

50376  
1972  
103

50376  
1972  
103

N° d'ordre : 327

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE

CENTRE DE RECHERCHES SUR LA CELLULE

LABORATOIRE ASSOCIE AU C.N.R.S. n° 148

---

THESE DE TROISIEME CYCLE

(Biologie Cellulaire)

---

Marc BERTOUT

EVOLUTION DU NUCLEOLE EN FONCTION DU TAUX HORMONAL  
AU COURS DE L'OVOGENESE DE NEREIS DIVERSICOLOR O.F. MÜLLER  
(ANNELIDE POLYCHETE)



Présentée le 29 juin 1972  
devant la Commission d'examen

Jury d'examen

MM. M. DURCHON Président  
A. DHAINAUT Rapporteur  
E. VIVIER Examineur

## AVANT-PROPOS

Je suis très heureux d'exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur DURCHON qui m'a accepté dans son équipe et qui, malgré ses lourdes charges, n'a cessé de suivre ce travail.

**Monsieur** DHAINAUT m'a guidé dans mes recherches avec une grande gentillesse et une disponibilité sans défauts. Je ne peux dire combien sa connaissance approfondie de l'ovogénèse des Néréidiens et sa maîtrise des techniques de la microscopie électronique m'ont été précieuses. Je le prie de croire à ma profonde gratitude.

Il m'est également très agréable de remercier Monsieur le Professeur VIVIER qui a accepté de juger ce travail.

Mes remerciements vont également à Madame MEUNIER et à Mademoiselle DROUX, pour l'aide apportée en ce qui concerne les cultures organotypiques, à Monsieur LAZARECKI qui a réalisé l'illustration photographique avec une grande adresse.

Je ne saurais oublier Madame GARBE et Monsieur HIMPENS qui ont bien voulu m'aider dans la réalisation pratique de ce mémoire.

## SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	p. 1
MATERIEL ET TECHNIQUES .....	p. 3
CHAPITRE I : EVOLUTION DU NUCLEOLE AU COURS DE L'OVOGENESE NATURELLE .....	p. 5
Rappel des différentes étapes de l'ovogenèse de <u>N. diversicolor</u> .....	p. 6
RESULTATS .....	p. 7
I - Etude au microscope photonique .....	p. 7
A - Etude cytochimique .....	p. 7
B - Etude autoradiographique .....	p. 9
II - Etude au microscope électronique .....	p. 10
1 - Début de la prévitellogenèse .....	p. 10
2 - Prévitellogenèse et vitellogenèse protéique ....	p. 10
3 - Stade d'élaboration des glucides .....	p. 12
4 - Stade de maturité .....	p. 13
DISCUSSION .....	p. 16
I - Relations entre les résultats cytochimiques et les observations au microscope électronique .....	p. 16
1 - Stade de vitellogenèse protéique .....	p. 16
2 - Stade d'élaboration des glucides .....	p. 17
II - Rôle du nucléole dans les synthèses ribonucléoprotéiques	p. 18
1 - Rappel des connaissances actuelles sur les synthèses nucléolaires .....	p. 18
2 - Problème de l'ADN nucléolaire dans l'ovocyte de <u>N. diversicolor</u> .....	p. 19
3 - Synthèse des ribonucléoprotéines nucléolaires dans l'ovocyte de <u>N. diversicolor</u> .....	p. 19
III - Relations entre l'évolution nucléolaire et les variations de l'activité cérébrale .....	p. 20
1 - Signification de l'évolution structurale du nucléole .....	p. 20
2 - Relations entre la structure du nucléole et le taux hormonal .....	p. 21

CHAPITRE II : EVOLUTION DU NUCLEOLE AU COURS DE	
L'OVOGENESE EXPERIMENTALE .....	p. 23
Rappel des travaux expérimentaux effectués	
sur l'ovogenèse de <u>N. diversicolor</u> .....	p. 24
TECHNIQUES .....	p. 26
RESULTATS .....	p. 27
I - Etude au microscope photonique .....	p. 27
A - Effets de la suppression du facteur hormonal	
sur l'évolution nucléolaire .....	p. 27
1 - Etude cytochimique après	
expérimentation <u>in vitro</u> .....	p. 27
2 - Etude cytochimique après	
expérimentation <u>in vivo</u> .....	p. 28
3 - Etude autoradiographique après	
expérimentation <u>in vitro</u> .....	p. 29
B - Effets du rétablissement du facteur cérébral	
sur l'évolution expérimentale du nucléole .....	p. 30
II - Etude au microscope électronique .....	p. 30
1 - Stade du nucléole annulaire .....	p. 31
2 - Stade du nucléole ségrégé .....	p. 32
DISCUSSION .....	p. 36
I - Relations entre les résultats cytochimiques et	
les observations au microscope électronique .....	p. 36
1 - Nucléole annulaire .....	p. 36
2 - Nucléole ségrégé .....	p. 37
II - Synthèses d'ARN nucléolaire pendant	
l'évolution expérimentale .....	p. 37
1 - Nucléole annulaire .....	p. 37
2 - Nucléole ségrégé .....	p. 38
III - Effets de la suppression de l'hormone cérébrale	
sur l'évolution du nucléole .....	p. 39

1 - Relations entre l'évolution du nucléole et les variations expérimentales du taux hormonal.....	p. 39
2 - Action de la suppression expérimentale de l'hormone sur le développement de la vacuole nucléolaire .....	p. 40
3 - Le nucléole, organe cible de l'action hormonale ? .....	p. 40
CHAPITRE III - ACTION D'INHIBITEURS METABOLIQUES SUR L'EVOLUTION DU NUCLEOLE .....	p. 42
TECHNIQUES .....	p. 43
RESULTATS .....	p. 44
I - Etude autoradiographique .....	p. 44
1 - Incorporation d'uridine tritiée en présence d'actinomycine D .....	p. 44
2 - Incorporation de leucine tritiée en présence de puromycine .....	p. 44
II - Etude au microscope électronique .....	p. 44
1 - Action de l'actinomycine D .....	p. 44
2 - Action de la puromycine .....	p. 45
DISCUSSION .....	p. 46
I - Action de l'actinomycine D .....	p. 46
II - Action de la puromycine .....	p. 47
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION .....	p. 48

## INTRODUCTION

Chez les Néréidiens, des résultats récents (PORCHET, 1970 ; DURCHON et PORCHET, 1971) montrent qu'il existe une relation étroite entre le déroulement de l'ovogenèse et l'activité inhibitrice du cerveau. Ces données ont pu être établies, en particulier, grâce à une méthode de dosage biologique de l'activité cérébrale (DURCHON et PORCHET, 1970, 1971). Chez Nereis pelagica L. (DHAINAUT, 1970 a) et Perinereis cultrifera Grube (PORCHET, 1970), les synthèses cytoplasmiques peuvent être divisées en deux phases successives : période d'élaboration du vitellus protéique puis période d'élaboration des glucides. Le premier type de synthèses s'effectue en présence d'un taux élevé d'hormone inhibitrice. Le second n'est déclenché que lorsque l'inhibition cérébrale devient très faible (DURCHON et PORCHET, 1971).

Chez Nereis pelagica, une étude cytologique et métabolique approfondie a permis de préciser que les synthèses du cytoplasme étaient liées à une spécialisation de l'activité fonctionnelle de l'appareil de Golgi (DHAINAUT, 1970 a). Chez cette espèce DHAINAUT (1972) a constaté d'autre part un synchronisme entre l'évolution du nucléole et les étapes successives de l'activité cytoplasmique, la régulation hormonale s'effectuant peut-être par l'intermédiaire d'une modification des informations d'origine nucléaire.

Il importait de rechercher si une telle corrélation entre l'évolution du nucléole et celle du cytoplasme pouvait être étendue à un autre Néréidien. Notre choix s'est porté sur Nereis diversicolor O.F. Müller pour plusieurs raisons. Chez cette espèce, l'élaboration du vitellus protéique occupe la majeure partie de l'ovogenèse. Contrairement aux deux espèces mentionnées précédemment, les synthèses glucidiques sont assez limitées. De ce fait, les ovocytes de N. diversicolor présentent des caractéristiques cytologiques tout à fait particulières qui rendent intéressante l'étude de l'évolution du nucléole.

D'autre part, la suppression expérimentale de l'influence endocrine du cerveau est suivie, chez N. diversicolor, d'une évolution ovocytaire différente de l'ovogenèse naturelle. En effet, si l'ablation du cerveau détermine une accélération de la croissance ovocytaire chez toutes les espèces étudiées : Platynereis dumerilii Aud. et M. Edward (HAUENSCHILD, 1956), N. pelagica (CHOQUET, 1962), N. diversicolor (CLARK et RUSTON, 1963), P. cultrifera (DHAINAUT et PORCHET, 1967), Nereis grubei Kinberg (SCHROEDER, 1971), la levée

expérimentale de l'inhibition cérébrale entraîne des effets cytologiques différents suivant les espèces. Les ovocytes de P. cultrifera d'un diamètre supérieur à 140  $\mu$  (DHAINAUT et PORCHET, 1967) et ceux de N. pelagica (DHAINAUT, 1970 b) évoluent de façon comparable à celle de l'ovogenèse habituelle. Par contre, quel que soit leur stade initial, les ovocytes de N. diversicolor se caractérisent par une déviation de leur métabolisme et acquièrent finalement une structure anormale (BERTOUT et DHAINAUT, 1971).

Il était donc intéressant d'étudier le comportement du nucléole en condition an hormonale et de déterminer quel élément cellulaire (noyau ou cytoplasme) présentait la réponse la plus précoce à la levée expérimentale de l'inhibition hormonale.

Enfin, la possibilité d'appliquer à N. diversicolor la technique des cultures organotypiques (DURCHON et SCHALLER, 1963) présente l'avantage de pouvoir expérimenter dans des conditions standards et facilement reproductibles.

Notre travail est divisé en trois parties, chacune d'elle étant envisagée du triple point de vue cytochimique, autoradiographique et ultrastructural.

- la première partie est consacrée à l'évolution du nucléole au cours de l'ovogenèse naturelle.

- la seconde concerne l'évolution du nucléole au cours de l'ovogenèse expérimentale. Nous y examinons l'effet de la suppression de l'activité cérébrale.

- dans la dernière partie, nous étudions l'action d'inhibiteurs métaboliques sur la structure du nucléole. L'hormone cérébrale exerçant une inhibition dans le déroulement de l'ovogenèse, il était intéressant d'établir une comparaison entre l'effet hormonal et celui d'antimétabolites.

MATERIEL ET TECHNIQUES

Les animaux ont été récoltés dans le port de Boulogne. Au laboratoire, chaque individu est isolé dans un récipient d'élevage contenant de l'eau de mer filtrée, renouvelée tous les 3 jours. L'état génital de chaque femelle est apprécié en déterminant le diamètre ovocytaire moyen à partir des mesures de plusieurs ovocytes obtenus par ponction coelomique.

Nous n'envisagerons dans ce paragraphe que les techniques de la microscopie, qui sont communes aux trois parties de notre étude. Les méthodes relatives à l'ovogenèse expérimentale et à l'emploi des inhibiteurs métaboliques sont exposées au début des chapitres correspondants.

I - CYTOCHIMIE

Les fragments de ver sont fixés soit par le liquide de Carnoy, soit par le Bouin aqueux, soit par le formol à 10 % dans l'eau de mer, en fonction de l'étude cytochimique envisagée. Les pièces sont ensuite incluses dans la paraffine et coupées à 5  $\mu$  d'épaisseur.

Les réactions cytochimiques que nous avons employées sont consignées dans le tableau 1. Elles ont été conduites suivant les recommandations de GABE (1968).

Tableau 1 - Réactions utilisées pour l'étude cytochimique

Réaction	Contrôle	Constituant mis en évidence
Bleu de Toluidine pH 4,2	* R N ase	A R N
Fast Green pH 8,1	! Pas d'hydrolyse des acides nucléiques	! Protéines basiques
Fast Green pH 2,2	!	! Acidophilie totale (Fonctions NH <sub>2</sub> libres)
Bleu de Toluidine pH 9 (SMETANA et BUSCH, 1966)	!	! Protéines acides
Réaction au D.D.D. de BARNETT-SELIGMANN	! Blocage par : ! -Bichlorure de Mercure ! cure ! -N-éthyl-maléinide	! Protéines sulfhydrilées

## II - AUTORADIOGRAPHIE

Les animaux ont reçu, proportionnellement à leur poids, une injection d'un des précurseurs tritiés suivants, fournis par le CEA (Saclay) :

Uridine  $^3\text{H}_5$ , Activité Spécifique : 20 Ci/mM. Chaque animal reçoit 25  $\mu\text{Ci}$  par gramme de poids frais.

L (-) Leucine  $^3\text{H}$  (GL), A.S. : 145 m Ci/mM. Dose injectée : 20  $\mu\text{Ci/g}$ .

L Lysine  $^3\text{H}_4$ , A.S. : 11 Ci/mM. Dose injectée : 133  $\mu\text{Ci/g}$ .

L Arginine  $^3\text{H}_4$ , A.S. : 18 Ci/mM. Dose injectée : 100  $\mu\text{Ci/g}$ .

Les fixations sont effectuées, par le liquide de Carnoy ou le formol à 10 %, après des durées variables d'incorporation, dans le but de réaliser des études cinétiques.

Afin de vérifier la spécificité des précurseurs utilisés, nous avons procédé sur les coupes à divers contrôles par digestion enzymatique (ribonucléase, pepsine, trypsine) ou par hydrolyse chimique (Acide Trichloro-acétique Normal à 60°C pendant 3 heures dans le cas de l'uridine).

La technique autoradiographique utilisée est celle de FICQ (1961). Le précurseur non incorporé est éliminé par l'acide perchlorique à 1 %. Les coupes sont ensuite recouvertes de l'émulsion Ilford K 5. Après exposition, elles sont soumises au Révélateur Kodak D 19 b pendant 3 mn, puis colorées par le rouge solide et le picroindigocarmin.

## III - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Les ovocytes isolés obtenus par ponction coelomique, ou les parapodes contenant les cellules germinales sont fixés pendant 1 à 2 heures par la glutaraldéhyde à 3 % dans le tampon phosphate 0,2 M. Une postfixation est effectuée dans l'osmium à 1 % pendant 1 heure.

Les pièces sont ensuite incluses dans l'araldite. Les coupes ont été contrastées par l'acétate d'uranyle à 3 % dans le tampon de Michaelis pendant 20 mn puis par le citrate de plomb selon Reynolds pendant 8 mn.

Les préparations ont été examinées au microscope électronique Siemens Elmiskop 1.

CHAPITRE I

EVOLUTION DU NUCLEOLE AU COURS DE L'OVOGENESE NATURELLE

RAPPEL DES DIFFERENTES ETAPES DE L'OVOGENESE DE N. DIVERSICOLOR

1 - Stade de Prévitellogenèse : Le déroulement de la prophase de la méiose s'accompagne d'une diminution puis d'une disparition de la coloration de la chromatine par la réaction de FEULGEN. La prévitellogenèse coïncide avec le début de la période du grand accroissement ovocytaire caractérisé par l'augmentation de volume du cytoplasme.

2 - Stade de vitellogenèse protéique : Les granules de vitellus protéique et les globules lipidiques apparaissent dans les ovocytes d'un diamètre de 30  $\mu$  environ. Les granules vitellins protéiques s'accroissent par incorporation de vésicules issues de l'appareil de Golgi (DHAINAUT, 1967). Le rôle de cet organite dans la synthèse du vitellus protéique a été démontré en autoradiographie à haute résolution après injection de leucine tritiée (DHAINAUT, 1967). La synthèse des réserves vitellines ne coïncide pas avec une chute des synthèses ribonucléiques comme c'est le cas chez de nombreuses espèces animales. Chez N. diversicolor, le cytoplasme reste très basophile et l'uridine tritiée s'incorpore intensément pendant toute la durée de la vitellogenèse (DHAINAUT, 1964 ; BERTOUT et DHAINAUT, 1971).

3 - Stade d'élaboration des glucides : A partir d'un diamètre de 150 à 170  $\mu$ , le glycogène apparaît dans le cytoplasme. Peu après (180-190  $\mu$ ), il est possible de mettre en évidence, dans la zone corticale, des mucopolysaccharides acides et des glycoprotéines qui correspondent à l'édification des organites corticaux (alvéoles mucopolysaccharidiques et granules corticaux). L'appareil de Golgi subit des modifications et présente une morphologie caractéristique du stade d'élaboration des polysaccharides (DHAINAUT, 1969 a). Cette orientation métabolique nouvelle des dictyosomes ne semble pas corrélative d'un arrêt complet de la vitellogenèse protéique, l'injection d'acides aminés tritiés étant toujours suivie d'un marquage non négligeable au niveau de certains granules vitellins (DHAINAUT, 1970 a).

4 - Stade de Maturité : La maturité ne s'accompagne pas d'une redistribution des inclusions cytoplasmiques comme chez les autres espèces de Néridiens. Au microscope électronique, ce stade est caractérisé par l'involution de l'appareil de Golgi et par le grand développement des vésicules intranucléaires (DHAINAUT, 1969 b).

## RESULTATS

### I - ETUDE AU MICROSCOPE PHOTONIQUE

#### A - ETUDE CYTOCHIMIQUE

Pendant la plus grande partie de l'ovogenèse, le nucléole subit un accroissement de taille parallèle à celui de l'ovocyte. Le diamètre nucléolaire représente, en moyenne, le 1/10 du diamètre total de la cellule.

#### 1 - Stade de vitellogenèse protéique (ovocytes de 30 à 120 $\mu$ )

##### a - A R N

Le Bleu de toluidine à pH 4,2 colore intensément le nucléole au cours de ce stade (Pl. I, fig. 1 et 2). La disparition de toute coloration après digestion par la ribonucléase montre que la basophilie nucléolaire est due à l'ARN. La répartition de cet acide nucléique permet de distinguer 3 zones dans le nucléole (Pl. I, fig. 2). On observe, de la périphérie vers le centre de l'organite, une région corticale formée d'un matériel granuleux très basophile, une couronne intermédiaire homogène colorée très faiblement par le bleu de toluidine et enfin une zone centrale renfermant généralement de petites vacuoles et dont la basophilie élevée rappelle celle de la région corticale. Cette structure du nucléole se rencontre pendant toute la période de vitellogenèse. Seule la zone corticale évolue : en coiffe ou en croissant (Pl. I, fig. 1) dans les ovocytes jeunes (jusqu'à 60  $\mu$  environ) elle s'étend progressivement à toute la périphérie du nucléole pour prendre la forme d'un anneau dans les ovocytes d'un diamètre supérieur à 80  $\mu$  (Pl. I, fig. 2).

##### b - Protéines

L'étude cytochimique des protéines permet de retrouver les 3 zones décrites précédemment. Elles se distinguent les unes des autres par leur teneur différente en protéines basiques, acides et sulfhydrylés.

La répartition des protéines basiques présente une grande analogie avec celle de l'ARN, leur mise en évidence par la méthode d'ALFERT et GESCHWIND se traduisant par une coloration nettement moins intense dans la zone intermédiaire que dans la région centrale et le croissant (ou l'anneau) périphérique (Pl. I, fig. 3). Par contre, seule la région intermédiaire retient le

Tableau 2 - Caractères cytochimiques des différentes zones du nucléole au cours de l'ovogenèse naturelle.

a - Stade de vitellogenèse protéique.

Zones Nucléolaires	ARN	Protéines basiques liés à l'ARN	Protéines basiques libres	Acidophilie totale (NH <sub>2</sub> libres)	Protéines Acides	Protéines sulfhydrilées
Cortex	++	++	-	+	++	-
Zone intermédiaire homogène	+	+	+	++	++	+
Zone centrale vacuolisée	++	++	-	+	++	++

b - Stade d'élaboration des glucides.

Cortex	+	+	-	+	++	+
Centre	++	++	+	++	++	++

Fast Green lorsque la coloration est effectuée sans hydrolyse préalable des acides nucléiques (Pl. I, fig. 4). De même, les fonctions amines libres détectées par la méthode de l'acidophilie totale sont beaucoup plus nombreuses dans le couronne intermédiaire que dans les deux autres parties du nucléole (Pl. I, fig. 5).

Ces résultats ~~suggèrent~~ que les protéines basiques des zones centrale et corticale du nucléole se trouvent sous forme de complexes avec l'ARN, tandis que la couronne intermédiaire renfermerait **des protéines basiques** à l'état libre.

Les protéines acides sont distribuées d'une manière plus uniforme comme le montre la coloration par le bleu de toluidine à pH 9 selon la méthode de SMETANA et BUSCH (Pl. I, fig. 6).

Chacune des trois zones du nucléole présente une teneur différente en protéines\_sulfhydrilées. Celles-ci sont de moins en moins concentrées de la zone centrale vers la zone périphérique (Pl. I, fig. 7). Cette répartition est très nette chez les ovocytes jeunes. A partir d'un diamètre ovocyttaire de 80  $\mu$ , la zone intermédiaire acquiert une coloration aussi intense que celle de la région centrale, mais le cortex donne toujours un résultat négatif (Pl. I, fig. 8).

Les résultats cytochimiques obtenus au cours de cette période de l'évolution ovocyttaire sont récapitulés dans le tableau 2 a.

2 - Stade d'élaboration des glucides (ovocytes de 150 à 180  $\mu$ ).

A ce stade de l'évolution ovocyttaire, la répartition de la basophilie dans le nucléole permet de distinguer deux zones concentriques : l'une est homogène, l'autre d'aspect granuleux. Le composant homogène se présente sous la forme (Pl. II, fig. 9) d'un anneau ou d'un disque central. Il se colore généralement d'une manière plus intense que le composant granuleux (Pl. II, fig. 9) dont certaines parties deviennent complètement incolores à la fin de ce stade ovocyttaire (Pl. II, fig. 10).

Le taux des protéines basiques (Pl. II, fig. 11), acides (Pl. II, fig. 12) et sulfhydrilées (Pl. II, fig. 13) est sensiblement identique dans les deux parties du nucléole. Toutefois, la teneur en protéines du composant cortical granuleux semble diminuer chez les ovocytes proches de la maturité (Pl. II, fig. 13).

Les résultats concernant ce stade de l'évolution nucléolaire sont consignés dans le tableau 2 b.

### 3 - Stade de Maturité (ovocytes de 200 $\mu$ ).

Durant ce stade ultime de l'évolution nucléolaire, la taille de l'organite, qui n'avait cessé de s'accroître jusqu'alors, diminue de manière très sensible. Son diamètre, de 20  $\mu$  à la fin du stade précédent, tombe à 15  $\mu$  environ.

Le nucléole est composé de deux hémisphères (Pl. II, fig. 14, 15 et 16) : l'un possède de nombreuses vacuoles et présente généralement une forme irrégulière (Pl. II, fig. 14 et 16), l'autre, généralement de plus grande taille, est de structure homogène.

Après application du test de MANN-DOMINICI, seul l'hémisphère de contour irrégulier révèle une basophilie, d'ailleurs réduite (Pl. II, fig. 14). Le Fast Green à pH alcalin colore les deux hémisphères d'une manière sensiblement identique (Pl. II, fig. 15). Les protéines acides sont légèrement plus <sup>concentrées</sup> colorées au niveau de l'hémisphère homogène (Pl. II, fig. 16).

## B - ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE

### 1 - Incorporation d'uridine tritiée

L'incorporation d'uridine tritiée pendant des temps courts se traduit par un marquage intense du nucléole qui reste le seul site cellulaire radioactif jusqu'à 6 heures après l'injection (Pl. III, fig. 17). A partir de ce moment, le marquage passe dans le cytoplasme mais demeure prépondérant au niveau du nucléole (Pl. III, fig. 18). La quantité de substances radioactives présentes dans cet organite ne diminue de manière sensible que 3 à 4 jours après l'injection.

Cette cinétique d'incorporation est valable aussi bien pendant la période de vitellogenèse protéique que pendant la phase d'élaboration des glucides. Les synthèses ribonucléiques ne diminuent qu'à l'approche de la maturité, les ovocytes ayant atteint un diamètre de 170 à 180  $\mu$ .

### 2 - Incorporation d'acides aminés tritiés

Le nucléole incorpore les acides aminés tritiés dès les temps courts, il est alors le site cellulaire où les protéines radioactives sont plus concentrées (Pl. III, fig. 19 et 21). Le marquage nucléolaire diminue à partir de 24 heures d'incorporation (Pl. III, fig. 20 et 22).

