1966 - Oocyte development and incorporation of H³-Thymidine
and H³-Uridine in Pectinaria (Cestiniodes) gouldii. Biol.
Bull., 131, 516-538.
- 409 ULRICH E., 1969 - Etude des ultrastructures au cours de l'ovogenèse d'un
Poisson Téléostien, le Danio Brachydanio rerio (Hamilton-
Buchanan). J. Microscopie 8, n° 4, 447-78.
- 410 VAN DEN BROEK C.S.H. et TATES A.D., 1961 - The incorporation of I⁴ C
adenine into the oocyte of Asellus aquaticus as studied by
autoradiography. Exp. Cell Res., 24, 201-219.
- 411 VAN GANSEN-SEMAL P., 1956 - Les cellules chloragogènes des Lombriciens.
Bull. Biol. Fr. et Belg. 90, 335-356.
- 412 VAN GANSEN P., 1962 - Plexus sanguin du Lombricien Eisenia foetida : étude
au microscope électronique de ses constituants conjonctifs
et musculaires. J. Microscopie 5, 363-376.
- 413 VAN GANSEN P., 1966 - Ultrastructure comparée du cytoplasme périphérique
des oocytes murs et des oeufs vierges de Xenopus laevis
(Batracien Anoure). J. Morph. exp. Morph., 15, 355-364.

- 414 VAN GANSEN P. et SCHRAM A., 1968 - Ultrastructure et cytochimie ultrastruc-
turale de la vésicule germinative et du cytoplasme périnucléaire
de l'oocyte mûr de Xenopus laevis. J. Embryol. exp. Morph.
20, 3, 375-89.
- 415 VAN GANSEN P. et SCHRAM A., 1969 - Etude des ribosomes et du glycogène des
grastrules de Xenopus laevis par cytochimie ultrastructurale.
J. Embryol. exp. Morph. 22, 1, 69-98.
- 416 VASQUEZ-NIN G.H. et SOTELO J.R., 1967 - Electron microscope study of the
atretic oocytes of the rat. Z. Zellforsch. 80, 518-533.
- 417 VERHEY C.A. et MOYER F.H., 1967 - Fine structural changes during sea urchin
oogenesis. J. Exp. Zool., 164, 195-225.
- 418 VINCENT W.S., 1965 - The nucleolus in "Genetics to day". S.J. Geerts ed. Vol.
2, 343-358, Mac Millan, Pergamon Press, NEW YORK.
- 419 VOROBYEV V.I., 1969 - The effect of histones on RNA and protein synthesis
in sea urchin embryos at early stages of development. Exp.
Cell Res. 55, 2, 168-170.
- 420 VRENSEN G.F.J.M. et KUYPER C.M.A., 1969 - Involvement of rough endoplasmic
reticulum and ribosomes in early stages of glycogen repletion
in rat liver. J. Microscopie 8, 5, 599-614.
- 421 WACHSTEIN M. et MEISEL E., 1957 - Histochemistry of hepatic phosphatases
at a physiologic pH with special reference to the demonstration
of bile canaliculi. Amer. J. Clin. Pathol. 27, 13-23.
- 422 WARD R.T., 1962 - The origin of protein and fatty yolk in Rana pipiens.
II Electron microscopical and cytochemical observations of young
and mature oocytes. J. Cell Biol., 14, 309-341.
- 423 WARD R.T. et WARD E., 1968 - The origin and growth of cortical granules
in the oocytes of Rana pipiens. J. Microscopie, 7, 1021-30.
- 424 WEBER A., WHIPP S., USENIK E. et FROMMES S., 1964 - Structural changes in the
nuclear body of the adrenal zona fasciculata of the calf
following the administration of ACTH. J. Ultrastructure Res.
11, 564-76.
- 425 WEINBERG R.A., LOENING U., WILLEMS M. et PENMAN S., 1967 - Acrylamide
gel electrophoresis of Hela cell nucleolar RNA. Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S. 58, p. 1088.
- 426 WELLS M.J. et WELLS J., 1959 - Hormonal control of sexual maturity in
Octopus. J. exp. Biol. 36, 1-33.
- 427 WETZEL M.G. et WETZEL B.K., 1966 - Ultrastructural localization of acid
mucosubstances in the mouse colon with iron-containing stains.
J. Cell Biol. 30, 299-315.

- 428 WIENS A.W. et GILBERT L.I., 1967 - Variations in the glycogen content of fat body, ovary and embryo during the reproductive cycle of Leucophaea maderae. J. Insect Physiol., 13, 4, 587-594.
- 429 WISCHNITZER S., 1967 - Intramitochondrial transformations during oocyte maturation in the mouse. J. Morph. 121, I, p. 29.
- 430 WORLEY L.G. et MORIBER L.G., 1961 - The origin of protein yolk from the Golgi apparatus in Gastropods. Trans. N.Y. Acad. Sci. 23, 352-356.
- 431 YAMAMOTO T.O., 1962 - Mechanism of breakdown of cortical alveoli during fertilization in the medaka, Oryzias latipes. Embryologia, 7, 228-251.
- 432 ZAHND J.P. et PORTE A., 1966 - Signes morphologiques de transfert de matériel nucléaire dans le cytoplasme des ovocytes de certaines espèces de Poissons. C.R. Acad. Sc., 262, 1977-1978.
- 433 ZALOKAR M., 1965 - Etude de la formation de l'acide ribonucléique et des protéines chez les Insectes. Rev. Suisse Zool. 72, 241-261.
- 434 ZAMBONI L., MISHELL D.R., BELL J.H. et BACA M., 1966 - Fine structure of the human ovum in the pronuclear stage. J. Cell Biol. 30, 579-600.
- 435 ZEIGEL R.F. et DALTON A.J., 1962 - Speculations based on the morphology of the Golgi system in several types of protein-secreting cells. J. Cell Biol., 15, 45-54.