Une radioactivité nucléolaire non négligeable persiste 5 jours après une injection de leucine ou de lysine (Pl. III, fig. 20). Par contre, il ne subsiste qu'un nombre insignifiant de grains d'argent au niveau du nucléole après une incorporation d'arginine (Pl. III, fig. 22).

## II - ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

### 1 - Début de la prévitellogenèse (ovocytes de 10 $\mu$ )

A ce stade, le nucléole est une masse arrondie en contact avec la chromatine accolée à l'enveloppe nucléaire (Pl. IV, fig. 23). La périphérie de l'organite est parfois en relation avec la chromatine du nucléoplasme. Celle-ci se trouve sous forme de mottes de 2  $\mu$  environ qui se dispersent en éléments de plus petite taille.

Le nucléole semble constitué uniquement par un matériel de nature fibrillaire. La présence de petites vacuoles dans la partie la plus centrale de l'organite confère à cette zone une densité moins élevée que celle de la région périphérique (Pl. IV, fig. 23).

L'examen de l'enveloppe nucléaire permet de déceler un passage intense de matériel nucléoplasmique au niveau des pores. De nombreuses extrusions d'une taille de 1000 Å environ, occupent, à proximité du noyau, une bande cytoplasmique de 0,3  $\mu$ . A une distance plus éloignée de l'enveloppe nucléaire, on observe des agrégats de même densité électronique que les extrusions mais de taille beaucoup <sup>plus</sup> importante, pouvant atteindre 0,6  $\mu$  (Pl. IV, fig. 23).

### 2 - Prévitellogenèse et vitellogenèse protéique (ovocytes de 20 à 120 $\mu$ )

Au cours de ces stades de l'ovogenèse la chromatine atteint son maximum de dispersion. Il devient impossible de la discerner parmi les formations nucléoplasmiques. Le nucléole se détache de l'enveloppe nucléaire et migre au centre du noyau. Cette seconde phase de l'évolution nucléolaire est caractérisée par l'élaboration et le développement de la zone granulaire. Celle-ci apparaît à un pôle du nucléole sous forme d'une coiffe ("nucleolar cap" des auteurs anglo-saxons) (Pl. IV, fig. 24) puis s'étend progressivement à la périphérie de la zone fibrillaire en formant d'abord un croissant (Pl. VI, fig. 31 et 32) puis un anneau.

a - Structure des constituants nucléolaires

Zone fibrillaire : Comme au stade précédent, le constituant fibrillaire se divise en deux zones concentriques, la région la plus externe ayant un aspect plus homogène que la zone centrale.

Le composant fibrillaire le plus homogène se trouve limité à sa périphérie par le cortex granulaire et du côté interne par la zone fibrillaire centrale (Pl. VI, fig. 32). A fort grossissement, il apparaît constitué de fibrilles d'un diamètre moyen de 50 Å (Pl. VII, fig. 33). En certains points, leur disposition en un feutrage très serré donne naissance à des amas denses de 500 à 1000 Å (Pl. IV, fig. 25 et Pl. VII, fig. 33).

La seconde partie du constituant fibrillaire est parcourue par un réseau de fines lacunes. Pour éviter toute confusion avec la zone fibrillaire homogène, nous lui avons attribué le terme de zone fibrillaire lacunaire. Outre la présence de lacunes, le caractère hétérogène de ce constituant est renforcé par la présence d'éléments granulaires de tailles diverses (100 à 200 Å). Il est difficile de préciser s'il s'agit véritablement de granules ou de faisceaux de fibrilles coupées transversalement (Pl. VII, fig. 34).

zone granulaire : Le composant granulaire constitue le cortex nucléolaire. L'observation à fort grossissement montre qu'il est formé de granules de 150 Å enrobés dans une matrice relativement dense aux électrons. Les granules sont disposés en trabécules de 1000 Å d'épaisseur, anastomosés en une sorte de réseau (Pl. V, fig. 26). Les espaces compris entre les mailles de ce réseau sont d'une densité comparable à celle du nucléoplasme.

Les trabécules les plus externes se dissocient en fragments de 1000 à 2 000 Å. Cette fragmentation de la zone corticale du nucléole semble particulièrement active dans les ovocytes d'un diamètre de 80 à 100  $\mu$  (Pl. VII, fig. 34 et 35).

En plus de ces fragments de petite taille, des masses sphériques de 0,5  $\mu$  en moyenne sont parfois libérées à partir du cortex nucléolaire (Pl. VII, fig. 35). Ces formations, qui semblent essentiellement de nature fibrillaire, se retrouvent à proximité de l'enveloppe nucléaire (Pl. VII, fig. 36).

Formations nucléoplasmiques et extrusions nucléaires

. Corps sphériques ou ovoïdes : d'une taille constante de 1,5  $\mu$  (Pl. V, fig. 27 et Pl. VIII, fig. 37), ils sont au nombre de quelques unités par noyau. Ils pourraient correspondre aux "corps nucléaires" décrits dans les cellules de plusieurs espèces (BOUTEILLE et al., 1967 ; KJERSZENBAUM, 1969 ; ESPONDA et STOCKERT, 1971). Leur densité électronique est moins élevée que celle

des granulations nucléoplasmiques et il ne semble pas exister de rapports entre ces deux types de constituants nucléaires.

. Granulations nucléoplasmiques : elles proviennent vraisemblablement des fragments de 1000.à2000 Å issus de la zone granulaire du nucléole (Pl. V, fig. 26 et Pl. VII, fig. 34). Ces granulations sont constituées d'éléments de 100 Å disposés dans une matrice très dense aux électrons (Pl. V, fig. 28 et Pl. VIII, fig. 38). Elles se regroupent le long de l'enveloppe nucléaire et peuvent alors fusionner partiellement (Pl. V, fig. 28 ; Pl. VI, fig. 31 et Pl. VII, fig. 36).

. Les extrusions nucléaires sont nombreuses au niveau des pores de l'enveloppe. Certaines images (Pl. V, fig. 28) montrent une relation entre les granulations nucléoplasmiques et le contenu des pores. Celui-ci s'écoule dans le cytoplasme en massifs de 500 à 1000 Å (Pl. V, fig. 29) qui se localisent à proximité du noyau (Pl. V, fig. 29). A une distance plus grande de ce dernier, ces petits massifs s'associent en agrégats cytoplasmiques de taille beaucoup plus importante (1 μ), fréquemment entourés de mitochondries (Pl. V, fig. 30).

### b - Evolution structurale des constituants nucléolaires à la fin du stade de vitellogenèse protéique

A partir d'un diamètre ovocytaire de 100 μ environ, le nucléole subit progressivement des modifications de structure. Elles intéressent essentiellement la zone granulaire dont l'organisation typique en trabécules disparaît, pour faire place peu à peu à une zone d'aspect plus homogène. En même temps, les processus de dissociation de ce cortex granulaire se raréfient et le contour du nucléole devient plus régulier.

La figure 37 de la Planche VIII illustre cette forme de transition. Des trabécules de matériel granulaire en cours de dissociation sont encore visibles à la périphérie. Par contre, la partie la plus interne du composant granulaire est beaucoup plus compacte par suite du rétrécissement des espaces clairs compris entre les trabécules. La zone fibrillaire occupe toujours le centre du nucléole et conserve le même aspect.

### 3 - Stade d'élaboration des glucides (ovocytes de 140 à 180 μ)

A partir d'un diamètre ovocytaire de 140 μ, le nucléole présente l'aspect caractéristique de la période d'élaboration des glucides. La zone granulaire ne se limite plus au cortex de l'organite mais en occupe la plus grande partie. Le composant fibrillaire est constitué de plages dispersées dans le matériel granulaire (Pl. IX, fig. 39). Des vacuoles n'atteignant que rarement un dévelop-

pement important, sont parfois visibles dans la région centrale de certains ovocytes (Pl. IX, fig. 39). Chez d'autres, les plages fibrillaires se regroupent pour former un anneau (Pl. IX, fig. 40).

a - Structure des différents constituants

Constituant fibrillaire : A faible grossissement, il apparaît sous forme de zones d'aspect homogène et de forte densité aux électrons (Pl. IX, fig. 39). Un grossissement plus élevé permet de discerner un feutrage serré de fibrilles de 50 Å de diamètre (Pl. IX, fig. 41). Cette ultrastructure rappelle celle de la zone fibrillaire homogène du stade précédent. Le contour des plages fibrillaires est très irrégulier et souvent difficile à définir étant donné leur intrication étroite avec le composant granulaire (Pl. IX, fig. 41).

Constituant granulaire : Il subit des modifications importantes. Les granules sont dispersés parmi des fibrilles d'un diamètre de 50 Å (Pl. IX, fig. 42), ce qui confère à ce matériel une structure fibrillo-granulaire, terme que nous utiliserons dès ce stade pour qualifier ce composant nucléolaire.

La périphérie de la zone fibrillo-granulaire libère des formations d'une taille moyenne de 1000 Å. Celles-ci semblent donner naissance, comme au stade précédent, aux granulations nucléoplasmiques qui s'agglomèrent près de l'enveloppe nucléaire.

b - Evolution structurale des constituants nucléolaires à la fin de la période d'élaboration des glucides

A partir d'un diamètre de 170  $\mu$ , le nucléole présente une évolution complexe qui sera exposée essentiellement à l'aide de l'illustration (Pl. X, fig. 43 et 44). En section, le matériel fibrillaire apparaît disposé en un anneau (Pl. X, fig. 43) puis en un disque (Pl. X, fig. 44). En ce qui concerne le composant fibrillo-granulaire, on assiste à une chute du nombre de granules au fur et à mesure que l'ovocyte progresse vers la maturité.

Les granulations nucléoplasmiques sont toujours présentes à proximité de l'enveloppe nucléaire (Pl. X, fig. 45). Les vésicules intranucléaires (DHAINAUT, 1969 b) commencent à se constituer à ce stade (Pl. X, fig. 46). Les extrusions nucléaires sont rares dans le cytoplasme périnucléaire (Pl. X, fig. 46).

4 - Stade de maturité (ovocytes de 180 à 200  $\mu$ )

Durant la phase ultime de son évolution, les constituants nucléolaires se ségrègent en deux hémisphères de densité différente aux électrons.

Chacun se caractérise, de plus, par un type particulier de vacuole (Pl. XI, fig. 47).

On assiste en même temps à la désagrégation du nucléole (Pl. XI, fig. 48). Ce processus semble à l'origine des nombreux "micro-nucléoles" qui envahissent le nucléoplasme.

a - Hémisphère fibrillaire dense

Il s'agit de la partie du nucléole où les phénomènes de dissociation sont les plus avancés (Pl. XI, fig. 47 et 48).

Cette zone est composée d'un feutrage de fibrilles très serrées, parsemé d'espaces plus clairs où apparaissent des granules de taille élevée (200-300 Å) (Pl. XI, fig. 49).

Les vacuoles, d'un diamètre de plusieurs microns, présentent un contour très irrégulier. La dispersion du matériel nucléolaire bordant les vacuoles contribue à donner à leur contenu un aspect granuleux (Pl. XI, fig. 48 et 49). Les vacuoles les plus périphériques s'ouvrent dans le nucléoplasme par rupture de leur bord externe qui se fragmente en formations de 0,5  $\mu$  environ (Pl. XI, fig. 48).

b - Hémisphère fibrillaire clair

La seconde partie du nucléole est constituée d'un matériel fibrillaire de plus faible densité que celui de l'autre hémisphère (Pl. XII, fig. 50 et 51). Ce matériel semble résulter de la dégranulation complète du composant fibrillo-granulaire décrit au stade précédent.

Les vacuoles sont de petite taille (0,5  $\mu$ ) et possèdent un contenu diffus (Pl. XII, fig. 51).

La périphérie de cet hémisphère ne subit pas de dislocation et son contour est donc nettement plus régulier que celui de l'autre région du nucléole.

c - Micronucléoles

La densité du nucléoplasme augmente par rapport aux stades précédents. On observe, d'autre part, la présence de nombreuses formations dont la structure est comparable à celle du nucléole. Nous leur avons donné le nom de "micronucléoles". Ils se divisent en deux catégories.

. Micronucléoles denses : D'une taille régulière de 0,5  $\mu$ , ils sont les plus nombreux. Leur structure fibrillaire (Pl. XIII, fig. 52) rappelle celle de l'hémisphère dense du nucléole. Ils résultent vraisemblablement de la fragmentation de cette zone (Pl. XI, fig. 48).

. Micronucléoles clairs : Beaucoup plus rares que les premiers, ils ont une taille qui varie de 1 à 5  $\mu$ . Ils sont formés d'un matériel fibrillaire organisé en une trame très lâche (Pl. XIII, fig. 52). Leur origine est assez énigmatique.

On observe fréquemment une relation entre des micronucléoles et les vésicules intranucléaires qui atteignent à ce stade leur développement maximal (Pl. XIII, fig. 53 et 54).

## DISCUSSION

### I - RELATIONS ENTRE LES RESULTATS CYTOCHIMIQUES ET LES OBSERVATIONS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

#### 1 - Stade de vitellogenèse protéique

Pendant cette période, le nucléole de l'ovocyte est formé de trois zones concentriques mises en évidence à la fois par les techniques cytochimiques et par l'examen ultrastructural. La zone corticale, riche en ARN et en protéines (dont certaines présentent des caractères basiques, d'autres des caractères acides) apparaît de nature granulaire au microscope électronique. La zone intermédiaire possède une structure fibrillaire. L'étude cytochimique montre qu'elle renferme essentiellement des protéines, sa teneur en ARN étant très faible. La zone centrale est également de nature fibrillaire mais se distingue de la précédente, au microscope électronique, par son aspect beaucoup moins homogène.

La localisation corticale de la basophilie dans les nucléoles de divers types cellulaires, et notamment des ovocytes, est un fait classique. De telles structures nucléolaires ont été décrites, sous le nom d'"amphinucléoles" au cours d'études réalisées au microscope photonique (RAVEN, 1961). Des travaux plus récents ont montré, comme dans le cas de notre matériel, que la basophilie était particulièrement élevée au niveau du composant granulaire (PASTEELS, 1965 ; HAY et GURDON, 1967 ; GIMENEZ-MARTIN et STOCKERT, 1970). Pour HAY et GURDON (1967), cette propriété serait due à un rapport ARN/Protéines plus élevé dans la zone granulaire que dans la zone fibrillaire.

La disposition du constituant granulaire en trabécules ("nucléolonèmes") à la périphérie d'un centre fibrillaire compact est relativement fréquent. Ce type d'organisation se rencontre dans la glande salivaire de diptère (JACOB et SIRLIN, 1964), l'embryon de rat (SZOLLOSI, cité par BUSCH et SMETANA, 1970), l'ovocyte d'Amphibien (MILLER, 1966), le spermatocyte d'escargot (ESPONDA et STOCKERT, 1970), la microspore de maïs (SWIFT et STEVENS, 1966). Cette séparation des constituants granulaire et fibrillaire en deux régions distinctes a été qualifiée de "ségrégation naturelle" par certains auteurs (GIMENEZ-MARTIN et STOCKERT, 1970 ; DAJCZENKO et al., 1969 ; REDDY et SVOBODA, 1972). GIMENEZ-MARTIN et STOCKERT<sup>(1970)</sup>, qui rapprochent ce phénomène de la ségrégation nucléolaire provoquée par les inhibiteurs de la synthèse de l'ARN, pensent qu'il est corrélatif d'un arrêt des synthèses ribonucléiques. Ceci ne semble pas être le cas de notre matériel. En effet, on observe

une telle répartition des constituants du nucléole pendant toute la durée de la vitellogenèse, période pendant laquelle l'étude autoradiographique montre que les synthèses nucléolaires et le transfert nucléocytoplasmique de l'ARN sont considérablement élevés.

La présence dans le nucléole de l'ovocyte de N. diversicolor de deux zones fibrillaires constitue, par ailleurs, un type de structure assez rarement décrit. Une telle dualité du constituant fibrillaire a surtout été signalée dans les nucléoles en nucléolonèmes des cellules de Mammifères (RECHER et al., 1969 ; PHILLIPS et PHILLIPS, 1971 ; CHOUINARD, 1971). Dans l'ovocyte de N. pelagica, DHAINAUT (1972) distingue le composant fibrillaire dense des "lames" nucléolaires et les "blocs" fibrillaires comportant des lacunes de faible densité aux électrons.

## 2 - Stade d'élaboration des glucides

Au cours de la seconde phase de son évolution, le nucléole ne comporte plus que deux parties : une zone fibrillaire de densité électronique élevée et une zone de structure fibrillo-granulaire. Ces deux composants présentent des propriétés cytochimiques assez semblables.

Cette réorganisation du nucléole s'accompagne de modifications structurales complexes dont certaines modalités demeurent, pour l'instant, inconnues. L'origine du composant fibrillaire est, par exemple, assez énigmatique. En effet, si l'ultrastructure de ce dernier est assez semblable à celle de la zone fibrillaire homogène du stade précédent, l'étude cytochimique rend difficile une filiation entre ces deux formations.

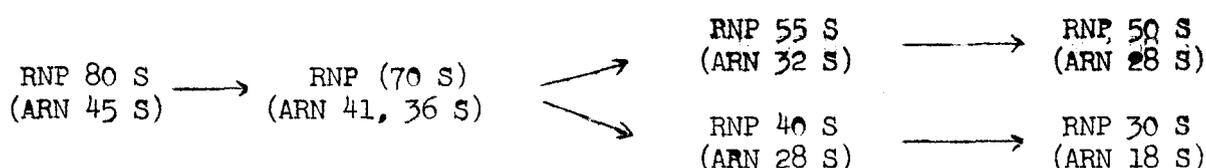
Par contre, les modifications du composant granulaire, qui perd sa disposition en trabécules et devient de nature fibrillo-granulaire, paraissent moins complexes. Il semble que cette évolution s'effectue par rétrécissement progressif des espaces clairs compris entre les trabécules ; l'appareil nucléolaire de l'ovocyte de N. diversicolor ne présentant pas les processus complexes de dislocation et de réédification observés chez N. pelagica (DHAINAUT, 1972).

A l'approche de la maturité, la diminution de la teneur en ARN et en protéines de la zone fibrillo-granulaire coïncide avec sa dégranulation. La basophilie réduite et la nature essentiellement fibrillaire du matériel nucléolaire sont des traits caractéristiques de l'ovocyte âgé chez de nombreuses espèces (RAVEN, 1961 ; PARSONS, 1964 ; MILLONIG et al., 1968 ; CHOUINARD, 1971).

## II - ROLE DU NUCLEOLE DANS LES SYNTHÈSES RIBONUCLEOPROTEIQUES

### 1 - Rappel des connaissances actuelles sur les synthèses nucléolaires

Grâce à des travaux biochimiques effectués surtout sur les cellules de Mammifères (revue dans PERRY, 1969) mais également sur les ovocytes d'Amphibiens (GALL, 1966) et les glandes salivaires de Diptères (RINGBORG et RYLANDER, 1971), on sait que les grandes molécules précurseurs d'ARN ribosomal (45 S) sont transcrites au niveau des cistrons codant l'ARNr (ADNr) contenus dans l'ADN nucléolaire. Le clivage de ce précurseur 45 S donne naissance aux ARN nucléolaires 32 et 18 S. L'ARN 18 S quitte rapidement le nucléole tandis que l'ARN 32 S est transformé en ARN 28 S avant son transfert dans le cytoplasme. De plus, il a été montré que ces différentes fractions d'ARN nucléolaire sont liées à des protéines et que les clivages successifs des molécules précurseurs s'effectuent sous forme de ribonucléoprotéines (PERRY, 1969) selon le schéma suivant proposé par SCHERRER (BUSCH et SMETANA, 1970) :



La confrontation de ces travaux biochimiques et des résultats obtenus grâce aux techniques de la microscopie électronique (digestions enzymatiques, autoradiographie à haute résolution) a permis d'interpréter l'ultrastructure du nucléole en fonction du rôle joué par cet organite dans la synthèse des ribosomes. L'ADN nucléolaire a été morphologiquement démontré (GRANBOULAN et GRANBOULAN, 1964 ; UNUMA et al., 1968). Le précurseur 45 S serait localisé au niveau de la zone fibrillaire (GRANBOULAN et GRANBOULAN, 1964 ; BERNHARD et GRANBOULAN, 1968). Le "core" fibrillaire du nucléole de l'ovocyte d'Amphibien est formé d'un long filament d'ADN auquel sont attachées des fibrilles ribonucléoprotéiques qui représenteraient l'ARN 45 S en cours de synthèse (MILLER, 1966 ; MILLER et BEATTY, 1969). Les fibrilles seraient à l'origine des granules ribonucléoprotéiques (MARINOZZI et BERNHARD, 1963 ; GEUSKENS et BERNHARD, 1966). Ceux-ci pourraient représenter le support morphologique des sous-unités ribosomales de grande taille (60 S) renfermant l'ARN 28 S (BERNHARD et GRANBOULAN, 1968 ; MILLER et BEATTY, 1969 ; NOEL et al., 1971 ; KOSHIBA et al., 1971).

## 2 - Problème de l'ADN nucléolaire dans l'ovocyte de *N. diversicolor*

Ces conceptions supposent la présence, dans le nucléole, d'ADN à partir duquel s'effectue la synthèse de l'ARNr. Dans le noyau de l'ovocyte de *N. diversicolor*, la chromatine devient morphologiquement indécélable dès le début de la phase de prévitellogenèse, tant au niveau du nucléoplasme que du nucléole. De plus, on assiste, à partir de ce stade, à la disparition de la coloration par la réaction de Feulgen et à la suppression de toute la basophilie après action de l'ARNase. Ceci rend difficile la détection de l'ADN dans l'ensemble du noyau et a fortiori dans le nucléole.

En ce qui concerne l'ADN intranucléolaire, on est amené à envisager une intrication étroite avec les constituants du nucléole telle que les méthodes de digestion enzymatique ne permettent pas sa localisation au microscope photonique. **Nous envisageons d'employer ultérieurement** ces techniques à l'échelle de la microscopie électronique.

## 3 - Synthèse des ribonucléoprotéines nucléolaires dans l'ovocyte de *N. diversicolor*

L'étude cinétique de l'incorporation de l'uridine tritiée dans les ovocytes de *N. diversicolor* montre que le nucléole est le site de synthèse prépondérant de l'ARN destiné au cytoplasme. Ces résultats s'intègrent aux connaissances actuelles sur les synthèses ribonucléiques au cours de l'ovogenèse. En effet, la majeure partie de l'ARN synthétisé par les ovocytes serait de nature ribosomale (revue dans DAVIDSON, 1969), cet ARN ribosomal étant d'origine nucléolaire dans les ovocytes (GALL, 1966 ; MILLER et BEATTY, 1969), comme dans les autres types cellulaires.

Notre étude autoradiographique après injection d'acides aminés radioactifs permet de constater que des protéines migrent, comme l'ARN, du nucléole vers le cytoplasme. Ces résultats sont en accord avec le fait que le clivage des ARN nucléolaires et le transfert nucléo-cytoplasmique de l'ARN ribosomal s'effectuent sous la forme de ribonucléoprotéines (PERRY, 1969).

Les résultats cytochimiques suggèrent que le nucléole de l'ovocyte de *N. diversicolor* renferme des protéines basiques liées à l'ARN, comme <sup>et MOON</sup> chez les Amphibiens (MAC GREGGOR, 1971). En outre, l'étude autoradiographique de notre matériel indique une similitude remarquable entre la migration nucléo-cytoplasmique de l'ARN et celle des protéines riches en arginine. Pour certains auteurs, les protéines basiques du nucléole seraient les précurseurs de protéines ribosomales (MUNDELL, 1968) et formeraient des complexes avec l'ARNr dès sa synthèse dans le nucléole (SUSKIND, 1965).

Les protéines acides que nous avons mises en évidence correspondent vraisemblablement, pour une grande part, aux protéines "résiduelles" isolées par des méthodes biochimiques à partir des nucléoles de divers types cellulaires (BIRNSTIEL et al., 1964 ; BUSCH, 1965).

Les protéines sulfhydrilées sont particulièrement abondantes dans le nucléole ovocytaire de N. diversicolor. GABE et MARTOJA-PIERSON (1956) ont montré une similitude entre la répartition de ces composés et celle de l'ARN chez différents types de nucléoles. Nous avons retrouvé une telle répartition, dans notre matériel, au niveau du constituant fibrillaire. Par contre, les granules ribonucléoprotéiques de la zone corticale ne semblent pas renfermer de fonctions sulfhydriles.

### III - RELATIONS ENTRE L'EVOLUTION NUCLEOLAIRE ET LES VARIATIONS DE L'ACTIVITE CEREBRALE

Un des traits les plus marquants de l'évolution du nucléole au cours de l'ovogenèse des Néréidiens porte sur la reconversion structurale de cet organe lorsque l'ovocyte passe de la phase de vitellogenèse protéique à celle d'élaboration des glucides. On sait, d'autre part, que le déroulement de l'ovogenèse est soumis aux variations du taux d'hormone cérébrale (PORCHET, 1970 ; DURCHON et PORCHET, 1971).

Nous envisagerons successivement la signification possible des transformations nucléolaires lors de la reconversion des synthèses cytoplasmiques et leurs relations avec les variations du taux hormonal.

#### 1 - Signification de l'évolution structurale du nucléole

Chez N. diversicolor, il est possible de caractériser chacun des stades ovocytaires par une ultrastructure nucléolaire spécifique. Chez N. pelagica, les cycles d'activité nucléolaire se superposent également aux étapes de l'évolution cytoplasmique (DHAINAUT, 1972). Ce remaniement ultrastructural du nucléole des ovocytes de Néréidiens correspond vraisemblablement à une nouvelle orientation des synthèses nucléolaires (DHAINAUT, 1972). En effet, si l'activité du nucléole ~~était~~ <sup>est</sup> uniquement centrée sur la production d'ARN ribosomal, on conçoit mal pourquoi sa structure subit des transformations lors d'une reconversion des synthèses cytoplasmiques. Cette évolution nucléolaire ne peut donc s'expliquer qu'en fonction d'un rôle dans la transmission de l'information génique.

Un certain nombre de travaux récents montrent en effet que le nucléole peut contrôler la production et le transfert de l'ARN messager. Chez les érythrocytes, le nucléole intervient dans le transfert nucléocytoplasmique de son propre ARN mais également de l'ARN synthétisé dans les autres régions du noyau (HARRIS et al., 1969 ; SIDECOTOM et HARRIS, 1969). CHOI et BUSCH (1969) signalent dans le nucléole de cellules de Mammifères, la présence d'un ARN de haut poids moléculaire, différent de l'ARN ribosomal. L'ensemble de ces travaux suggère que l'ARN messager nouvellement synthétisé doit se lier à l'ARN ribosomal du nucléole avant son transfert dans le cytoplasme (BUSCH et SMETANA, 1970, pp. 10, 165 et 265).

Dans le cas de l'ovogenèse des Néréidiens, une telle fonction du nucléole dans le transfert nucléocytoplasmique des ARN m, permettrait d'expliquer la reconversion structurale survenant lors d'une nouvelle orientation des synthèses cytoplasmiques. Celles-ci étant régies par des ARN messagers spécifiques, on peut admettre que toute modification dans la nature des ARN m synthétisés soit corrélative d'un remaniement structural du nucléole.

## 2 - Relations entre la structure du nucléole et le taux hormonal

L'étude quantitative de l'activité cérébrale réalisée par DURCHON et PORCHET (1970) nous a permis de faire correspondre chaque étape de l'évolution nucléolaire à un taux déterminé d'hormone cérébrale (Schéma 1). En prenant comme test le déclenchement de la spermatogenèse de N. diversicolor, ces auteurs ont dosé l'activité cérébrale de femelles d'âges divers. La mesure de l'activité cérébrale donne une idée du taux d'hormone. Le diamètre ovocytaire moyen étant le critère utilisé pour évaluer l'âge des animaux, une courbe de l'activité endocrine du cerveau a été tracée en fonction du diamètre des ovocytes.

Les différentes phases de l'évolution du nucléole ont été confrontées aux étapes de l'ovogenèse et aux variations de l'activité hormonale correspondantes.

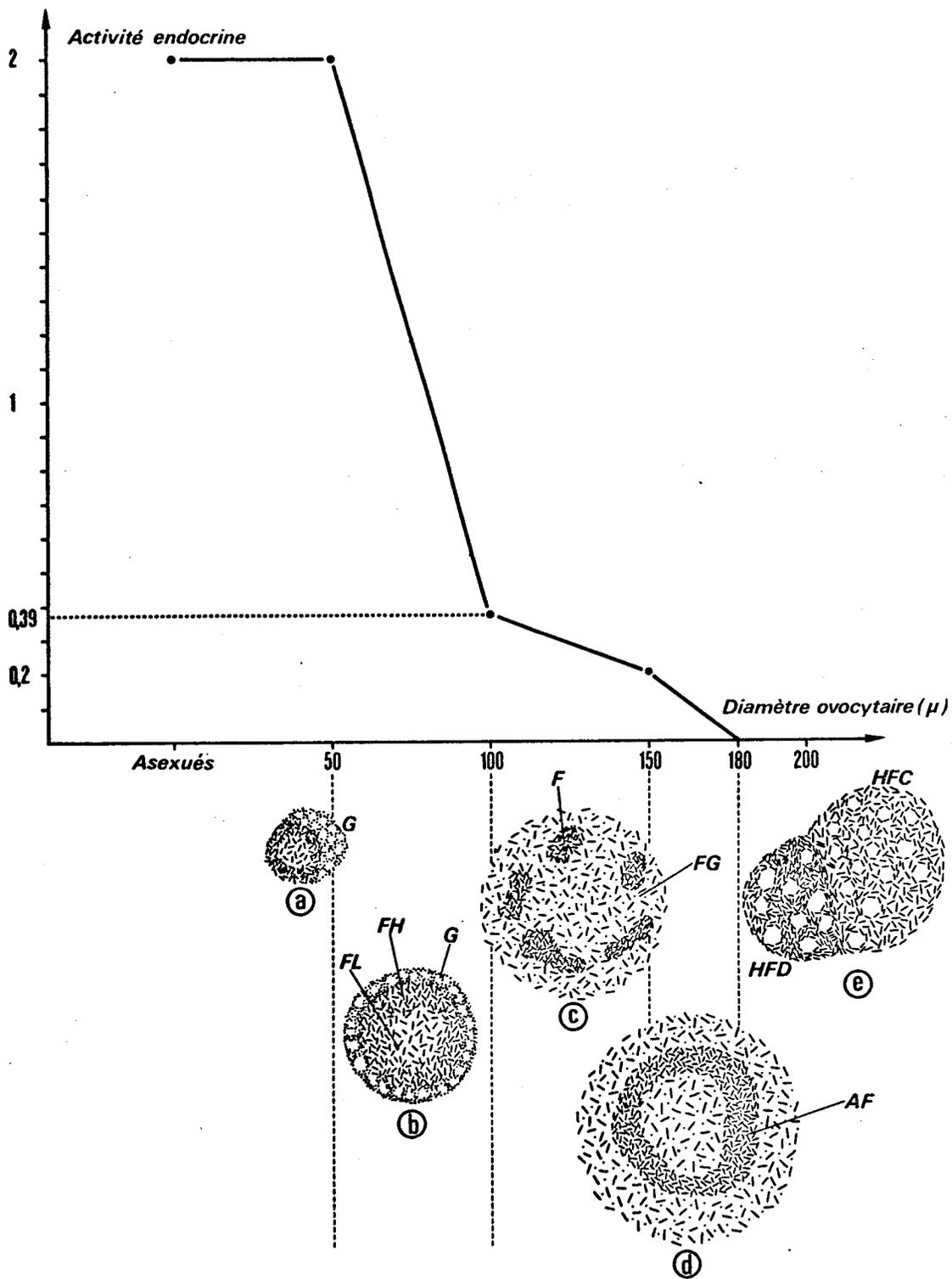
- Ovocytes d'un diamètre inférieur à 50  $\mu$  (Prévitellogenèse et début de la vitellogenèse). Activité hormonale maximale (2). Apparition et extension de la zone granulaire en trabécules (Schéma 1 a).

- Ovocytes de 50 à 100  $\mu$  (Vitellogenèse). Diminution rapide de l'activité hormonale (de 2 à 0,4). L'élaboration et l'effritement de la zone granulaire sont très intenses (Schéma 1 b).

## SCHEMA 1

Evolution du nucléole en fonction de l'activité endocrine cérébrale.  
Courbe de l'activité endocrine en fonction du diamètre ovocytaire  
d'après DURCHON et PORCHET (1970).

- a - Elaboration de la zone granulaire (G) en trabécules au début de la phase de vitellogenèse protéique.
- b - Structure du nucléole au cours de la phase de vitellogenèse protéique : zone fibrillaire lacunaire (FL), zone fibrillaire homogène (FH), zone granulaire (G).
- c - Structure du nucléole au cours de la phase d'élaboration des glucides : plages fibrillaires (F) dispersées dans le composant fibrillo-granulaire (FG).
- d - Regroupement des plages fibrillaires en un anneau (AF) à la fin du stade d'élaboration des glucides.
- e - Ségrégation des constituants nucléolaires chez les ovocytes matures.  
**HFD** : hémisphère fibrillaire dense. **HFC** : hémisphère fibrillaire clair.



- Ovocytes de 100 à 150  $\mu$  (Fin de la vitellogenèse, début de la phase d'élaboration des glucides). Diminution lente de l'activité hormonale (de 0,4 à 0,2). On assiste à la disparition de la zone granulaire typique et à son remplacement par une zone fibrillo-granulaire (Schéma 1 c).

- Ovocytes de 150 à 180  $\mu$  (Phase d'élaboration des glucides). Dernière diminution de l'activité hormonale qui devient nulle. Dégranulation de la zone fibrillo-granulaire et regroupement du constituant fibrillaire (Schéma 1 d).

- Ovocytes d'un diamètre supérieur à 180  $\mu$  (Maturité). Activité hormonale nulle. Ségrégation des constituants nucléolaires. Vacuolisation et dislocation du nucléole (Schéma 1 e).

L'évolution nucléolaire est donc étroitement liée au taux d'hormone cérébrale. En particulier, la zone granulaire en trabécules, spécifique de la phase de vitellogenèse, semble corrélative d'un taux hormonal élevé. Elle disparaît après une diminution rapide de la quantité d'hormone produite par le cerveau. Par contre, l'organisation nucléolaire typique de la période d'élaboration des glucides ne se constitue qu'en dessous d'un seuil se situant aux environs de 0,4.

CHAPITRE II

EVOLUTION DU NUCLEOLE AU COURS DE L'OVOGENESE EXPERIMENTALE

RAPPELS DES TRAVAUX EXPERIMENTAUX EFFECTUES SUR L'OVOGENESE DE N. DIVERSICOLOR

L'effet de la suppression du facteur hormonal sur l'évolution ovocytaire, a été étudiée, chez N. diversicolor, par deux méthodes : in vivo, après décérébration des animaux, et in vitro, par isolement des parapodes en culture organotypique.

In vivo, une comparaison entre les ovocytes subissant l'inhibition cérébrale et les ovocytes évoluant en absence de cerveau a été réalisée du point de vue biométrique, cytochimique et autoradiographique (BERTOUT et DHAINAUT, 1971). La suppression du facteur hormonal provoque une augmentation du volume ovocytaire après une période de latence de 5 jours.

L'étude cytochimique permet de constater que les ovocytes acquièrent une structure particulière qui n'est jamais observée au cours de l'ovogenèse naturelle. Après une évolution expérimentale de 3 à 4 semaines, l'ARN cytoplasmique se concentre en une zone basophile entourant le noyau tandis que les globules lipidiques et les granules vitellins sont repoussés à la périphérie de la cellule. Cette maturation expérimentale aboutit à une dégénérescence.

Les résultats autoradiographiques montrent que les synthèses d'ARN sont très intenses au cours de la phase précoce de l'ovogenèse expérimentale (jusqu'à 10 à 15 jours après la décérébration) et qu'elles diminuent ensuite pour devenir insignifiantes après 20 jours d'évolution en condition an hormonale. Les synthèses protéiques sont également très élevées, jusqu'au 15<sup>e</sup> jour de l'expérience, mais l'incorporation d'acides aminés radioactifs n'est plus suivie d'un marquage au niveau des granules vitellins. La suppression brutale de la source hormonale se traduit donc par un arrêt précoce de la vitellogenèse protéique et une nouvelle orientation des synthèses ovocytaire (BERTOUT et DHAINAUT, 1971). La phase tardive de l'évolution expérimentale voit les synthèses de protéines devenir pratiquement nulles.

L'évolution ovocytaire après expérimentation in vivo a été également étudiée au microscope électronique (DHAINAUT, 1970 a). Les modifications de l'appareil de Golgi sont particulièrement intéressantes. En effet, après avoir élaboré un nombre restreint d'organites corticaux, les dictyosomes entrent rapidement en dégénérescence.

In vitro, une évolution ovocytaire comparable a été observée en absence d'hormone. La culture organotypique a permis, en outre, par l'association de prostomiums à des parapodes en cours d'évolution en condition an hormonale, d'étudier l'effet d'un rétablissement de l'inhibition cérébrale sur l'ovogenèse

expérimentale. Les résultats obtenus montrent que la réassociation d'un prostomium à un parapode isolé, pendant une période inférieure à 6 jours, inhibe le processus de maturation expérimentale et de dégénérescence (DURCHON et al., 1965).

## TECHNIQUES

### Expérimentation in vivo

Les animaux sont coupés en deux tronçons par une section transversale dans la région médiane du corps. Chacun des deux fragments est isolé dans un récipient d'élevage et maintenu à une température variant de 10 à 15° C.

Les ovocytes de la région postérieure se trouvent ainsi soustraits à l'action de l'hormone cérébrale tandis que la région antérieure continue à subir l'influence endocrine du cerveau et sert de témoin.

### Expérimentation in vitro (culture organotypique)

Les vers sont isolés pendant 4 jours en eau de mer stérile additionnée d'antibiotiques. Après dissection, les parapodes sont cultivés à 20° C sur milieu semi-solide selon la technique de WOLF. La composition du milieu de culture gélosé est celle mise au point par DURCHON et SCHALLER (1963).

Les ovocytes des parapodes isolés évoluent en absence d'hormone cérébrale. Les ovocytes témoins sont obtenus en associant un parapode à un prostomium d'individu jeune.

Lors de l'étude autoradiographique, une variante de cette méthode nous a permis d'obtenir un grand nombre d'ovocytes maintenus dans des conditions standards tout en évitant l'accélération des processus provoquée par la température de culture (20° C). Dix parapodes sont associés entre-eux, avec ou sans prostomium. Après 48 heures de culture à 20° C sur milieu gélosé, durée suffisante pour permettre la soudure des différents organes entre-eux, les organismes ainsi obtenus sont transférés, à 10° C, en salières contenant de l'eau de mer stérile, additionnée du précurseur tritié.

## RESULTATS

Cette étude a été réalisée sur des ovocytes provenant soit de parties postérieures d'animaux sectionnés en deux tronçons, soit de cultures de parapodes isolés. Les modifications observées au niveau du nucléole sont identiques dans les deux cas. La seule différence entre ces deux processus expérimentaux réside dans la durée de l'évolution nucléolaire. Très variable in vivo, elle est remarquablement constante et reproductible dans le cas des parapodes isolés. Les cultures organotypiques offrent, en effet, la possibilité d'expérimenter dans des conditions standards. Cette technique permet, en particulier, d'examiner l'évolution d'ovocytes provenant d'une même lignée cellulaire. En conséquence, la majeure partie de nos résultats a été obtenue grâce à cette méthode d'expérimentation.

### I - ETUDE AU MICROSCOPE PHOTONIQUE

#### A - EFFETS DE LA SUPPRESSION DU FACTEUR HORMONAL SUR L'EVOLUTION NUCLEOLAIRE

##### 1 - Etude cytochimique après expérimentation in vitro à 20 ° C

Les méthodes de mise en évidence de l'ARN et des protéines ont été appliquées sur les ovocytes de parapodes fixés tous les 6 jours.

Dès le 6e jour de culture, le matériel nucléolaire coloré par le bleu de toluidine à pH 4,2 est concentré à la périphérie de l'organite. En section, le nucléole se présente sous **forme d'un anneau basophile** (Pl. XIV, fig. 55). La coloration des protéines basiques selon ALFERT et GESWIND est très intense au niveau de cet anneau. La région centrale du nucléole n'est que faiblement colorée par cette méthode (Pl. XIV, fig. 56).

A partir du 12e jour après la mise en culture, le nucléole annulaire fait place à un nucléole de structure hétérogène qui rappelle celui de la phase de maturation naturelle (Chapitre I). Le matériel nucléolaire se ségrège en deux hémisphères : l'un est finement vacuolisé et basophile, l'autre est d'aspect homogène et de caractère acidophile.

2 - Etude cytochimique après expérimentation in vivo

L'expérimentation in vivo permettant de disposer d'une quantité de matériel plus importante, nous avons pu réaliser une étude plus complète des nucléoles ségrévés, chez des ovocytes fixés après 3 à 4 semaines d'évolution (Tableau 3).

Tableau 3 - Caractères cytochimiques des différentes zones du nucléole ségrévé après suppression expérimentale du facteur hormonal.

Zones Nucléolaires	ARN	Protéines basiques liées à l'ARN	Protéines basiques libres	Acidophilie totale (NH <sub>2</sub> libres)	Protéines acides	Protéines sulfhydrilées
Zone vacuolisée	+	++	-	+	-	-
Zone homogène	-	+	+	++	++	+

- ARN : Seul l'hémisphère vacuolisé se colore par le bleu de toluidine à pH 4,2 (Pl. XIV, fig. 57), comme nous l'avons déjà observé in vitro. La colorabilité de cette zone basophile est abolie après digestion par la ribonucléase.

- Protéines basiques : La réaction d'ALFERT et GESCHWIND colore plus intensément l'hémisphère vacuolisé basophile que l'hémisphère homogène acidophile (Pl. XIV, fig. 58 et 59). Si l'on omet l'hydrolyse préalable des acides nucléiques par le TCA, l'hémisphère vacuolisé devient totalement incolore. Ce résultat est dû à la présence de l'ARN préalablement mis en évidence dans cette partie du nucléole. (Pl. XIV, fig. 60)

- Protéines acides et sulfhydrilées : Les protéines acides sont pratiquement absentes de l'hémisphère basophile. Elles sont par contre très abondantes dans l'autre partie du nucléole (Pl. XIV, fig. 61). Les protéines sulfhydrilées ont une répartition absolument identique à celle des protéines acides (Pl. XIV, fig. 62).

Des formations sphériques de petite taille (2 à 3  $\mu$ ), dont la réfringence est identique à celle du nucléole sont souvent visibles dans le nucléoplasme des ovocytes possédant un nucléole ségrévé. Ces formations ne fixent pas le bleu de toluidine à pH 4,2 mais présentent une réaction positive aux techniques de mise en évidence des divers types de protéines (Pl. XIV, fig. 61).

-Evolution expérimentale du nucléole en fonction de stade ovocytaire initial :

L'étude cytochimique a surtout porté sur des ovocytes en phase de vitellogenèse protéique (diamètre inférieur à 100  $\mu$ ) lors de la suppression expérimentale de l'hormone cérébrale. Dans ce cas, le nucléole passe d'une forme annulaire à une forme ségréguée.

La levée expérimentale de l'inhibition hormonale chez des ovocytes en phase d'élaboration des glucides (diamètre de 150  $\mu$  environ) ne provoque qu'une évolution nucléolaire expérimentale incomplète. Le nucléole subit la ségrégation de ses constituants (Pl. XIV, fig. 59) sans passer par la forme annulaire.

3 - Etude autoradiographique des synthèses d'ARN après expérimentation in vitro à 10° C

Ce travail a été réalisé sur des organismes formés de parapodes soudés entre eux et placés en eau de mer stérile à 10° C, selon la méthode décrite dans le paragraphe "matériel et techniques".

L'expérimentation ne porte que sur des ovocytes initialement en période de vitellogenèse protéique, d'un diamètre de 80  $\mu$  environ.

- Parapodes placés pendant 48 h en présence d'uridine tritiée, après 10 jours d'évolution en absence d'hormone

A ce stade, le nucléole présente une forme annulaire. Le marquage nucléolaire est limité à l'anneau périphérique ; aucun grain d'argent n'est visible dans la région centrale (Pl. XV, fig. 63). La radioactivité des ovocytes maintenus en milieu an hormonal est plus élevée que celle des ovocytes témoins, notamment au niveau du cytoplasme (Pl. XV, fig. 63 et 64).

- Parapodes placés pendant 48 h en présence d'uridine tritiée, après 22 jours d'évolution en absence d'hormone

Les synthèses ribonucléiques sont pratiquement nulles par rapport à celles des témoins. Le nucléole qui a subi la ségrégation de ses constituants, ne présente que quelques grains d'argent dispersés aussi bien au niveau de l'hémisphère basophile que de l'hémisphère acidophile (Pl. XV, fig. 65).

- Parapodes placés pendant 48 h en présence d'uridine tritiée, après 10 jours d'évolution en absence d'hormone et fixés au 22ème jour

La radioactivité des ovocytes est très élevée. Les nucléoles sont de type ségrégué comme dans le cas de la série expérimentale précédente mais leur marquage est très intense. Celui-ci n'est pas réparti uniformément dans tout l'organite mais concentré dans l'hémisphère acidophile (Pl. XV, fig. 66).

B - EFFETS DU RETABLISSEMENT DU FACTEUR CEREBRAL SUR  
L'EVOLUTION EXPERIMENTALE DU NUCLEOLE

Cette étude a été effectuée à partir de séries expérimentales réalisées par DURCHON et al. (1965) qui avaient surtout examiné l'évolution cytoplasmique des ovocytes. La manipulation avait consisté à associer, tous les 3 jours, des prostomiums à des parapodes initialement isolés. Ces associations parapode-prostomium avaient été fixées après une durée totale de culture de 24 jours.

- Les ovocytes des parapodes associés à un prostomium après 3 jours d'évolution en absence d'hormone conservent une structure analogue à celle des ovocytes témoins. L'ARN cytoplasmique est régulièrement réparti entre les granules vitellins. La majorité des nucléoles ne subit pas de modifications. Seuls quelques-uns d'entre-eux présentent une forme annulaire (Pl. XV, fig. 67).

- Les ovocytes remis en présence du facteur hormonal le 6ème jour et fixés après une évolution totale de 24 jours montrent une concentration de l'ARN cytoplasmique autour du noyau. La ségrégation nucléolaire s'est produite (Pl. XV, fig. 68). L'observation de parapodes fixés après 6 jours de culture en absence de cerveau permet de constater que les nucléoles se trouvaient sous une forme annulaire au moment de la réassociation (Pl. XV, fig. 69).

- Le rétablissement de l'action hormonale après 9 jours d'évolution en absence de cerveau n'empêche pas la dégénérescence ovocytaire.

Ces résultats montrent donc que le rétablissement de l'inhibition hormonale chez des ovocytes préalablement soustraits à l'influence du cerveau est capable d'empêcher le processus de maturation expérimentale à condition d'opérer avant une période critique. Celle-ci se situe du 3e au 6e jour et correspond au moment où le nucléole annulaire se développe. Passé ce stade de l'évolution nucléolaire, l'association d'un cerveau ne provoque qu'un retard de la dégénérescence ovocytaire.

II - ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

Les modifications expérimentales de l'évolution nucléolaire étant plus importantes chez des ovocytes en cours de vitellogenèse protéique lors de la levée de l'inhibition hormonale (étude au microscope photonique), les observations au microscope électronique ont surtout été réalisées sur ce type de matériel. Les transformations ultrastructurales subies en absence d'hormone par les nucléoles d'ovocytes d'âges différents ont été récapitulées dans le Schéma 2.

1 - Stade du nucléole annulaire

a - Formation du nucléole annulaire

Après 24 heures de culture organotypique à 20° C en condition anormale, la structure du nucléole ne change pas par rapport au moment du prélèvement de l'explant. On observe les 3 parties du nucléole de l'ovocyte en période de vitellogenèse : zone centrale fibrillaire finement vacuolisée, zone intermédiaire fibrillaire homogène, zone corticale granulaire (Pl. XVI, fig. 70). La disposition en trabécules de cette dernière est très nette (Pl. XVI, fig. 71). Il semble que le composant granulaire soit beaucoup plus développé que chez les ovocytes de même taille évoluant dans les conditions naturelles (Pl. VI, fig. 31 et Pl. XVI, fig. 71). Toutefois, le nombre de nucléoles examinés au microscope électronique est trop restreint pour permettre une conclusion valable.

Au 2<sup>e</sup> jour de l'expérience certains nucléoles présentent, en section, une forme annulaire par suite de développement, dans la partie centrale, d'une zone de très faible densité aux électrons (Pl. XVI, fig. 72). Nous avons appliqué à cette dernière le terme de vacuole.

b - Structure du nucléole annulaire au 3<sup>e</sup> jour (Schéma 2 b)

Après 3 jours de culture, tous les nucléoles examinés possèdent une vacuole centrale. Elle atteint, en moyenne, un diamètre de 5  $\mu$  pour une taille nucléolaire de 11  $\mu$ , chez des ovocytes de 60  $\mu$  au moment de la mise en culture (Pl. XVII, fig. 73).

. Anneau nucléolaire

Il est constitué de plages fibrillaires dispersées dans le composant granulaire (Pl. XVII, fig. 74). La disposition en trabécules de ce dernier tend à disparaître. Cette ultrastructure nucléolaire rappelle celle des ovocytes en période d'élaboration des glucides dans les conditions naturelles (Chapitre I, Pl. IX, fig. 39 et 41). Le constituant granulaire semble donner naissance aux granulations nucléoplasmiques (Pl. XVIII, fig. 75 et 76) selon le processus décrit au cours de l'ovogenèse naturelle.

. Vacuole centrale

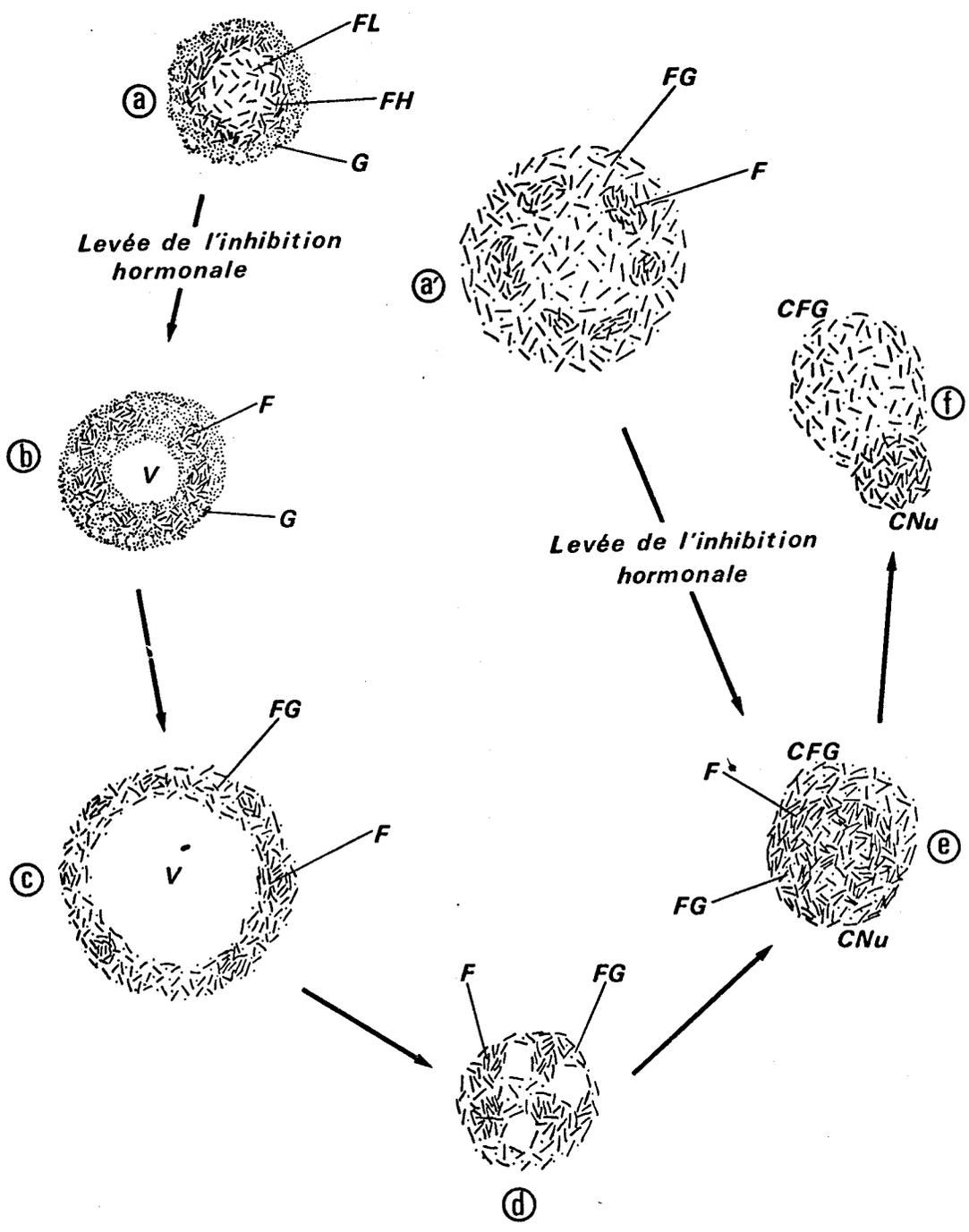
La vacuole centrale possède une densité aux électrons légèrement plus élevée que celle du nucléoplasme. Le contenu vacuolaire est constitué de granules de 150 Å dispersés parmi un matériel amorphe lâchement organisé (Pl. XVIII, fig. 75). Ces composants de la vacuole proviennent vraisemblablement de la dispersion du constituant granulaire de l'anneau. On observe

## SCHEMA 2

Evolution du nucléole après suppression expérimentale de l'influence endocrine cérébrale.

- a et a' - Structure des nucléoles au moment de la décérébration (expérimentation in vivo) ou de la mise en culture (expérimentation in vitro) a : nucléole d'ovocyte en période de vitellogenèse protéique, a' : nucléole d'ovocyte en période d'élaboration des glucides (Abréviations identiques à celles du schéma 1).
- b - Nucléole annulaire (3 jours de culture). L'anneau nucléolaire est constitué de plages fibrillaires (F) dispersées dans le composant granulaire (G). V : vacuole centrale.
- c - Extension maximale de la vacuole (6 jours de culture). L'anneau nucléolaire est constitué de plages fibrillaires dispersées dans le composant fibrillo-granulaire (FG).
- d - Régression de la vacuole (7 jours de culture).
- e - Formation de la coiffe nucléolaire (10 jours de culture). Le corps nucléolaire (CNu) est composé d'un réseau fibrillaire (F) et de plages fibrillo-granulaires (FG). CFG : coiffe fibrillo-granulaire.
- f - Nucléole ségrégué (20 jours de culture).

Seuls les nucléoles des ovocytes en période de vitellogenèse protéique (a) présentent la phase précoce de l'évolution (stade du nucléole annulaire). Les nucléoles des ovocytes plus âgés (a') subissent la ségrégation de leurs constituants sans jamais présenter de vacuole centrale.



en effet une fragmentation du bord de la vacuole en formations de 1000 à 2000 Å dont les constituants : granules et matrice amorphe, se dissocient à l'intérieur de la vacuole (Pl. XVII, fig. 74 et Pl. XVIII, fig. 75). Dans le cytoplasme, il ne se produit aucune modification dans la structure des organites. En particulier la morphologie de l'appareil de Golgi n'a pas varié et est toujours caractéristique de la période de vitellogenèse protéique (Pl. XVIII, fig. 77).

c - Structure du nucléole annulaire au 6e jour (Schéma 2 c)

Au 6e jour de l'expérimentation in vitro, la vacuole atteint un volume considérable. Son diamètre est en effet de 11  $\mu$  tandis que la largeur de l'anneau nucléolaire ne dépasse par 0,8  $\mu$  (Pl. XIX, fig. 78 et 79). Un tel développement de la vacuole est également observé in vivo (Pl. XIX, fig. 80), 15 à 20 jours après la décérébration.

. Anneau nucléolaire

Le composant granulaire a fait place à un matériel de nature fibrillo-granulaire. Celui-ci présente un aspect homogène à la suite de la disparition complète de l'organisation en trabécules (Pl. XIX, fig. 79 et 81). A ce stade de l'évolution expérimentale, les constituants de l'anneau nucléolaire possèdent une structure tout à fait identique à celle du nucléole de l'ovocyte en période d'élaboration des glucides au cours de l'ovogenèse naturelle.

. Vacuole centrale

Le processus d'élaboration du contenu de la vacuole se poursuit (Pl. XIX, fig. 79). Dans certains cas, les formations de 1000 à 2000 Å issues de la fragmentation du bord vacuolaire persistent un certain temps dans la vacuole avant de se dissocier (Pl. XIX, fig. 81).

Dans le cytoplasme, l'examen des dictyosomes permet de constater une diminution du nombre de vésicules golgiennes participant à l'accroissement des granules vitellins. Cet indice de la modification de l'activité de l'appareil de Golgi reste toutefois très discret (Pl. XIX, fig. 82).

2 - Stade du nucléole ségrégué

Pour des durées de culture en absence d'hormone supérieures à 6 jours, on assiste à la régression de la vacuole centrale puis à la ségrégation des constituants du nucléole. En même temps, des formations nucléoplasmiques apparaissent dans la zone sous-jacente à l'enveloppe nucléaire.

a - Nucléole

. Régression de la vacuole centrale (Schéma 2 d)

Après avoir atteint une taille maximale au 6<sup>e</sup> jour, la vacuole nucléolaire disparaît rapidement. Corrélativement, le volume du nucléole diminue. Son diamètre passe de 13 à 8  $\mu$  en 24 heures (Pl. XX, fig. 83). Il ne subira pratiquement plus de variations jusqu'à la fin de l'évolution expérimentale.

La rapidité du phénomène n'a pas permis d'en observer tous les stades, bien que des fixations journalières aient été effectuées. Dès le 7<sup>e</sup> jour de l'expérimentation, la plupart des ovocytes renferme un nucléole d'aspect compact (Pl. XX, fig. 83). La grande vacuole centrale a fait place à plusieurs petites vacuoles ne dépassant pas 4  $\mu$  de diamètre (Pl. XX, fig. 83 et 84).

Ces vacuoles de petite taille sont souvent rejetées à la périphérie de l'organite (Pl. XX, fig. 84). Seul un fin cordon de 2000 à 3000 Å sépare le contenu vacuolaire du nucléoplasme. L'organisation du matériel fibrillogranulaire constituant ce cordon étant extrêmement lâche (Pl. XX, fig. 85), il est possible que la rupture de celui-ci soit le processus par lequel les vacuoles libèrent leur contenu dans le nucléoplasme. L'aspect très granuleux de ce dernier pendant ce stade de l'évolution expérimentale paraît renforcer cette hypothèse (Pl. XX, fig. 84 et 85).

. Formation de la coiffe nucléolaire (Schéma 2 e)

Après 10 jours d'évolution in vitro, le nucléole est constitué de deux parties de tailles inégales (Pl. XXI, fig. 86). Pour faciliter l'exposé, nous employerons le terme de "corps nucléolaire" pour qualifier la partie de plus grande dimension tandis que le terme de "coiffe nucléolaire" sera réservé à la zone de plus petite taille.

Le corps nucléolaire contient les deux composants du nucléole : fibrillaire et fibrillo-granulaire (Pl. XXI, fig. 86). Le constituant fibrillaire forme un réseau dense aux électrons. Les mailles de ce réseau sont occupées par le matériel fibrillo-granulaire, de plus faible densité (Pl. XXI, fig. 86 et 87).

La coiffe nucléolaire se développe à l'un des pôles du corps nucléolaire. Elle est uniquement de nature fibrillo-granulaire et présente de ce fait un aspect beaucoup plus homogène (Pl. XXI, fig. 86).

La périphérie des deux parties du nucléole est occupée par un 3<sup>e</sup> composant disposé en trabécules. Il est formé de granules de 200 à 250 Å enrobés dans une matrice dense (Pl. XXI, fig. 86 et 87). Ce matériel se fragmente en formations de 500 à 1000 Å qui se dispersent dans le nucléoplasme (Pl. XXI, fig. 87).

. Structure du nucléole ségrégué (Schéma 2 f)

Pour des durées d'évolution in vitro supérieures à 10 jours, la ségrégation entre les composants fibrillaire et fibrillo-granulaire se poursuit par la migration de ce dernier depuis le corps nucléolaire vers la coiffe nucléolaire.

Au 20<sup>e</sup> jour, la coiffe fibrillo-granulaire possède un diamètre près de deux fois supérieur à celui du corps nucléolaire (Pl. XXII, fig. 88). Celui-ci est alors essentiellement de nature fibrillaire (Pl. XXII, fig. 89 et 90). Seules quelques plages claires de 0,5 à 1  $\mu$  sont encore occupées par le constituant fibrillo-granulaire (Pl. XXII, fig. 88). La couronne de matériel granulaire est souvent plus développée à la périphérie du corps nucléolaire que de la coiffe fibrillo-granulaire (Pl. XXII, fig. 91).

Une comparaison entre les figures 89 et 91 de la Planche XXII permet de constater que la structure des nucléoles ségrégués est constante quel que soit le stade ovocytaire au moment de la levée expérimentale de l'inhibition hormonale (Schéma 2).

La ségrégation des composants du nucléole que nous venons de décrire diffère par certains aspects de la ségrégation survenant pendant la phase de maturation naturelle (Chapitre I, Pl. XI, fig. 47). D'une part, nous n'avons jamais observé la vacuolisation ni la fragmentation du nucléole au <sup>terme</sup> cours de l'évolution expérimentale. D'autre part, la ségrégation entre le constituant fibrillaire et le matériel fibrillo-granulaire n'est pas précédée d'une dégranulation de ce dernier comme dans le cas de l'ovogenèse naturelle.

b - Formations nucléoplasmiques

. Vésicules intranucléaires

Chez les ovocytes dont le nucléole est en cours de ségrégation, la zone nucléoplasmique sous-jacente à l'enveloppe nucléaire renferme des vésicules intranucléaires (DHAINAUT, 1969 b).

Très peu nombreuses avant l'amorce du processus de la ségrégation nucléolaire, leur nombre devient très élevé dès le début de la formation de la coiffe fibrillo-granulaire (Pl. XXIII, fig. 92). A ce stade, chaque vésicule possède en général 3 ou 4 granules denses. Par la suite, le nombre de granules par vésicule augmente mais la densité du matériel constituant ces granules diminue. Au 20e jour, le contenu des vésicules est d'une densité analogue à celle du nucléoplasme (Pl. XXIII, fig. 93).

#### Micronucléoles

La zone nucléoplasmique périphérique présente, en alternance avec les vésicules intranucléaires, des formations de 1 à 2  $\mu$  dont la densité aux électrons rappelle celle du matériel nucléolaire. Nous leur avons attribué le terme de micronucléole bien que leur élaboration à partir du nucléole n'ait pas été observée. Les micronucléoles se répartissent en deux catégories selon leur densité plus ou moins élevée (Pl. XXIII, fig. 94).

Les micronucléoles clairs sont généralement de forme .....  
irrégulière et fréquemment en relation avec les vésicules intranucléaires. L'examen à fort grossissement permet d'observer des granules de 150 Å dispersés dans un matériel fibrillaire (Pl. XXIII, fig. 95). La nature fibrillo-granulaire de ces formations semble identique à celle de la coiffe nucléolaire.

Les micronucléoles denses ont une forme sphérique. Nous .....  
ne les avons jamais observés en contact avec les vésicules intranucléaires. Ils sont constitués de fibrilles de 50 à 80 Å disposées en un feutrage très dense. Ce matériel est organisé en trabécules anastomosés limitant des lacunes de 500 Å de largeur. Les trabécules les plus externes se dissocient dans le nucléoplasme (Pl. XXIII, fig. 96).

Ces deux types de formations diffèrent profondément des micronucléoles décrits au cours de la phase de maturité de l'ovogenèse naturelle (Chapitre I, Pl. XIII, fig. 52).

## DISCUSSION

### I - RELATIONS ENTRE LES RESULTATS CYTOCHIMIQUES ET LES OBSERVATIONS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

#### 1 - Nucléole annulaire

##### a - Anneau nucléolaire

La suppression du facteur hormonal chez les ovocytes en phase de vitellogenèse protéique induit la formation d'une vacuole dans la région centrale du nucléole. En section, cette vacuole donne au nucléole un aspect annulaire. L'anneau nucléolaire se distingue de la vacuole centrale par sa teneur beaucoup plus élevée en ARN et en protéines.

La nature ribonucléoprotéique des constituants de l'anneau nucléolaire a été démontrée chez d'autres types cellulaires : cellules sanguines (SMETANA et al., 1966 ; BUSCH et SMETANA, 1970), gonocytes de Reptile (HUBERT, 1970 a), ovocytes d'Echinoderme (ESPER, 1965).

Sur notre matériel, l'observation au microscope électronique permet de constater que cet anneau basophile est constitué des composants fibrillaire et granulaire rencontrés, au cours de l'ovogenèse naturelle, ~~chez~~<sup>deux</sup> les nucléoles non vacuolisés.

Dans les cellules de méristèmes d'Allium (CHOUINARD, 1966) et les gonocytes de Lacerta (HUBERT, 1970 b) l'anneau nucléolaire est constitué, comme dans les ovocytes de N. diversicolor en évolution expérimentale, par des plages fibrillaires dispersées dans le composant granulaire.

##### b - Vacuole centrale

Nous avons pu suivre le processus d'élaboration de la vacuole nucléolaire dans l'ovocyte de Néréidien. L'augmentation du volume de la vacuole résulte d'un étirement de l'ensemble du nucléole produisant un amincissement de l'anneau nucléolaire. Le contenu vacuolaire (matrice lâchement organisée et granules dispersés) semble provenir de la dispersion du matériel granulaire constituant le bord interne de l'anneau nucléolaire.

La présence, dans la vacuole, de granules morphologiquement identiques aux granules ribonucléoprotéiques de l'anneau a été observée dans les gonocytes de Léopard (HUBERT, 1970 b) et dans les cellules de plusieurs espèces végétales (HYDE, 1966 ; CHOUINARD, 1966 ; JOHNSON, 1969 ; ROSE et al., 1972). Par contre, la zone centrale claire des nucléoles de lymphocytes matures (SMETANA et al., 1968) et d'hépatocytes traités par l'aflatoxine B<sub>1</sub> (TERAO et al., 1971) renfermerait des fibrilles de chromatine.

## 2 - Nucléole ségrégé

La résorption de la vacuole est suivie de la ségrégation des constituants nucléolaires. Le nucléole ségrégé est formé de deux parties qui se différencient par leurs caractères cytochimiques et ultrastructuraux.

Le "corps nucléolaire" apparaît constitué, au microscope électronique, d'un matériel fibrillaire dense aux électrons. L'étude cytochimique montre qu'il renferme essentiellement de l'ARN et des protéines basiques.

La "coiffe nucléolaire", de structure fibrillo-granulaire, semble uniquement composée de protéines. Parmi celles-ci, l'étude cytochimique a permis de mettre en évidence des fractions basiques, acides et sulfhydrilées.

Le nucléole ségrégé de l'ovocyte de N. diversicolor présente les caractères cytochimiques des "amphinucléoles" décrits chez les ovocytes matures d'invertébrés (FAHMY, 1949 ; RAVEN, 1961). Au microscope électronique, la redistribution des composants nucléolaires observée sur notre matériel montre des analogies avec la ségrégation nucléolaire survenant dans les cellules de vertébrés au terme de leur différenciation (ADAMSTONE et TAYLOR, 1972) ou après l'action d'inhibiteurs métaboliques (revue dans BERNHARD et GRANBOULAN, 1968 ; SIMARD, 1970), l'infection virale (SIRTORI et BOSISIO-BESTETTI, 1967 ; WEISS et MEYER, 1972) ou la contamination par les mycoplasmes (JEZEQUEL et al., 1967).

## II - SYNTHESES D'ARN NUCLEOLAIRE PENDANT L'EVOLUTION EXPERIMENTALE

Du point de vue des synthèses ribonucléiques, l'ovogenèse expérimentale de N. diversicolor peut être divisée en 2 périodes (BERTOUT et DHAINAUT, 1971) : une phase précoce au cours de laquelle les synthèses d'ARN sont très intenses et une phase tardive qui se caractérise par un arrêt de l'incorporation de l'uridine. La présente étude met en évidence l'existence d'un type nucléolaire particulier à chacune de ces deux phases : annulaire pendant la phase précoce, ségrégé pendant la phase tardive. Nous envisagerons la relation entre la structure de l'organite et les synthèses ribonucléiques au cours de ces deux périodes successives.

### 1 - Nucléole annulaire

L'incorporation d'uridine tritiée, à différentes périodes de l'évolution ovocytaire en absence d'hormone, a permis de montrer que les synthèses d'ARN s'effectuent pendant la phase précoce de l'ovogenèse expérimentale, phase au cours de laquelle le nucléole présente une structure annulaire. De

plus, l'emploi des techniques autoradiographiques est suivie d'un marquage intense de l'anneau nucléolaire. Le développement d'une vacuole nucléolaire dans l'ovocyte de N. diversicolor coïncide par conséquent avec des synthèses ribonucléiques importantes.

Ce résultat concorde avec ceux obtenus dans les neurones de ganglions spinaux (PANNESE, 1963) et les cellules de tabac (JOHNSON, 1969). Par contre, dans de nombreux types cellulaires, la présence de nucléoles annulaires est l'indice de synthèses d'ARN très réduites ou nulles. C'est le cas des gonocytes de Reptile (HUBERT et ANDRIVON, 1972), de cellules végétales (ROSE et al., 1972), de cellules sanguines matures (SMETANA et al., 1966 ; POTMESIL et SMETANA, 1969), et de cellules ayant subi l'action d'inhibiteurs métaboliques (SMETANA et POTMESIL, 1968 ; POTMESIL et SMETANA, 1968 ; TERAO et al., 1971). Selon BUSCH et SMETANA (1970), la structure annulaire du nucléole est en relation avec la maturation et la différenciation des cellules et pourrait refléter une inhibition réversible des synthèses d'ARN.

En présence de résultats aussi contradictoires, il semble que la vacuolisation du nucléole ait des significations diverses selon les types cellulaires.

Chez N. diversicolor, la vacuole nucléolaire subit une augmentation de taille considérable. Inexistante au moment de la mise en culture (suppression du facteur hormonal), elle peut atteindre un diamètre de 11  $\mu$  en 6 jours. Après avoir atteint une taille maximale, la vacuole disparaît rapidement en 1 ou 2 jours.

Un tel processus de dilatation puis de contraction des vacuoles nucléolaires a été signalé chez les cellules végétales (JOHNSON, 1969 ; ROSE et al., 1972). Il est vraisemblable que le matériel vacuolaire se trouve rejeté à l'extérieur du nucléole bien que nous ne connaissions pas les modalités de ce processus. Selon ROSE et al. (1972), la vacuole jouerait un rôle dans l'accumulation et le transfert hors du nucléole d'un type particulier d'ARN.

## 2 - Nucléole ségrégué

L'étude autoradiographique montre que la ségrégation des composants nucléolaires s'accompagne d'un arrêt des synthèses d'ARN. De ce point de vue, la phase tardive de l'évolution expérimentale est comparable à la période de maturation naturelle. En effet, pendant celle-ci, la ségrégation nucléolaire (Chapitre I) marque la fin des synthèses ribonucléiques (D'HAINAUT, 1964)

Ces résultats sont en accord avec les nombreux travaux relatifs à la ségrégation nucléolaire. Il ressort de l'ensemble de ces études que cette modification de l'organisation du nucléole est liée à une inhibition de la synthèse de l'ARN (BUSCH et SMETANA, 1970 ; SIMARD, 1970 ; GIMENEZ-MARTIN et STOCKERT, 1970). Toutefois, dans le cas de la ségrégation provoquée par des antimétabolites, SIMARD et BERNHARD (1966) et GOLDBLATT et al. (1969) ont précisé que ce phénomène était plutôt le résultat d'une altération de l'ADN, qu'une conséquence directe de l'inhibition des synthèses d'ARN.

### III - EFFETS DE LA SUPPRESSION DE L'HORMONE CEREBRALE SUR L'EVOLUTION DU NUCLEOLE

L'étude de l'évolution du nucléole après suppression expérimentale du facteur hormonal nous a permis, d'une part, de confirmer les observations effectuées au cours de l'ovogenèse naturelle (existence d'une relation étroite entre la structure du nucléole et le taux d'hormone cérébrale), et d'autre part, d'apporter des précisions sur le contrôle hormonal de l'activité nucléolaire.

#### 1 - Relations entre l'évolution du nucléole et les variations expérimentales du taux hormonal

La chute brutale du taux d'hormone provoquée par la suppression expérimentale de la source hormonale détermine rapidement des modifications de la structure du nucléole. En dehors du développement de la vacuole centrale (voir paragraphe suivant), les modifications subies par cet organite sont comparables à celles que nous avons observées au cours de l'ovogenèse naturelle, lors du passage du stade de vitellogenèse protéique au stade d'élaboration des glucides.

Pendant la période tardive de l'ovogenèse expérimentale, on assiste à la ségrégation des constituants nucléolaires. Un phénomène semblable se produit au cours de la phase de maturité, au terme de l'ovogenèse naturelle. Il est intéressant de noter que, dans les deux cas, la ségrégation nucléolaire survient lorsque le taux hormonal est pratiquement nul.

En conclusion, nous pouvons dire que les variations du taux hormonal, qu'elles soient naturelles ou provoquées expérimentalement, s'accompagnent de modifications caractéristiques de la structure du nucléole.

## 2 - Action de la suppression expérimentale de l'hormone sur le développement de la vacuole nucléolaire

La modification la plus marquante de la structure du nucléole après la suppression expérimentale de l'inhibition hormonale est la présence d'une vacuole très développée. Nous avons également observé des vacuoles nucléolaires dans les ovocytes évoluant dans ~~les~~ conditions naturelles (Chapitre I). Toutefois, ces vacuoles ne prennent jamais un développement important.

Il est possible que la suppression **brutale** du facteur hormonal provoque l'amplification de la vacuolisation du nucléole, phénomène qui ne prend que des proportions modestes dans les conditions naturelles. L'extension considérable des vacuoles nucléolaires après la levée expérimentale de l'inhibition hormonale est vraisemblablement liée à l'accélération de l'ovogenèse démontrée dans un travail précédent (BERTOUT et DHAINAUT, 1971).

## 3 - Le nucléole, organite cible de l'action hormonale ?

L'observation simultanée du nucléole et de l'appareil de Golgi, dont on connaît le rôle important dans l'élaboration des réserves ovocytaires (DHAINAUT, 1967, 1968, 1969), nous a permis de constater que les conséquences de la levée expérimentale de l'inhibition cérébrale sont ressenties au niveau du nucléole bien avant d'être décelables dans le cytoplasme.

En effet, après 3 jours de culture organotypique, le nucléole subit des modifications profondes telles que la disparition de l'organisation en trabécules du constituant granulaire et le développement de la vacuole centrale. Par contre, à ce stade, la structure des dictyosomes n'a pas changé par rapport au moment de la mise en culture. Ce n'est qu'au 6<sup>e</sup> jour, alors que la vacuolisation du nucléole atteint son apogée, qu'apparaissent les premiers indices d'une nouvelle orientation de l'activité de l'appareil de Golgi.

Le contrôle hormonal de l'ovogenèse des Néréidiens pourrait s'effectuer primitivement au niveau du nucléole. Ce résultat est en accord avec les connaissances actuelles sur la régulation hormonale des synthèses cellulaires. En effet, cette régulation s'effectue, dans la majorité des cas, au niveau de la transcription de l'ARN, les cistrons ribosomiaux étant plus sensibles à l'influence hormonale que les autres cistrons (TATA, 1970).

Bien que le rôle du nucléole dans la synthèse de l'ARN ribosomal soit bien établi, peu de travaux ont été consacrés aux modifications subies par cet organite après une stimulation hormonale. Les rares études entre-

prises dans ce domaine ont été réalisées chez les Vertébrés grâce à des méthodes autoradiographiques (LIAO et STUMPF, 1968 ; GIRARD et JOST, 1970) ou histobiométriques (HEINIGER et al., 1971). Selon GIRARD et JOST (1970), la stimulation par le cortisol de la synthèse du glycogène s'effectuerait par l'intermédiaire d'une synthèse accrue d'ARN nucléolaire. Cette stimulation entraîne une modification de la structure du nucléole des hépatocytes (GIRARD et al., 1968).

CHAPITRE III

ACTION D'INHIBITEURS METABOLIQUES SUR L'EVOLUTION DU NUCLEOLE

Chez les Néréidiens, des travaux antérieurs ont montré que les modalités de la régulation de l'ovogenèse par l'hormone cérébrale sont complexes. En effet, l'hormone semble inhiber les synthèses d'ARN (DURCHON et al., 1965); par contre, elle serait nécessaire aux synthèses protéiques corrélatives de la vitellogenèse (BERTOUT et DHAINAUT, 1971). Le nucléole apparaissant particulièrement sensible à l'action hormonale, il était intéressant d'étudier l'évolution de cet organe après l'action d'inhibiteurs de la synthèse de l'ARN (Actinomycine D) et des protéines (Puromycine) et d'établir une comparaison avec l'influence de l'hormone.

## TECHNIQUES

### Emploi des inhibiteurs "in vivo"

L'actinomycine D ou la puromycine, en solution dans l'eau de mer, ont été injectées à des vers préalablement pesés. Nous avons utilisé des doses variant de 10 à 150  $\mu\text{g}$  par gramme de poids frais.

### Emploi des inhibiteurs "in vitro"

Les inhibiteurs ont été ajoutés au milieu de culture mis au point par DURCHON et SCHALLER (1963) à raison de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dans le cas de l'actinomycine D et de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dans le cas de la puromycine. Ces concentrations représentant les doses maximales qui permettent une survie des explants de quelques jours.

Les cultures ont été effectuées soit sur milieu gélosé, soit en milieu liquide selon la technique de CHEN (1954) afin d'assurer une meilleure répartition de l'inhibiteur. L'action de l'hormone sur les ovocytes est maintenue en associant des prostomiums aux parapodes.

Pour l'étude au microscope électronique, des explants sont fixés après 24 heures et 3 jours de culture en présence de l'un des inhibiteurs.

Dans le cas de l'étude autoradiographique, les associations parapode-prostomium, sont d'abord cultivées pendant 20 heures en présence d'actinomycine D ou de puromycine puis repiquées sur un milieu contenant à la fois l'inhibiteur et le précurseur tritié (uridine ou leucine) à la concentration de 2  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ . Les explants sont fixés après 4 heures et 48 heures d'incorporation et soumis aux techniques autoradiographiques.

Au cours de chaque étude (microscopie électronique, autoradiographie), des témoins subissent tous les traitements décrits, à l'exclusion de l'action des inhibiteurs.

## RESULTATS

### I - ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE

#### 1 - Incorporation d'uridine tritiée en présence d'actinomycine D

L'estimation globale de la densité des grains d'argent chez les ovocytes traités et chez les témoins ne permet pas de faire apparaître une variation sensible de la radioactivité après l'action de l'actinomycine D.

La cinétique de l'incorporation de l'uridine tritiée ne paraît pas modifiée par l'antibiotique ; elle semble en tout point semblable à celle qui a été décrite dans le chapitre I (Pl. III, fig. 17 et 18). Après un temps court d'incorporation (4 heures), la majorité du marquage est concentrée au niveau du nucléole. La radioactivité augmente dans le cytoplasme après 48 heures.

#### 2 - Incorporation de leucine tritiée en présence de puromycine

La puromycine ne provoque apparemment pas de diminution de l'incorporation de l'acide aminé par rapport aux ovocytes non traités (Chapitre I, Pl. III, fig. 19 et 20). Comme chez les témoins, le nucléole est le site cellulaire le plus radioactif après 4 heures d'incorporation. Après des temps plus longs (48 heures), le marquage diminue dans le nucléole et augmente dans le cytoplasme, notamment au niveau des granules vitellins.

### II - ETUDE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

#### 1 - Action de l'actinomycine D

L'observation au microscope électronique d'ovocytes ayant subi l'action de l'actinomycine D, in vivo ou in vitro, ne permet pas de déceler de transformations importantes, aussi bien au niveau du nucléole que des autres structures cellulaires.

Chez les ovocytes en phase de vitellogenèse protéique, le nucléole est composé, comme chez les ovocytes témoins, d'une zone centrale fibrillaire et d'un cortex granulaire (Pl. XXIV, fig. 97).

De même, l'organisation du nucléole des ovocytes en période d'élaboration des glucides n'est pas modifiée par l'antibiotique (Pl. XXIV, fig. 98).

## 2 - Action de la puromycine

Contrairement à l'actinomycine, la puromycine provoque des modifications sensibles de l'organisation du nucléole alors que les autres sites cellulaires semblent indemnes de toute altération.

Chez les ovocytes en période de vitellogenèse, cultivés pendant 3 jours en présence de puromycine, les 3 zones nucléolaires, caractéristiques de ce stade, sont présentes : centre fibrillaire lacunaire, zone fibrillaire homogène, cortex granulaire (Pl. XXIV, fig. 99). L'observation plus détaillée des constituants nucléolaires permet de déceler les modifications dues à l'action de la puromycine. La zone fibrillaire lacunaire comporte un nombre important de vacuoles dont certaines atteignent une taille de plusieurs microns (Pl. XXIV, fig. 99). Au niveau de la zone corticale, la puromycine semble entraîner une fragmentation du composant granulaire (Pl. XXIV, fig. 99).

## DISCUSSION

### I - ACTION DE L'ACTINOMYCINE D

L'action inhibitrice de l'actinomycine D sur la synthèse de l'ARN a été étudiée chez de nombreux organismes (revue dans GOLDBERG, 1965). Dans les cellules HeLa, PERRY (1963) a montré que l'ARN ribosomal d'origine nucléolaire était le plus sensible à l'action de cet antibiotique.

En ce qui concerne l'ovogenèse, des études autoradiographiques réalisées chez les Echinodermes (FICQ, 1964 ; GEUSKENS, 1965) et les Amphibiens (FICQ, 1964) montrent que l'actinomycine D inhibe l'incorporation des nucléotides tritiés. Cette inhibition est plus rapide dans les nucléoles que dans les autres sites cellulaires (FICQ, 1964 ; GEUSKENS, 1965).

Chez N. diversicolor, l'incorporation d'uridine tritiée par les ovocytes ayant subi l'action de l'antibiotique varie peu par rapport aux témoins. Il semble que le métabolisme ovocytaire ne soit pas modifié par l'actinomycine D aux doses (10 µg/ml) que nous avons utilisées dans nos expériences. Il ressort, des études effectuées chez diverses espèces, que les ovocytes constituent un type cellulaire dont l'inhibition des synthèses ribonucléiques requiert des doses relativement élevées d'actinomycine, de l'ordre de 20 à 50 µg/ml chez les Echinodermes par exemple (FICQ, 1964 ; GEUSKENS, 1965). Or, il n'est pas possible, chez N. diversicolor, d'augmenter la concentration de l'inhibiteur au-delà de 10 µg/ml, sans provoquer une mort très rapide des explants.

L'action de l'actinomycine sur les synthèses nucléolaires s'accompagne, dans les cellules de Vertébrés, d'une redistribution des constituants du nucléole (SCHOEFL, 1964). Cette modification de l'ultrastructure nucléolaire a été appelée "ségrégation nucléolaire" par BERNHARD et al. (1965). Chez les Invertébrés, l'action de l'actinomycine sur la structure du nucléole est peu connue. Les rares observations effectuées diffèrent de celles qui ont été réalisées chez les Vertébrés. Dans les glandes salivaires de larves de Diptères, l'inhibiteur entraîne la disparition de la zone granulaire externe qui est remplacée par un nouveau constituant de nature fibrillaire (STEVENS, 1964). Dans les ovocytes d'Astérie, des doses élevées (20 µg/ml) provoquent une fragmentation du cortex granulaire (GEUSKENS, 1965).

Aucune de ces altérations n'a été observée chez N. diversicolor. L'étude au microscope électronique semble confirmer les résultats de l'autoradiographie, selon lesquels l'activité du nucléole ne serait pas modifiée par l'actinomycine D aux doses que nous avons utilisées.

## II - ACTION DE LA PUROMYCINE

La puromycine inhibe la synthèse des **protéines** au niveau des polysomes (revue dans GOLDBERG, 1965). Des nombreuses études consacrées à l'action de cet antibiotique sur les synthèses cellulaires, nous ne signalerons que le travail de FICQ (1964) consacré à l'ovogenèse de Paracentrotus lividus. Chez cette espèce, une dose de 50 µg/ml réduit de 80 % l'incorporation de la phénylalanine tritiée dans les protéines de l'ovocyte.

Au cours de l'ovogenèse de N. diversicolor, la puromycine à une concentration de 20 µg/ml ne produit pas de diminution sensible de l'incorporation de leucine tritiée. Des doses plus élevées sont léthales pour les parapodes explantés.

L'observation au microscope électronique, a permis, par contre, d'observer des modifications de la structure du nucléole. La puromycine provoque une vacuolisation de la zone centrale fibrillaire et une fragmentation du cortex granulaire. Les études de l'effet de la puromycine sur l'ultrastructure du nucléole sont peu nombreuses. DU PRAT (1970) signale une vacuolisation du nucléole dans des cellules embryonnaires d'Amphibiens ; cette observation a cependant été effectuée uniquement au microscope photonique.

Dans l'ovocyte de N. diversicolor, les altérations subies par le nucléole mis en présence de puromycine sont difficiles à interpréter. En effet, la persistance de l'incorporation d'acides aminés par la cellule jette un doute sur la spécificité des effets de cet antibiotique dans le cas de notre matériel.

En définitive, le mode d'action des inhibiteurs métaboliques sur la structure et le métabolisme des nucléoles d'ovocytes de Néréidien s'avère très délicat à interpréter par suite de la nécessité d'utiliser des doses relativement élevées qui provoquent une léthalité importante. Il semble que la poursuite de cette étude devra s'effectuer en utilisant d'autres antimétabolites (Aflatoxine, Bromure d'éthidium).

## DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

L'organisation ~~générale~~<sup>structurale</sup> du nucléole de l'ovocyte de N. diversicolor varie au cours des différents stades de l'ovogenèse. L'étude ultrastructurale a été couplée à des investigations de nature cytochimique et autoradiographique de façon à établir une relation entre l'évolution morphologique et l'activité métabolique du nucléole.

Pendant la période de vitellogenèse protéique, le nucléole se compose d'une zone fibrillaire centrale et d'un cortex granulaire disposé en trabécules anastomosés. Au cours du stade suivant (élaboration des glucides), une nouvelle organisation nucléolaire apparaît. Le nucléole est alors constitué de plages fibrillaires dispersées parmi un composant de nature fibrillogranulaire. A la fin de son évolution, chez les ovocytes matures, le nucléole subit une ségrégation de ses constituants, accompagnée d'un processus de fragmentation du matériel nucléolaire.

Ces transformations structurales du nucléole lors de la modification des synthèses cytoplasmiques pourraient être liées au rôle régulateur joué par cet organite dans le transfert des ARN messagers vers le cytoplasme ainsi que le suggèrent les travaux de l'école de HARRIS (HARRIS et al., 1969 ; SIDEBOTTOM et HARRIS, 1969).

L'évolution du nucléole au cours de l'ovogenèse de N. diversicolor est comparable à celle observée chez N. pelagica par DHAINAUT (1972). Chez les Néridiens, il semble donc exister, de façon constante, un synchronisme entre les remaniements structuraux du nucléole et l'orientation des synthèses du cytoplasme. Ce processus est vraisemblablement lié aux variations de l'activité endocrine du cerveau qui surviennent au cours de l'ovogenèse. Ces variations ont été déterminées avec précision par DURCHON et PORCHET (1970) grâce à un dosage effectué en culture organotypique. Ces résultats nous ont permis de faire correspondre chaque stade de l'évolution nucléolaire à un taux hormonal déterminé. On constate, en particulier, que les remaniements profonds de la structure du nucléole, survenant lors du passage de la phase de vitellogenèse protéique à la période d'élaboration des glucides, coïncident avec une baisse très rapide du taux d'hormone cérébrale.

Ces résultats, obtenus au cours de l'ovogenèse naturelle, nous ont conduit à envisager l'évolution du nucléole dans le cas d'une diminution brutale du taux d'hormone, diminution consécutive à l'ablation du cerveau. Dans des ovocytes en période de vitellogenèse protéique, dont le nucléole est constitué d'un centre fibrillaire et d'un cortex granulaire, la levée de l'inhibition cérébrale entraîne rapidement des modifications de la structure nucléolaire.

Dès le 2ème jour de l'expérimentation, on constate une réorganisation des constituants du nucléole, semblable à celle qui caractérise le stade l'élaboration des glucides (plages fibrillaires dispersées dans le composant fibrillo-granulaire). De plus, une vacuole apparaît au centre de l'organite tandis que le matériel ribonucléoprotéique se concentre à la périphérie. La vacuole prend un développement considérable ; au 6ème jour, elle atteint une taille de 11  $\mu$  pour un diamètre nucléolaire de 12 à 13  $\mu$ . La signification du développement de vacuoles dans le nucléole est actuellement très discutée. Dans certains types cellulaires, la vacuolisation du nucléole coïncide avec des synthèses ribonucléiques intenses (JOHNSON, 1969). Dans d'autres cas, la vacuolisation serait l'expression d'une inhibition des synthèses d'ARN (BUSCH et SMETANA, 1970). Dans l'ovocyte de N. diversicolor, le développement considérable de la vacuole nucléolaire s'accompagne d'une incorporation intense d'uridine tritiée.

Après avoir atteint une taille maximale, la vacuole centrale se résorbe et le nucléole reprend un aspect compact. La phase ultime de l'évolution expérimentale est marquée par une ségrégation des constituants fibrillaire et fibrillo-granulaire en deux hémisphères. L'étude autoradiographique montre que ce stade est caractérisé par un arrêt des synthèses ribonucléiques. Cette ségrégation n'est pas suivie, contrairement au cas de l'ovogenèse naturelle, par une fragmentation du matériel nucléolaire.

L'évolution du nucléole en condition anormale, présente, en plus des remaniements survenant au cours de l'ovogenèse naturelle, des caractères particuliers tels que le développement de la vacuole centrale et l'absence de fragmentation finale du nucléole. Ces particularités peuvent être rattachées à l'accélération de la **croissance** ovocytaire, consécutive à la levée de l'inhibition cérébrale. Une étude de l'action d'inhibiteurs métaboliques, susceptibles de reproduire les effets de l'hormone, a été entreprise dans le but d'essayer de relier les modifications structurales du nucléole à des variations du métabolisme ovocytaire.

BUSCH  
LITTLE

En définitive, l'étude du nucléole au cours de l'ovogenèse de N. diversicolor permet de conclure à une sensibilité très élevée de cet organite aux conditions hormonales. En effet, au cours de l'ovogenèse naturelle, chaque étape de l'évolution nucléolaire survient en présence d'un taux hormonal déterminé. En outre, dans le cas de l'ovogenèse expérimentale, les effets de la levée de l'inhibition hormonale sont ressentis précocement au niveau du nucléole, bien avant d'être décelables dans le cytoplasme. Ces résultats s'intègrent donc dans le cadre des connaissances actuelles concernant le mode d'action des hormones. En effet, il est admis que la régulation hormonale de l'activité cellulaire puisse s'effectuer par l'intermédiaire d'une modification des synthèses ribonucléiques (TATA, 1970). Dans ce processus, l'ARN ribosomal d'origine nucléolaire représenterait le type d'ARN le plus sensible à l'action hormonale (TATA, 1970 ; BUSCH et SMETANA, 1970, pp. 46 et 499).

## BIBLIOGRAPHIE

- ADAMSTONE, F.B. et TAYLOR, A.B. (1972) - Nucleolar reorganization in epithelial cells of the jejunum of the rat. *J. Morphol.* 136, 131-152.
- BERTOOUT, M. et DHAINAUT, A. (1971) - Etude cytochimique et autoradiographique de l'ovogenèse de Nereis diversicolor O.F. Müller (Annélide Polychète), dans les conditions naturelles et en l'absence d'hormone cérébrale. *Gen. Comp. Endocrinol.* 17, 371-387.
- BERNHARD, W., FRAYSSINET, C., LAFARGE, C., et LEBRETON, E. (1965) - Lésions nucléolaires précoces provoquées par l'aflatoxine dans les cellules hépatiques du rat. *C.R. Acad. Sci.* 261, 1785-1788.
- BERNHARD, W. et GRANBOULAN, N. (1968) - Electron microscopy of the nucleolus in vertebrate cells. in "The Nucleus", DALTON A.J. et HAGHNAU F., eds, 81-149, Acad. Press, N.Y.
- BIRNSTIEL, M.L., CHIPCHASE, M.I.H. et FLAMM, W.G. (1964) - On the chemistry and organization of nucleolar proteins. *Biochem. Biophys. Acta* 87, 111-122.
- BOUTEILLE, M., KALIFA, J.R. et DELARUE, J. (1967) - Ultrastructural variations of nuclear bodies in human diseases. *J. Ultrast. Res.* 19, 474-486.
- BUSCH, H. (1965) - Histones and other nuclear Proteins. Acad. Press, N.Y. 266 p.
- BUSCH, H. et SMETANA, K. (1970) - The nucleolus. Acad. Press, N.Y. 626 p.
- CHEN, J.M. (1954) - The cultivation in fluid medium of organised liver, pancreas and other tissues of foetal rats. *Exp. Cell Res.* 7, 518-529.
- CHOI, Y.C. et BUSCH, H. (1969) - Effect of actinomycin D on the oligonucleotide composition of nucleolar 45 S RNA of Novikoff hepatoma ascites cells. *Biochem. Biophys. Acta* 174, 766-769.
- 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, 1112-1114.
- CHOUINARD, L.A. (1966) - Nucleolar architecture in Root meristematic cells of *Allium cepa*. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 23, 125-143.
- CHOUINARD, L.A. (1971) - A light- and electron microscope study of the nucleolus during growth of the oocyte in the prepubertal mouse. *J. Cell Sci.* 9, 637-664.

- CLARK, R.B. et RUSTON, R.J.G. (1963) - The influence of brain extirpation on oogenesis in the polychaete Nereis diversicolor. Gen. Comp. Endocrinol. 3, 529-541.
- DAVIDSON, E.H. (1969) - Gene activity in early development. Acad. Press, N.Y., 375 p.
- DHAINAUT, A. (1964) - Contribution à l'étude du métabolisme de l'ARN, par incorporation de  $^3\text{H}$ -uracile, au cours de l'ovogenèse chez Nereis diversicolor O.F. Müller (Annélide Polychète). Bull. Soc. Zool. Fr. 89, 408-413.
- DHAINAUT, A. (1967) - Etude de la vitellogenèse chez Nereis diversicolor O.F. Müller (Annélide Polychète) par autoradiographie à haute résolution. C.R. Acad. Sci. 265, 434-436.
- DHAINAUT, A. (1969a) - Origine et structure des formations mucopolysaccharidiques de la zone corticale de l'ovocyte de Nereis diversicolor O.F. Müller (Annélide Polychète). J. Microsc. 8, 69-86.
- DHAINAUT, A. (1969b) - Etude ultrastructurale et cytochimique de la formation des inclusions intranucléaires dans les ovocytes de l'Annélide Nereis diversicolor O.F. Müller. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 96, 75-86.
- DHAINAUT, A. (1970a) - Contribution à l'étude de la gamétogenèse des Néréidiens (Annélides Polychètes) dans les conditions naturelles et en l'absence d'hormone cérébrale. Thèse de Doct. Sc. Nat. Université de Lille, n° C.N.R.S. : A.O. 5099.
- DHAINAUT, A. (1970b) - 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. Mikrosk. Anat. 104, 390-404.
- DHAINAUT, A. (1972) - Evolution nucléolaire au cours de l'ovogenèse de N. pelagica (Annélide Polychète). I Etude morphologique. J. Microsc. 13, 67-84.
- DHAINAUT, A. et PORCHET, M. (1967) - Evolution ovocytaire en l'absence d'hormone cérébrale chez Perinereis cultrifera grübe (Annélide Polychète). C.R. Acad. Sci. 264, 2807-2810.
- DJACZENKO, W., GRABSKA, J. et FILADORO, F. (1969) - Natural segregation of the ribonucleoprotein components of the nucleoli of chloragogen cells in Tubifex. J. Cell Sci. 4, 621-625.

- DUPRAT, A.M. (1970) - Action de la puromycine et d'une substance analogue sur la différenciation de cellules embryonnaires d'Amphibiens, cultivées in vitro. J. Embr. Exp. Morphol. 24, 119-138.
- DURCHON, M., BOILLY, B. et DHAINAUT, A. (1965) - Recherches en culture organotypique sur l'action de l'hormone cérébrale des Néréidiens (Annélides Polychètes). C.R. Soc. Biol. 159, 106-113.
- DURCHON, M. et PORCHET, M. (1970) - Dosage de l'activité endocrine cérébrale au cours du cycle génital femelle chez Nereis diversicolor O.F. Müller (Annélide Polychète). C.R. Acad. Sci. 270, 1689-1691.
- DURCHON, M. et PORCHET, M. (1971) - Premières données quantitatives sur l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens au cours de leur cycle sexuel. Gen. Comp. Endocrinol. 16, 555-565.
- 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.
- ESPER, H. (1965) - Studies on the nucleolar vacuole in the oogenesis of Arbacia punctulata. Exp. Cell Res. 38, 85-96.
- ESPONDA, P. et STOCKERT, J.C. (1971) - Nucleolus and nuclear body in prophase spermatocytes of Helix aspersa. Caryologia 24, 293-298.
- FAHMY, O.G. (1949) - Oögenesis in the desert snail Eremina desertorum with special reference to vitellogenesis. Quart. J. Micr. Sci. 90, 159-181.
- FICQ, A. (1964) - Effets de l'Actinomycine D et de la puromycine sur le métabolisme de l'ovocyte en croissance. Etude autoradiographique. Exp. Cell Res. 34, 581-594.
- FICQ, A. (1968) - Métabolisme des RNAs pendant l'oogenèse. Effet des Histones, de la polylysine et de l'Actinomycine sur l'incorporation de l'uridine  $^3\text{H}$  dans les oocytes isolés et fragments d'ovaires d'Asterias rubens. Exp. Cell Res. 51, 12-26.
- GABE, M. (1968) - Techniques histologiques. Masson et Cie, Paris, 1113 p.
- GABE, M. et MARTOJA-PIERSON, M. (1956) - Localisation histochimique des groupements SH dans quelques nucléoles. Ann. Histochem. 1, 230-236.
- GALL, J.G. (1966) - Nuclear RNA of the Salamander Oocyte. Nat. Cancer Inst. Monogr. 23, 475-488.

- GEUSKENS, M. (1965) - Etude autoradiographique et ultrastructurale de l'action de l'Actinomycine D sur les ovocytes d'Astérie. *Exp. Cell Res.* 39, 400-412.
- 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.
- GIMENEZ-MARTIN, G. et STOCKERT, J.C. (1970) - Nucleolar structure during the meiotic prophase in Allium cepa Anthers. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 107, 551-563.
- GIRARD, J., JOST, A. et DUPOUY, J.P. (1968) - Modifications précoces des hépatocytes de foetus de rat décapités, sous l'influence du cortisol. *C.R. Acad. Sci.* 267, 857-859.
- GIRARD, J. et JOST, A. (1970) - Action du cortisol sur le noyau et les nucléoles des hépatocytes de foetus de Rats privés de corticostéroïdes. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exper.* 59, 319-330.
- HEINIGER, H.J., COCA, A. et FEINENDEGEN, L.E. (1971) - Effect of ACTH on the nucleolar size of adrenal cortical cells and of liver cells. An electron-microscopic study using a quantitative biometrical method. *Virchows Arch., Abt. B Zellpath.* 9, 260-270.
- GOLDBERG, I.H. (1965) - Mode of action of antibiotics. II Drugs affecting nucleic acid and protein synthesis. *Am. J. Med.* 39, 722-752.
- GOLDBLATT, P.J., SULLIVAN, R.J. et FARBBER, E. (1969) - Morphologic and metabolic alterations in hepatic cell nucleoli induced by varying doses of actinomycin D. *Cancer Res.* 29, 124-135.
- GRANBOULAN, N. et GRANBOULAN, P. (1964) - Cytochimie ultrastructurale du nucléole. I Mise en évidence de chromatine à l'intérieur du Nucléole. *Exp. Cell Res.* 34, 71-87.
- 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.
- HARRIS, H., SIDEBOTTOM, E., GRACE, D.M. et BRAMWELL, M.E. (1969) - The expression of genetic information, a study with hybrid animal cells. *J. Cell Sci.* 4, 499-525.

- HAY, E.D. et GURDON, J.B. (1967) - Fine structure of the nucleolus in normal and mutant Xenopus embryos. J. Cell Sci. 2, 151-162.
- HAUENSCHILD, C. (1956) - Hormonale Hemmung der Geschlechtsreife und Metamorphose bei dem Polychaeten Platynereis dumerilii. Z. Naturforsch. B. 11, 125-132.
- HUBERT, J. (1970a) - Etude cytologique et cytochimique des cellules germinales des reptiles au cours du développement embryonnaire et après la naissance. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 107, 249-264.
- HUBERT, J. (1970b) - Ultrastructure des cellules germinales au cours du développement embryonnaire du Lézard vivipare. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 107, 265-283.
- HUBERT, J. et ANDRIVON, C. (1972) - Etude par la méthode autoradiographique des synthèses d'ARN, d'ADN et de protéines dans les gonocytes de l'embryon de Lézard vivipare. C.R. Acad. Sci. 274, 1383-1386.
- HYDE, B.B. (1966) - Changes in nucleolar ultrastructure associated with differentiation in the root apex. Nat. Cancer Inst. Monogr. 23, 39-51.
- 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. Ultrastr. Res. 11, 315-328.
- JOHNSON, J.M. (1969) - A study of nucleolar vacuoles in cultered tobacco cells using radioautography, actinomycin D, and electron microscopy. J. Cell Biol. 43, 197-206.
- KIERSZENBAUM, A.L. (1960) - Relationship between nucleolus and nuclear bodies in human mixed salivary tumors. J. Ultrast. Res. 29, 459-469.
- KOSHIBA, K., THIRUMALACHARY, C, DASKAL, Y. et BUSCH, H. (1971) - Ultrastructural and biochemical studies on nucleoprotein particles from isolated nucleoli of thisocetamide-treated rat liver. Exp. Cell Res. 68, 235-246.
- LIAO, S. et STUMPF, W.E. (1968) - Autoradiographic evidence for the selective enhancement of ribonucleic acid synthesis in prostatic nuclei by testosterone. Endocrinology 83, 629-637.
- MAC GREGOR, H.C. et MOON, S.J. (1971) - Some measurements on Amphibians oocyte nucleoli. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 122, 273-282.

- MARINOZZI, V. et BERNHARD, W. (1963) - Présence dans le nucléole de deux types de ribonucléoprotéines morphologiquement distinctes. *Exp. Cell Res.* 32, 595-598.
- MILLER, O.L. Jr. (1966) - Structure and composition of peripheral nucleoli of Salamander oocytes. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 23, 53-56.
- MILLER, O.L. Jr. et BEATTY, B.R. (1969) - Nucleolar structure and function. in "Handbook of Molecular Cytology" (A. LIMA DE FARIA ed.) NHPC Amsterdam, 605-619.
- MILLONIG, G., BOSCO, M. et GIAMBERTONE, L. (1968) - Fine structure analysis of oogenesis in Sea Urchins. *J. Exp. Zool.* 169, 293-314.
- MUNDELL, R.D. (1968) - Studies on nucleolar and ribosomal basic proteins and their relationship to nucleolar function. *Exp. Cell Res.* 53, 395-400.
- NOEL, J.S., DEWEY, W.C., ABEL, J.H. et THOMPSON, R.P. (1971) - Ultrastructure of the nucleolus during the Chinese Hamster cell cycle. *J. Cell Biol.* 49, 830-847.
- PANNESE, E. (1963) - Investigations on the ultrastructural changes of the spinal ganglion neurons in the course of axon regeneration and cell hypertrophy. I Changes during axon regeneration. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 60, 711-740.
- PARSONS, D.F. (1962) - An electron microscope study of radiation damage in the mouse oocyte. *J. Cell Biol.* 14, 31-48.
- PASTEELS, J.J. (1965) - Etude au microscope électronique de la vésicule germinative et de son flétrissement dans l'oeuf de Barnea candida (Mollusque bivalve). *Arch. Biol.* 76, 5-24.
- PERRY, R.P. (1963) - Selective effects of actinomycin D in the intracellular distribution of RNA synthesis in tissue culture cells. *Exp. Cell Res.* 29, 400-406.
- PERRY, R.P. (1969) - Nucleoli, the cellular sites of ribosome production. in "Handbook of Molecular Cytology" (A. LIMA DE FARIA ed.). N.H.P.C. Amsterdam, 620-636.
- PHILLIPS, D.M. et PHILLIPS, S.G. (1971) - Distinctive characteristics of nucleoli of two established cell lines. *J. Cell Biol.* 49, 803-815.

- PORCHET, M. (1970) - Relations entre le cycle hormonal cérébral et l'évolution ovocytaire chez Perinereis cultrifera G. Gen. Comp. Endocrinol. 15, 220-231.
- POTMESIL, M. et SMETANA, K. (1968) - The inhibitory effect of chromomycin A 3 on the RNA synthesis and the formation of ring-shaped nucleoli in cell cultures. Folia Biol. (Prague) 14, 132-139.
- POTMESIL, M. et SMETANA, K. (1969) - Significance of ring-shaped nucleoli and micro-nucleoli in human lymphocytes. Folia Biol. (Prague), 15, 300-305.
- RAVEN, C.P. (1961) - Oogenesis : the storage of developmental information. Pergamon Press, London, 274 p.
- RECHER, L., WHITESCARVER, J. et BRIGGS, L. (1969) - The fine structure of a nucleolar constituent. J. Ultrast. Res. 29, 1-15.
- REDDY, J.K. et SVOBODA, D.J. (1972) - Natural segregation of nucleolar components of liver cells in Newts. J. Ultrast. Res. 38, 608-613.
- RINGBORG, U. et RYDLANDER, L. (1971) - Nucleolar-derived ribonucleic acid in chromosomes, nuclear sap, and cytoplasm of Chironomus tentans salivary gland cells. J. Cell Biol. 51, 355-368.
- ROSE, R.J. , SETTERFIELD, G. et FOWKER, L.C. (1972) - Activation of nucleoli in tuber slices and the function of nucleolar vacuoles. Exp. Cell Res. 71, 1-16.
- SCHOEFL, G.I. (1964) - The effect of actinomycin D on the fine structure of the nucleolus. J. Ultrast. Res. 10, 224-243.
- SCHROEDER, P.C. (1971) - Studies on Oogenesis in the Polychaete Annelid Nereis grubei (Kinberg). II Oocyte growth rates in intact and hormone deficient Animals. Gen. Comp. Endocrinol. 16, 312-322.
- SIDEBOTTOM, E. et HARRIS, H. (1969) - The role of the nucleolus in the transfer of RNA from nucleus to cytoplasm. J. Cell Sci. 5, 351-364.
- SIMARD, R. (1970) - The nucleus : action of chemical and physical agents. Int. Rev. Cytol. 28, 169-211.
- SIMARD, R. et BERNHARD, W. (1966) - Le phénomène de la ségrégation nucléolaire : spécificité d'action de certains antimétabolites. Int. J. Cancer 1, 463-479.

- SMETANA, K. et BUSCH, H. (1966) - Studies on staining and localization of acidic nuclear protein in the Walker 256 Carcinoma. *Cancer Res.* 26, 331-337.
- SMETANA, K., FREIREICH, E.J. et BUSCH, H. (1968) - Chromatin structures in ring-shaped nucleoli of human lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 52, 112-128.
- SMETANA, K., LANE, M. et BUSCH, H. (1966) - Studies on nucleoli of leukemic agranulocytes and plasmocytes in multiple myeloma. *Exp. Mol. Pathol.* 5, 236-244.
- SMETANA, K. et POTMESIL, M. (1968) - Ring-shaped nucleoli in liver cells of Rat after treatment with Actinomycin D. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 92, 62-69.
- STEVENS, B.J. (1964) - The effect of actinomycin D on nucleolar and nuclear fine structure in salivary gland cell of Chironomus thummi. *J. Ultrast. Res.* 11, 329-352.
- SUSKIND, 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.
- SWIFT, H. et STEVENS, B.J. (1966) - Nucleolar-chromosomal interaction in microspores of Maize. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 23, 145-166.
- TATA, J.R. (1970) - Regulation of protein synthesis by growth and developmental Hormones. in "Biochemical Actions of Hormones" (G. LITWACK ed.) Acad. Press, N.Y., 89-133.
- TERAO, K. SAKAKIBARA, Y., YAMAZAKI, M. et MIYAKI, K. (1971) - Annular nucleolus in hepatocyte of chicken embryo induced by aflatoxin B<sub>1</sub>. *Exp. Cell Res.* 66, 81-89.
- UNUMA, T., FLOYD, L. et BUSCH, H. (1968) - Selective removal of perinucleolar nucleolus associated chromatin from isolated nucleoli of livers of thioacetamide-treated rats. *Exp. Cell Res.* 52, 101-111.

## PLANCHE I

Etude cytochimique du nucléole au cours du stade de vitellogenèse protéique.

Figure 1 - Ovocyte de 60  $\mu$ . Mise en évidence de l'ARN. La zone corticale en croissant est plus basophile que la région corticale du nucléole. CB : croissant basophile (Bleu de toluidine pH 4,2).  
x 2 000

Figure 2 - Ovocyte de 80  $\mu$ . Mise en évidence de l'ARN. 3 zones concentriques sont visibles : anneau cortical (AC) très basophile, zone intermédiaire (ZI) peu colorée, zone centrale (ZC) basophile. (Bleu de toluidine pH 4,2). x 2 000

Figure 3 - Ovocyte de 50  $\mu$ . Mise en évidence des protéines basiques après hydrolyse des acides nucléiques. La zone intermédiaire (ZI) est moins colorée (Fast green pH 8,1 selon ALFERT et GESCHWIND).  
x 2 000

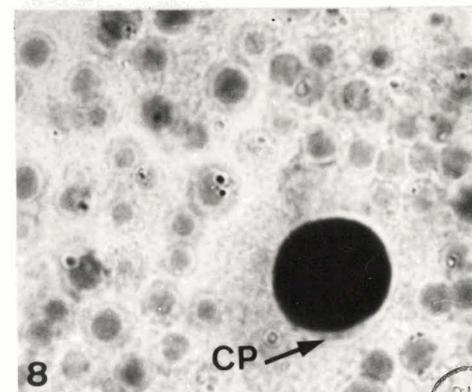
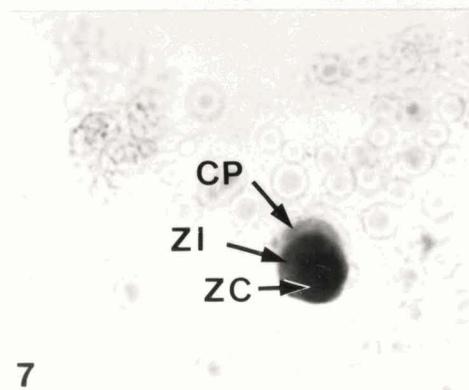
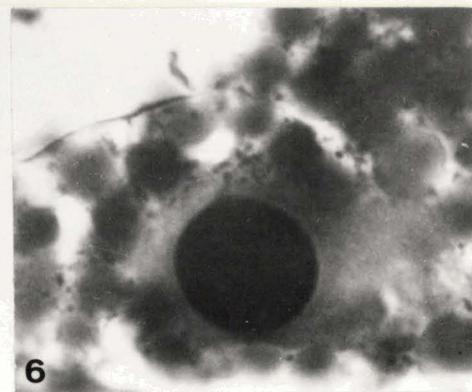
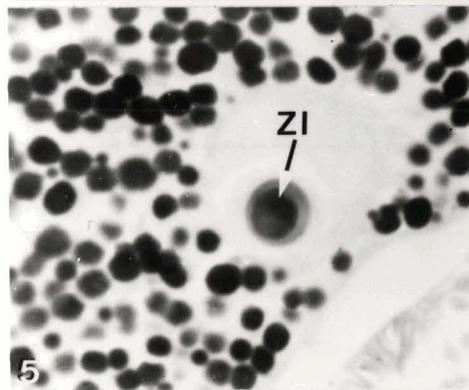
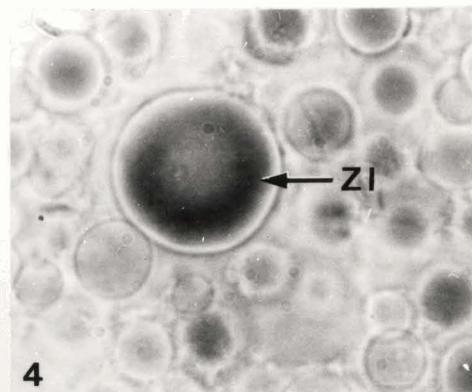
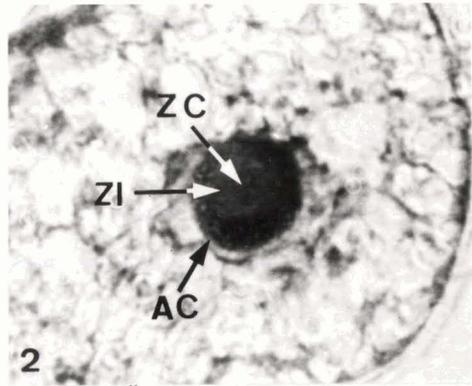
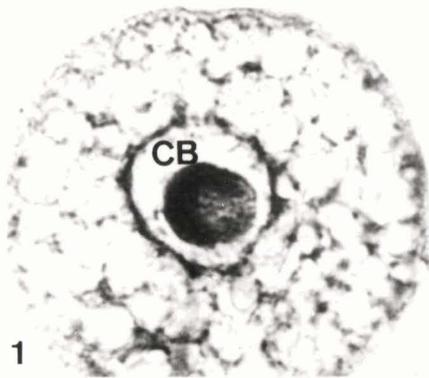
Figure 4 - Ovocyte de 100  $\mu$ . Mise en évidence des protéines basiques sans hydrolyse préalable des acides nucléiques. Seule la zone intermédiaire (ZI) est colorée. (Fast green pH 8,1). x 2 000

Figure 5 - Ovocyte de 90  $\mu$ . Mise en évidence de l'acidophilie totale. La zone intermédiaire (ZI) est colorée plus intensément que les zones centrale et corticale (Fast green pH 2,2). x 900

Figure 6 - Ovocyte de 90  $\mu$ . Mise en évidence des protéines acides. La totalité du nucléole est colorée (Bleu de toluidine pH 9 selon SMETANA et BUSCH). x 2 000

Figure 7 - Ovocyte de 50  $\mu$ . Mise en évidence des protéines sulfhydrilées. La zone centrale (ZC) est très colorée ; la coloration de la zone intermédiaire (ZI) est moins intense ; celle du croissant périphérique (CP) est très faible. (Réaction au D.D.D. de BARNETT-SELIGMANN). x 2 000

Figure 8 - Ovocyte de 80  $\mu$ . Mise en évidence des protéines sulfhydrilées. Les zones centrale et intermédiaire sont très colorées. La coloration du croissant périphérique (CP) est pratiquement nulle. (Réaction au D.D.D. de BARNETT-SELIGMANN). x 2 000



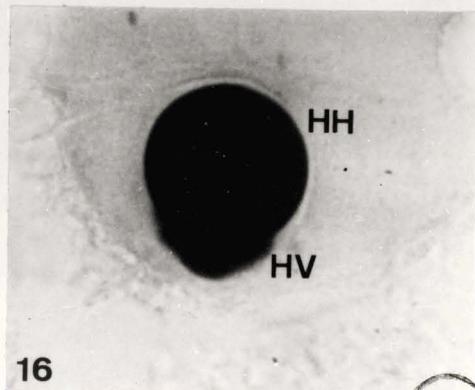
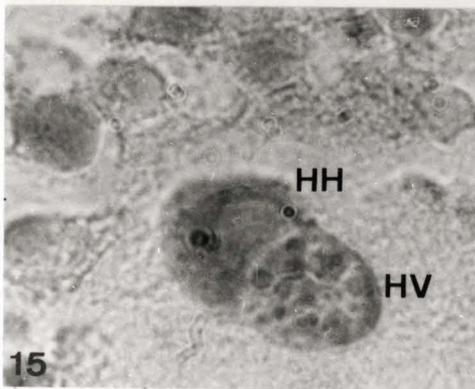
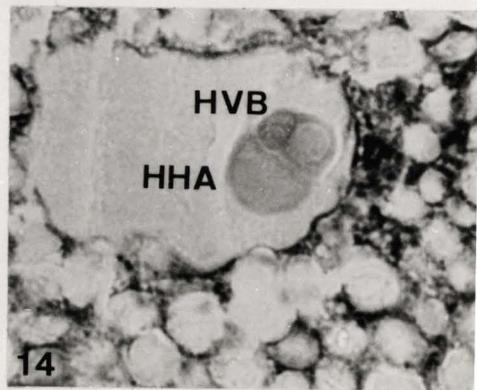
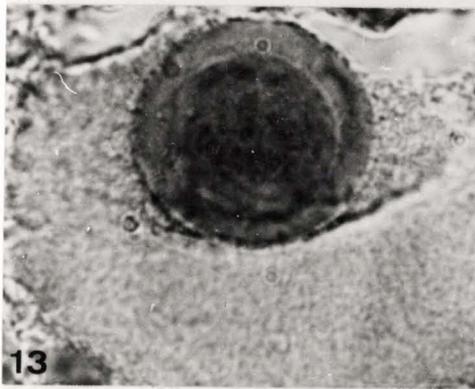
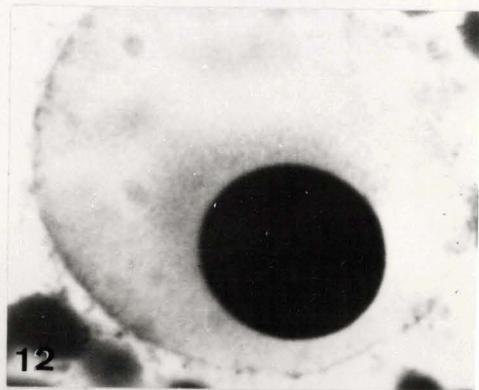
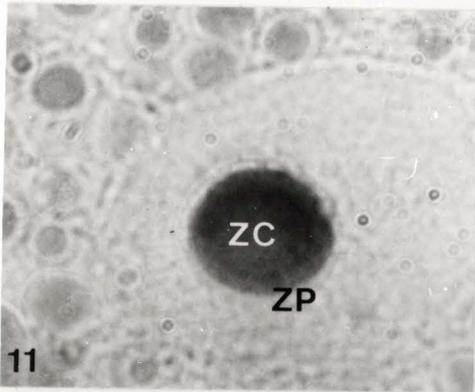
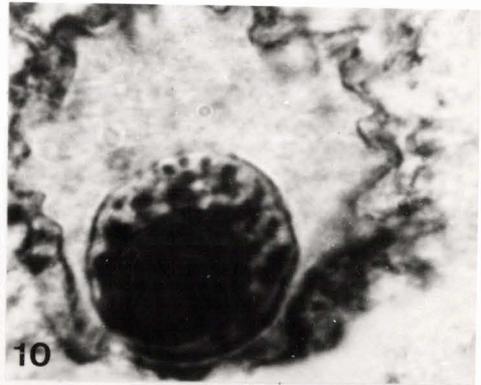
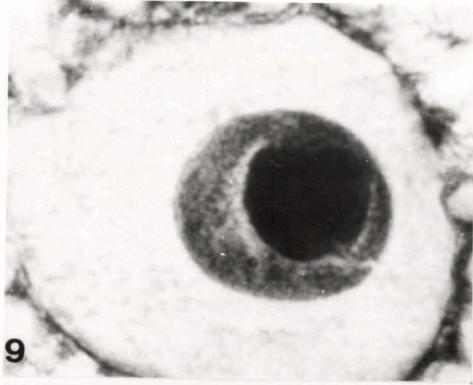
BUS  
VILLE

## PLANCHE II

Etude cytochimique du nucléole au cours du stade d'élaboration des glucides et du stade de maturité.

- Figure 9 - Ovocyte de 160  $\mu$ . Mise en évidence de l'ARN. La coloration est plus intense dans la zone centrale que dans la zone périphérique. Remarquer l'aspect granuleux de la zone périphérique. (Bleu de toluidine pH 4,2). x 2 000
- Figure 10 - Ovocyte de 180  $\mu$ . Mise en évidence de l'ARN. La zone périphérique présente des régions absolument incolores. (Bleu de toluidine pH 4,2). x 2 000
- Figure 11 - Ovocyte de 130  $\mu$ . Mise en évidence des protéines basiques. L'intensité de la coloration est sensiblement identique dans les deux zones. ZC : zone centrale. ZP : zone périphérique. (Fast green pH 8,1 selon AFLERT et GESCHWIND). x 2 000
- Figure 12 - Ovocyte de 140  $\mu$ . Mise en évidence des protéines acides. La réaction est identique dans les deux zones du nucléole. (Bleu de toluidine pH 9 selon SMETANA et BUSCH). x 2 000
- Figure 13 - Ovocyte de 180  $\mu$ . Mise en évidence des protéines sulfhydrilées. La coloration est légèrement plus faible dans la zone périphérique. (Réaction au D.D.D. de BARNETT-SELIGMANN). x 2 000
- Figure 14 - Ovocyte mature (200  $\mu$ ). Mise en évidence de la basophilie. Le nucléole est composé de deux parties : un hémisphère vacuolisé légèrement basophile (HVB), un hémisphère homogène acidophile (HHA). (Test de MANN-DOMINICI). x 900
- Figure 15 - Ovocyte mature (200  $\mu$ ). Mise en évidence des protéines basiques. La coloration est sensiblement identique dans les deux zones. HV : hémisphère vacuolisé. HH : hémisphère homogène. (Fast green pH 8,1 selon ALFERT et GESCHWIND). x 2 000
- Figure 16 - Ovocyte mature (200  $\mu$ ). Mise en évidence des protéines acides. La coloration est légèrement plus intense dans l'hémisphère homogène (HH) que dans l'hémisphère vacuolisé (HV). (Bleu de toluidine pH 9 selon SMETATA et BUSCH). x 2 000

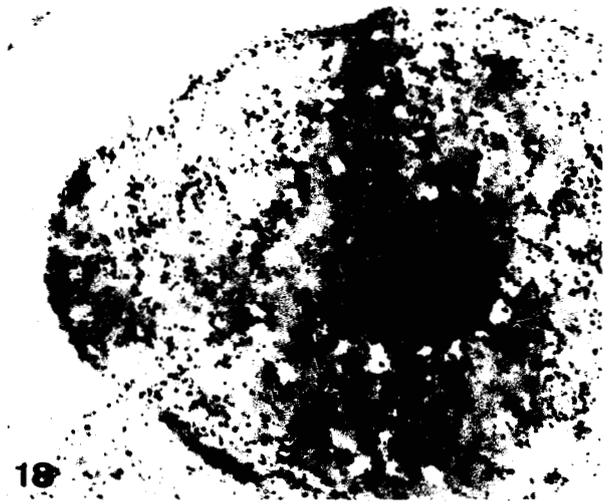
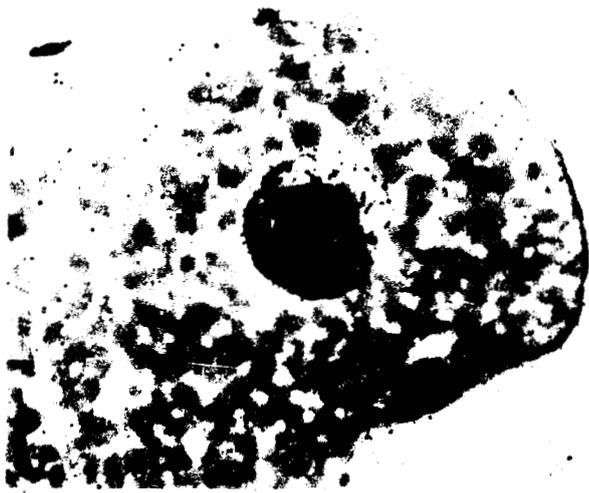




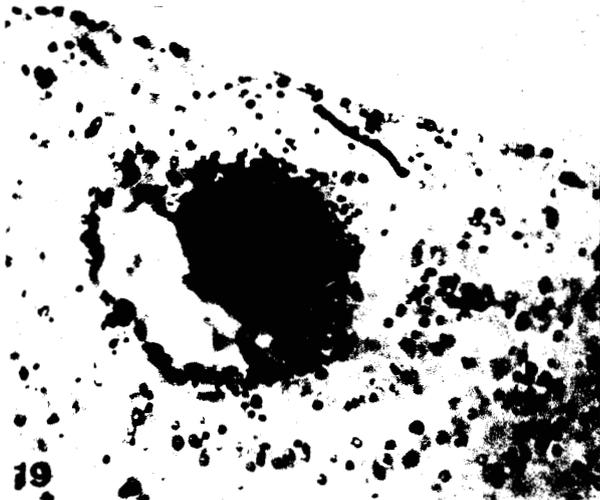
### PLANCHE III

Etude autoradiographique des synthèses d'ARN et de protéines.

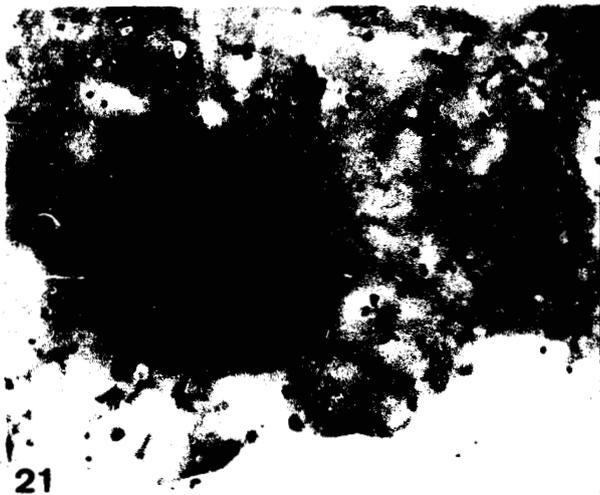
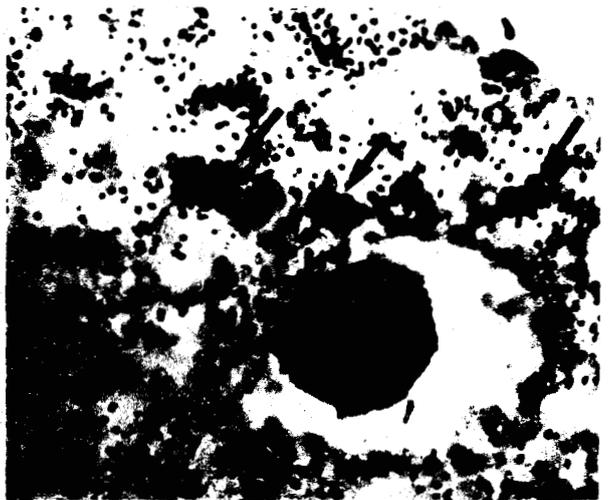
- Figure 17 - Ovocyte de 120  $\mu$ . Incorporation d'uridine tritiée pendant 6 heures. Le marquage est concentré au niveau du nucléole. Seuls quelques grains d'argent sont visibles dans le nucléoplasme et dans le cytoplasme. x 9 00
- Figure 18 - Ovocyte de 120  $\mu$ . Incorporation d'uridine tritiée pendant 48 heures. Le marquage du cytoplasme <sup>et</sup> du nucléoplasme a considérablement augmenté mais celui du nucléole reste prépondérant. x 900
- Figure 19 - Ovocyte de 90  $\mu$ . Incorporation de leucine tritiée pendant 6 heures. La radioactivité est plus élevée dans le nucléole que dans tous les autres sites cellulaires. x 2 000
- Figure 20 - Ovocyte de 100  $\mu$ . Incorporation de leucine tritiée pendant 24 heures. Le marquage nucléolaire a diminué par rapport aux temps courts d'incorporation. Le cytoplasme est très radioactif, notamment au niveau de certains granules vitellins (flèches). x 2 000
- Figure 21 - Ovocyte de 100  $\mu$ . Incorporation d'arginine tritiée pendant 3 heures. Le marquage est nettement plus élevé dans le nucléole que dans le cytoplasme. x 2 000
- Figure 22 - Ovocyte de 100  $\mu$ . Incorporation d'arginine tritiée pendant 5 jours. Il ne subsiste que quelques grains d'argent au niveau du nucléole. Par contre, le marquage du cytoplasme a augmenté, en particulier au niveau des granules vitellins (flèches). x 2 000



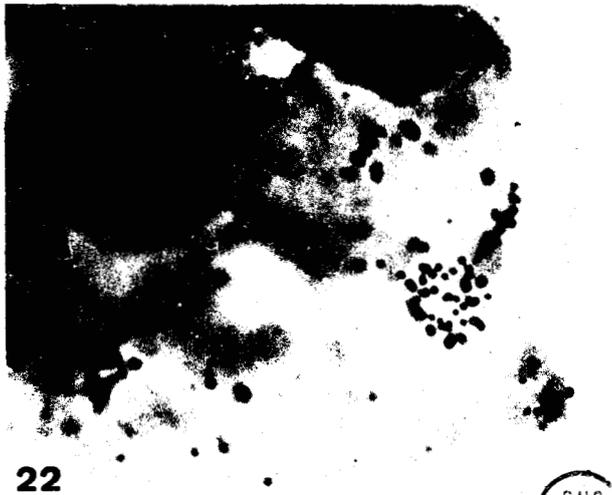
18



19



21



22



PLANCHE IV

Stade de Prévitellogenèse. Début du stade de vitellogenèse protéique.

Figure 23 - Au début du stade de prévitellogenèse (ovocyte de 10  $\mu$ ), le nucléole est une formation de nature fibrillaire en contact avec la chromatine marginale (Ch) accolée à l'enveloppe nucléaire (EN). Des mottes de chromatine sont en relation avec la périphérie de l'organite (Points de contact indiqués par des triangles). Le matériel nucléolaire est composé d'une zone fibrillaire dense (FD) en position périphérique et d'une partie centrale plus claire (FC), contenant de petites vacuoles. Les extrusions nucléaires sont nombreuses (flèche) et semblent confluer en agrégats cytoplasmiques (Ag). x 18 500

Figure 24 - Vue d'ensemble du nucléole au début du stade de vitellogenèse protéique (ovocyte de 30  $\mu$ ). Zone fibrillaire (ZF) et zone granulaire en trabécules, disposée en "coiffe" (ZG). x 16 000

Figure 25 - Détail de la zone fibrillaire du nucléole de la figure 24. En certains points, le feutrage de fibrilles est plus serré et donne des "amas denses" (flèches). V : vacuole. x 66 000



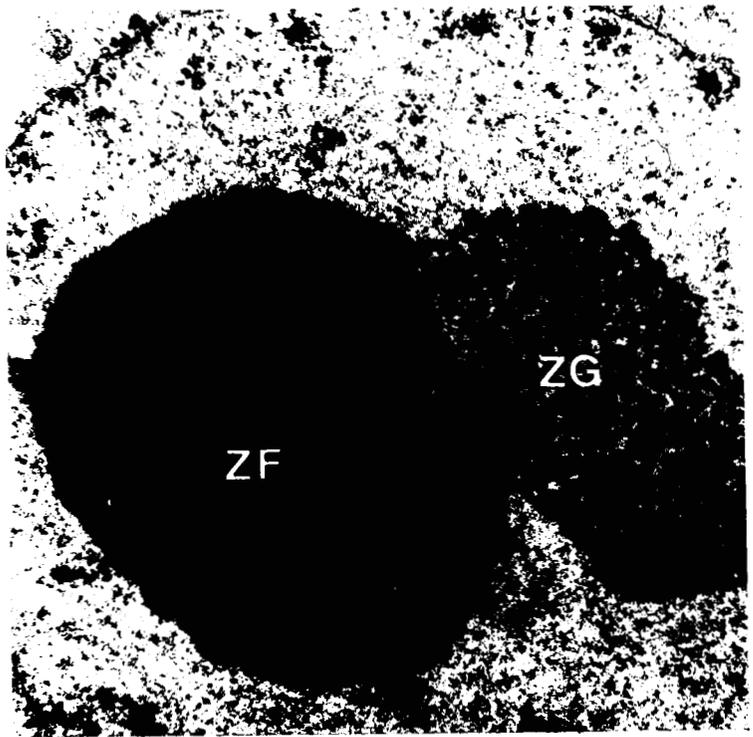


PLANCHE V

Début du stade de vitellogenèse protéique.

Figure 26 - Détail de la zone granulaire du nucléole de la Figure 24. Les granules de 150 Å sont enrobés dans une matrice dense et disposés en trabécules anastomosés, de 1000 Å de largeur. Présence de granulations nucléoplasmiques (GN) dans le voisinage immédiat du nucléole. X 66 000

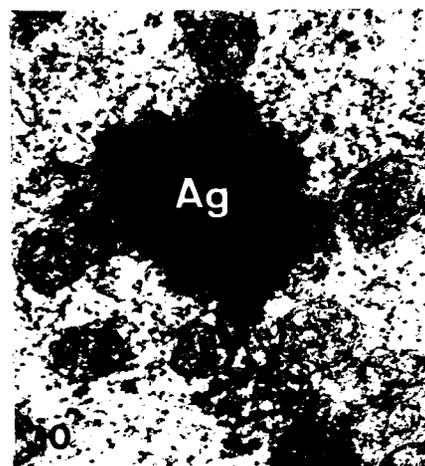
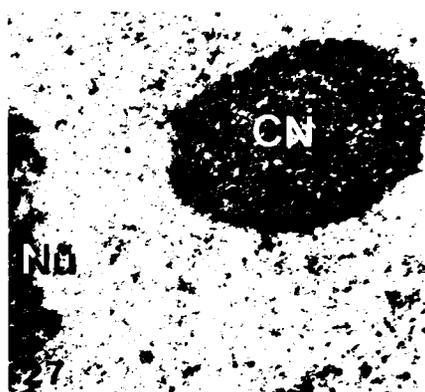
Figure 27 - Corps nucléaire ovoïde (CN) dans le nucléoplasme d'un ovocyte de 50 µ. Nu : nucléole. X 24 000

Figure 28 - Granulations nucléoplasmiques (GN) regroupées près de l'enveloppe nucléaire (ovocyte de 30 µ). Elles sont formées d'éléments <sup>granulaires</sup> de 100 Å noyés dans une matrice très dense aux électrons. Certaines de ces formations sont en rapport (flèche) avec le contenu des pores nucléaires (P). Np : nucléoplasme. x 68 000

Figure 29 - Extrusions nucléaires (Ex) au niveau des pores (P) de l'enveloppe nucléaire (ovocyte de 30 µ). Np : nucléoplasme. x 68 000

Figure 30 - Agrégat cytoplasmique (Ag) entouré de mitochondries (M) dans un ovocyte de 30 µ. x 40 000





815  
1958

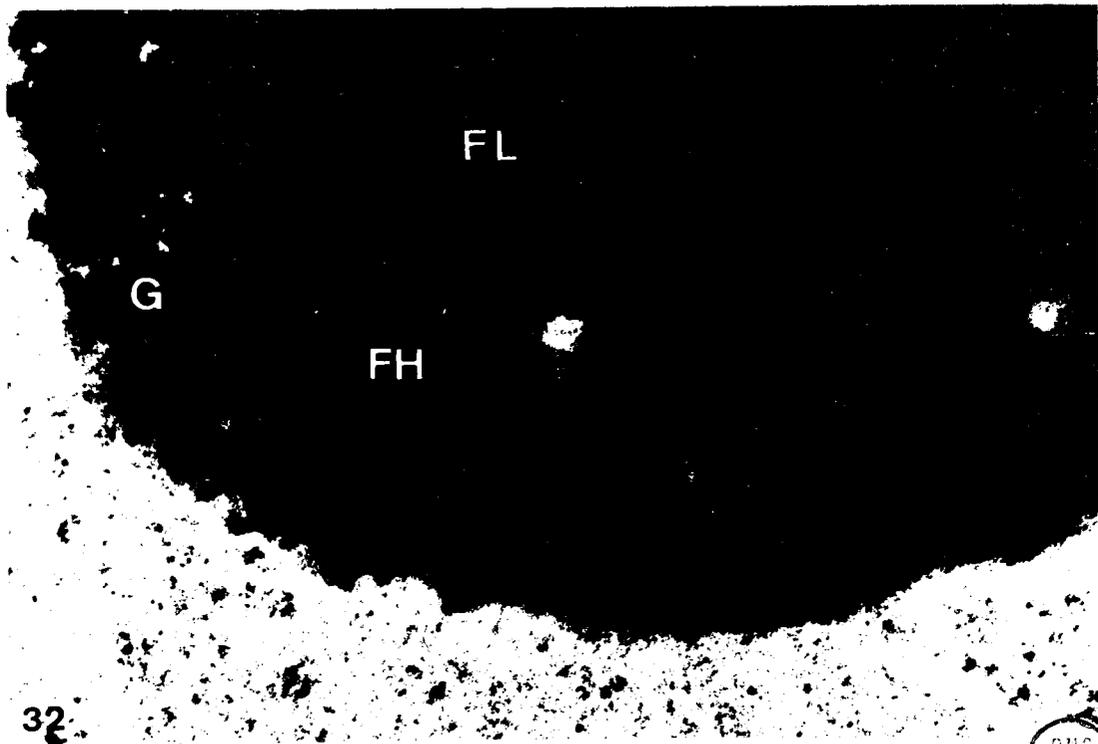
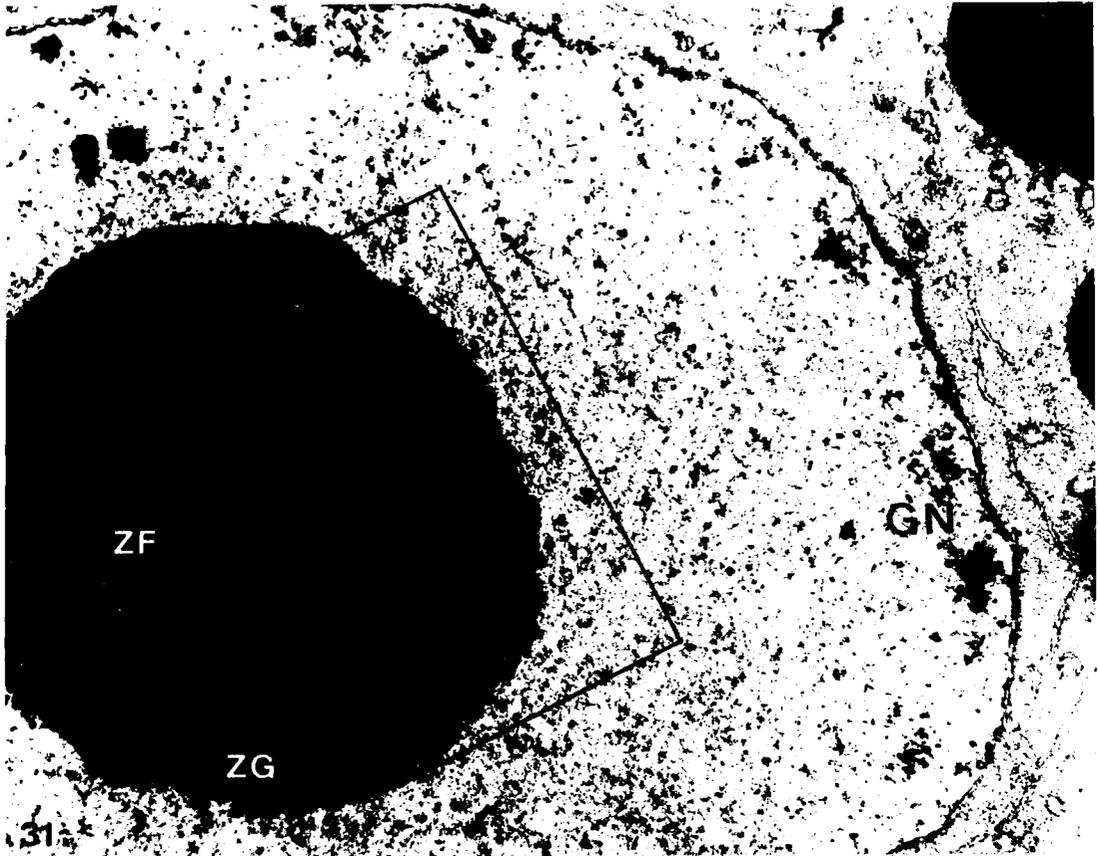
PLANCHE VI

Stade de vitellogenèse protéique.

Figure 31 - Vue d'ensemble du noyau d'un ovocyte de 70  $\mu$ . Le nucléole est constitué d'une zone fibrillaire centrale (ZF) et d'une zone granulaire en croissant (ZG). Le nucléoplasme contient de nombreuses granulations (GN) qui se regroupent près de l'enveloppe nucléaire. x 11 000

Figure 32 - Vue de détail de la partie encadrée de la Figure 31. On observe les 3 zones nucléolaires concentriques, caractéristiques du stade de vitellogenèse protéique. A la périphérie, le cortex granulaire (G) est organisé en trabécules anastomosés. En position intermédiaire, la zone fibrillaire homogène (FH) est constituée d'un feutrage de fibrilles. Au centre, la zone fibrillaire lacunaire (FL) possède, en plus des fibrilles, des granules de tailles diverses, et présente de fines lacunes. x 20 000





BUS  
LILLE

PLANCHE VII

Stade de vitellogenèse protéique.

Figure 33 - Grossissement élevé de la zone fibrillaire homogène (ovocyte de  $90 \mu$ ). Les fibrilles de  $50 \text{ \AA}$  de diamètre sont nettement visibles. Les flèches indiquent des fibrilles en section longitudinale. Noter la présence d'"amas denses" constitués de fibrilles plus serrées. x 96 000

Figure 34 - Grossissement élevé du cortex granulaire (ovocyte de  $90 \mu$ ) montrant des granules de  $150 \text{ \AA}$  (Gr). La dissociation des trabécules en fragments de  $1000$  à  $2000 \text{ \AA}$  (flèches) est très intense. GN : granulations nucléoplasmiques. x 86 000

Figure 35 - Zone corticale d'un ovocyte de  $90 \mu$ . Remarquer la fragmentation des trabécules granulaires (G) et la présence d'une masse sphérique (étoile) qui semble essentiellement de nature fibrillaire. x 42 000

Figure 36 - Granulations nucléoplasmiques (GN) et "masse sphérique" (étoile) à proximité de l'enveloppe nucléaire, dans un ovocyte de  $80 \mu$ . x 37 000



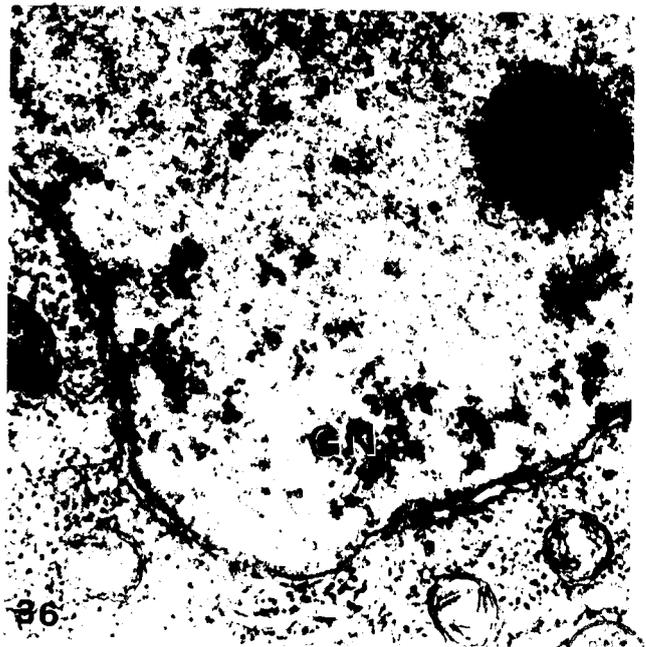
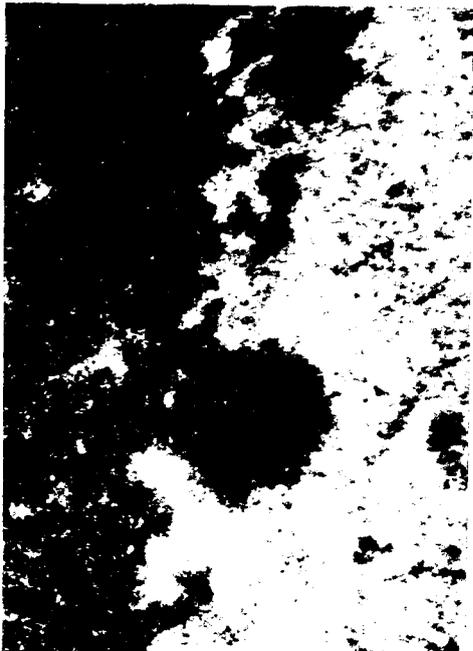
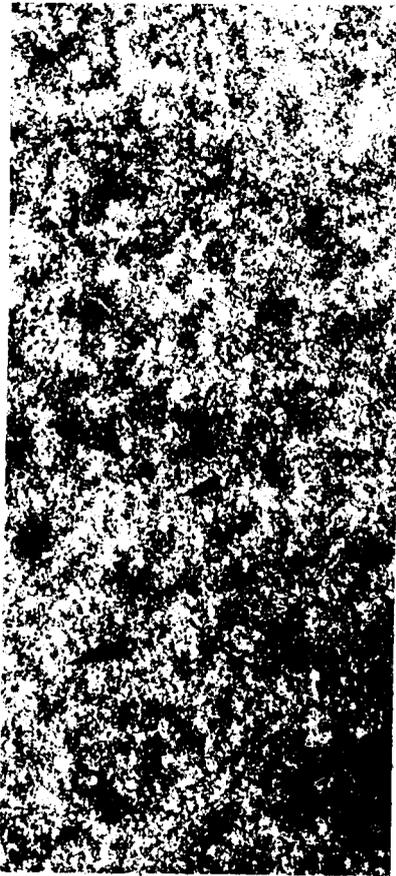


PLANCHE VIII

Fin du stade de vitellogenèse protéique.

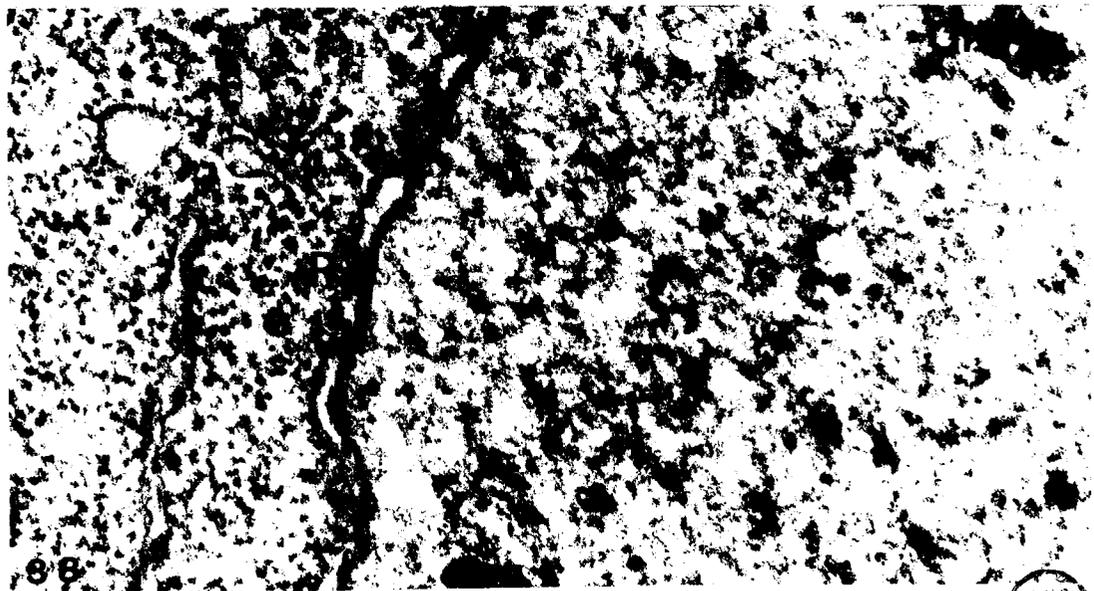
Figure 37 - Nucléole et nucléoplasme d'un ovocyte de 120  $\mu$ .

Composant fibrillaire (F) en position centrale et cortex granulaire (G) dont la partie la plus périphérique est encore organisée en trabécules en cours de dissociation (flèches), tandis que la partie la plus interne présente un aspect plus homogène.

Un corps nucléaire (CN) est visible dans le nucléoplasme. EN : enveloppe nucléaire. x 26 000

Figure 38 - Granulations nucléoplasmiques près de l'enveloppe nucléaire dans un ovocyte de 120  $\mu$ . Dans certaines granulations de grande taille (GN), il est possible de reconnaître les éléments d'aspect granulaire, d'une taille de 100 Å environ, déjà observés dans les ovocytes plus jeunes (Pl. V, fig. 28). P : pore nucléaire. x 68 000





BUS  
TITLE

## PLANCHE IX

### Stade d'élaboration des glucides

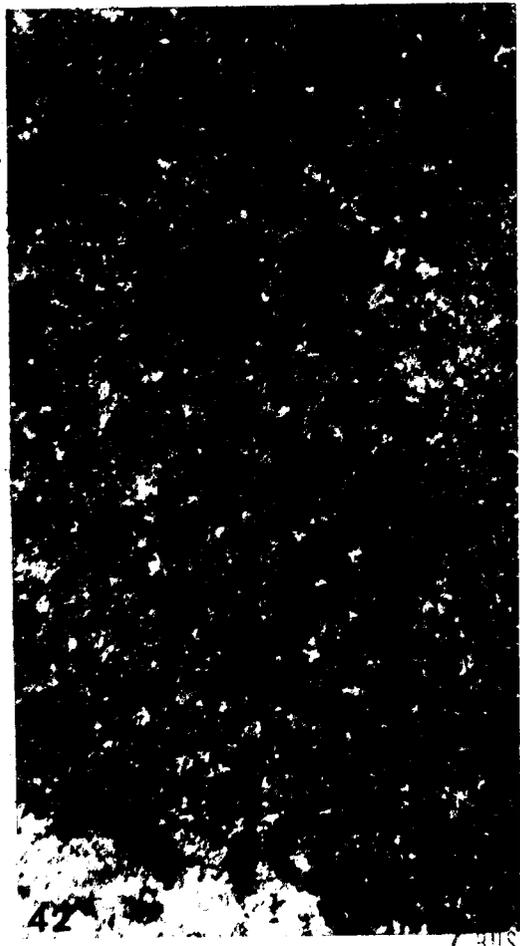
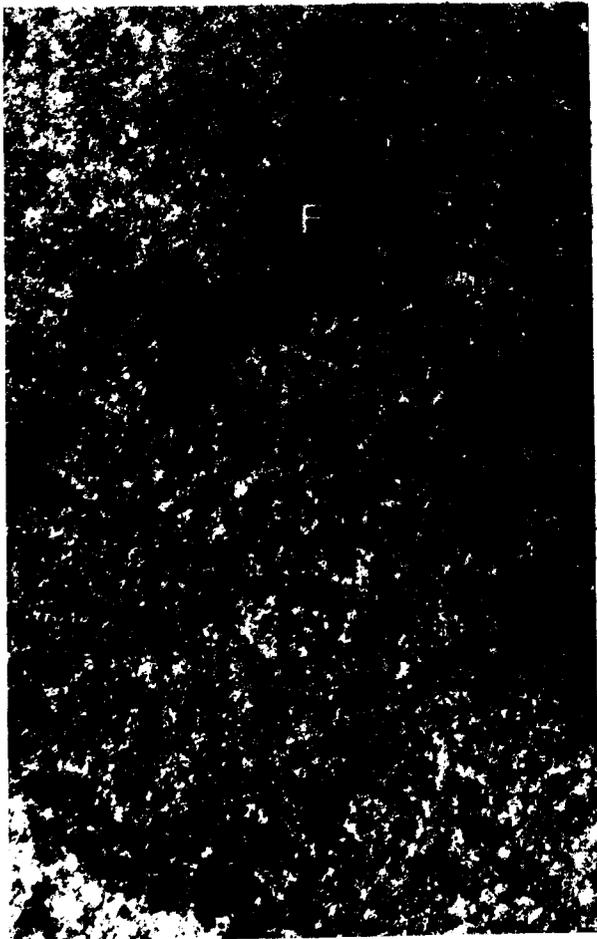
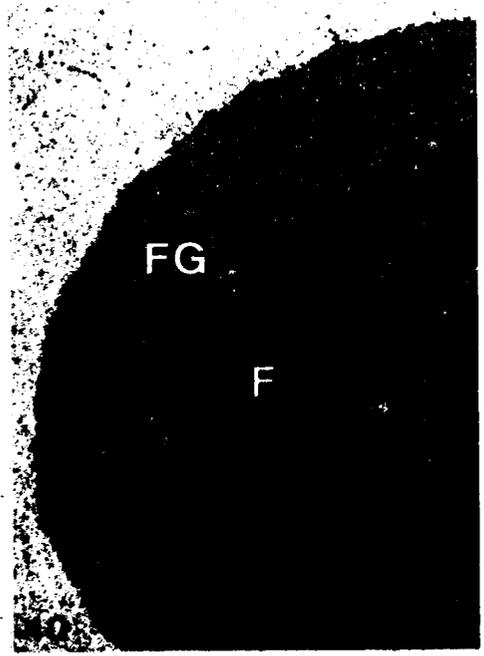
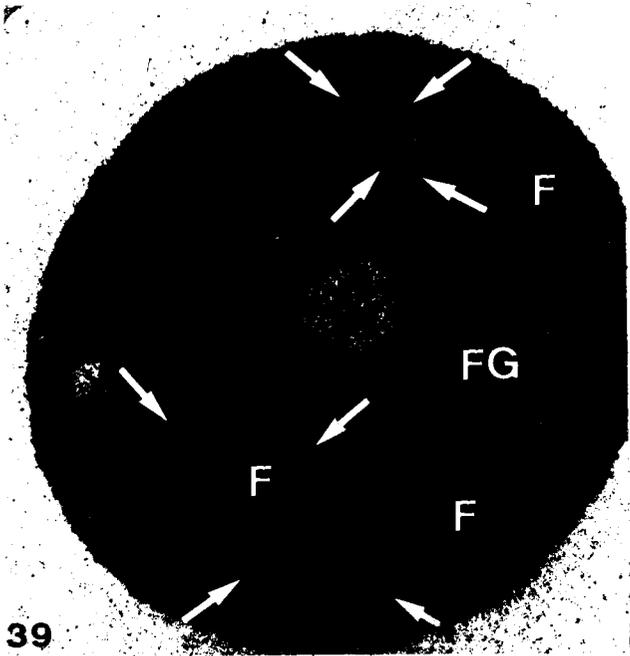
Figure 39 - Nucléole d'un ovocyte de  $140 \mu$ . Le composant fibrillaire (F) se trouve sous forme de plages dispersées (délimitées par des flèches). Le constituant fibrillo-granulaire (FG) occupe la plus grande partie du nucléole. V : vacuole. x 6 000.

Figure 40 - Nucléole d'un ovocyte de  $150 \mu$ . Les plages fibrillaires sont plus ou moins regroupées en un anneau (F). FG : constituant fibrillo-granulaire . x 8 000

Figure 41 - Détail des deux constituants du nucléole dans un ovocyte de  $140 \mu$ . Plage fibrillaire (F), formée d'un feutrage dense de fibrilles et dont le contour se perd dans le constituant fibrillo-granulaire (FG). x 40 000

Figure 42 - Détail du composant fibrillo-granulaire, constitué de granules de  $150 \text{ \AA}$  et de fibrilles de  $50 \text{ \AA}$ . x 64 000





BUS  
LILLE

PLANCHE X

Fin du stade d'élaboration des glucides.

Figure 43 - Nucléole d'un ovocyte de 170  $\mu$ . Il est formé d'un anneau fibrillaire (AF) de forte densité aux électrons, limité intérieurement et extérieurement par le constituant fibrillo-granulaire (FG). L'anneau résulte vraisemblablement de la fusion des plages fibrillaires observées au début du stade. Ce processus de coalescence se réalise en emprisonnant du matériel fibrillo-granulaire qui forme des zones plus claires (flèche blanche) dans l'anneau fibrillaire. De petites vacuoles apparaissent au sein de ces zones claires (flèche noire). x 15 000

Figure 44 - Nucléole d'un ovocyte de 180  $\mu$ . Le constituant fibrillaire (F) présente la forme d'un disque, en position excentrée, dans la masse du composant fibrillo-granulaire (FG). x 4 500

Figure 45 - Nucléoplasme d'un ovocyte de 170  $\mu$ . GN : granulations nucléoplasmiques. On observe une vésicule intranucléaire (VI) près de l'enveloppe nucléaire. x 35 000

Figure 46 - Région de l'enveloppe nucléaire (EN) d'un ovocyte de 170  $\mu$ . Les vésicules intranucléaires (VI) sont encore peu développées  
P : pore nucléaire. Ex : extrusion nucléaire. x 102 000



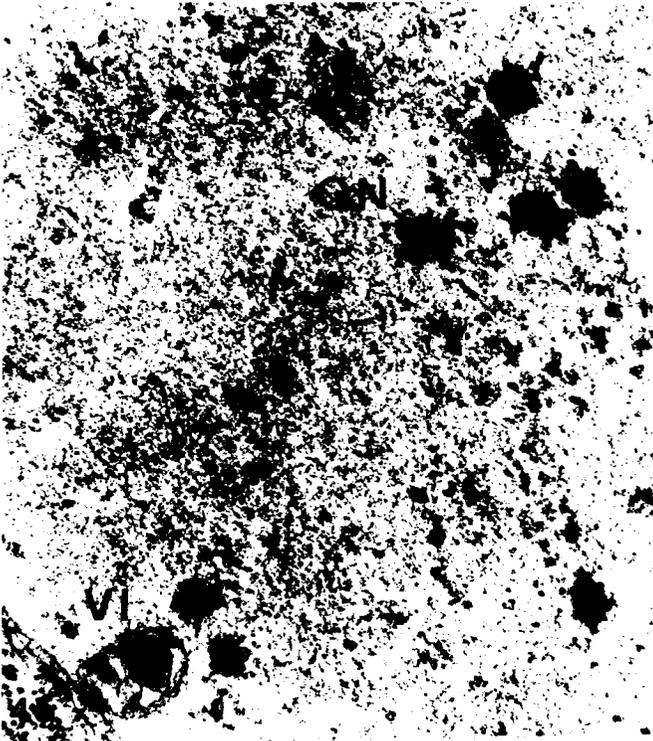


PLANCHE XI

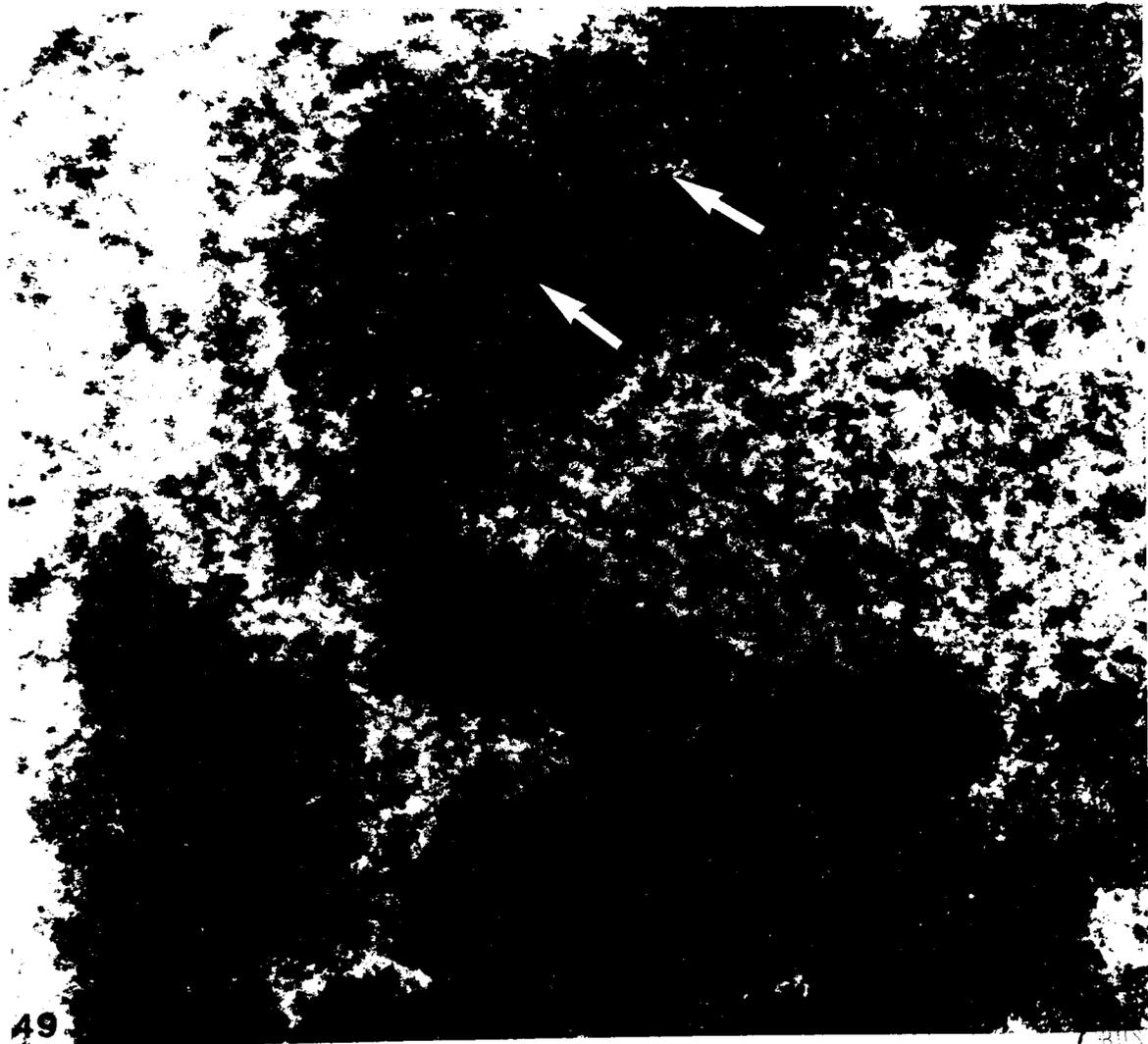
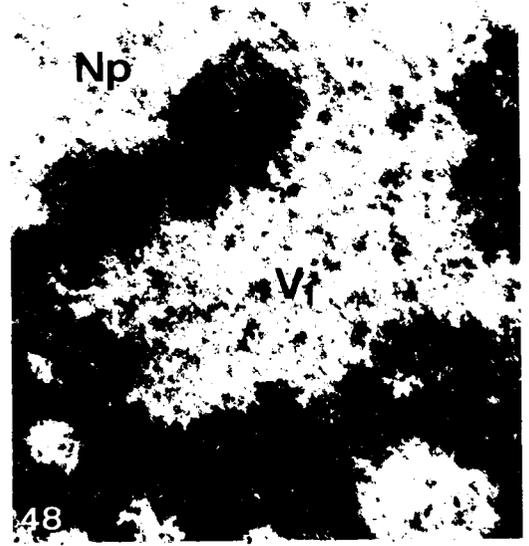
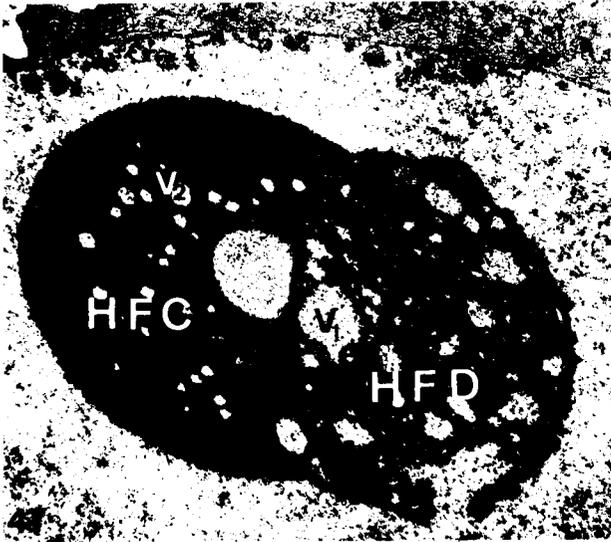
Stade de maturité.

Figure 47 - Le nucléole de l'ovocyte mature ( $200 \mu$ ) est constitué de deux hémisphères de nature fibrillaire, de densité différente aux électrons. L'hémisphère fibrillaire dense (HFD) contient des vacuoles ( $V_1$ ) à contour irrégulier, en communication avec le nucléoplasme. Les vacuoles ( $V_2$ ) de l'hémisphère fibrillaire clair (HFC) ne semblent pas en relation avec le nucléoplasme. x 4 000

Figure 48 - Détail de l'hémisphère fibrillaire dense montrant une vacuole ( $V_1$ ) en communication avec le nucléoplasme (Np). Le matériel fibrillaire constituant cet hémisphère se fragmente en formations de  $0,5 \mu$  environ (étoiles). x 22 500

Figure 49 - Structure du matériel de l'hémisphère <sup>fibrillaire</sup> dense. Il est constitué d'un feutrage de fibrilles très serrées et de granules de 200 à 300 Å entourés d'un espace clair (flèches). Le contenu granuleux de la vacuole ( $V_1$ ) semble résulter de la dispersion du matériel nucléolaire. x 45 000





BUS  
ELECT

PLANCHE XII

Stade de maturité.

Figure 50 - Vue de détail montrant la différence de densité entre le matériel de l'hémisphère fibrillaire dense (FD) et celui de l'hémisphère fibrillaire clair (FC).  $V_1$  : vacuole de l'hémisphère fibrillaire dense, à contenu granuleux. Np : nucléoplasme.  
x 60 000

Figure 51 - Vue de détail de l'hémisphère fibrillaire clair. FC : matériel fibrillaire clair qui pourrait résulter de la dégranulation du constituant fibrillo-granulaire (voir Planche IX).  $V_2$  : vacuole à contenu diffus. Np : nucléoplasme. x 60 000



3777  
1977

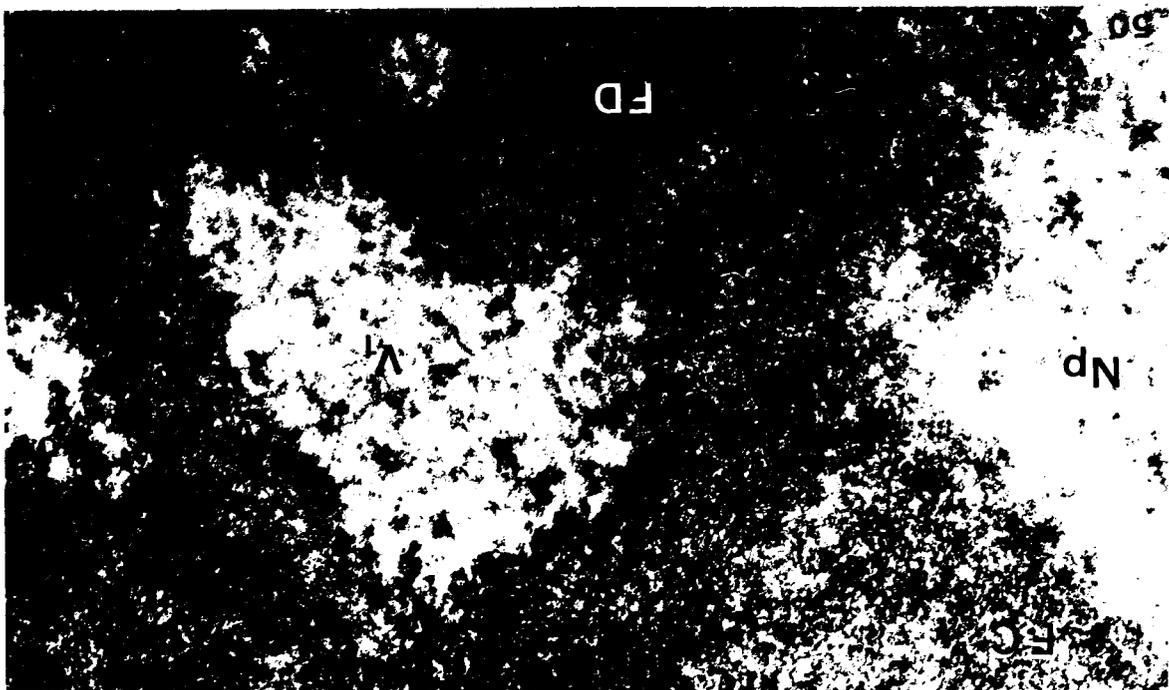
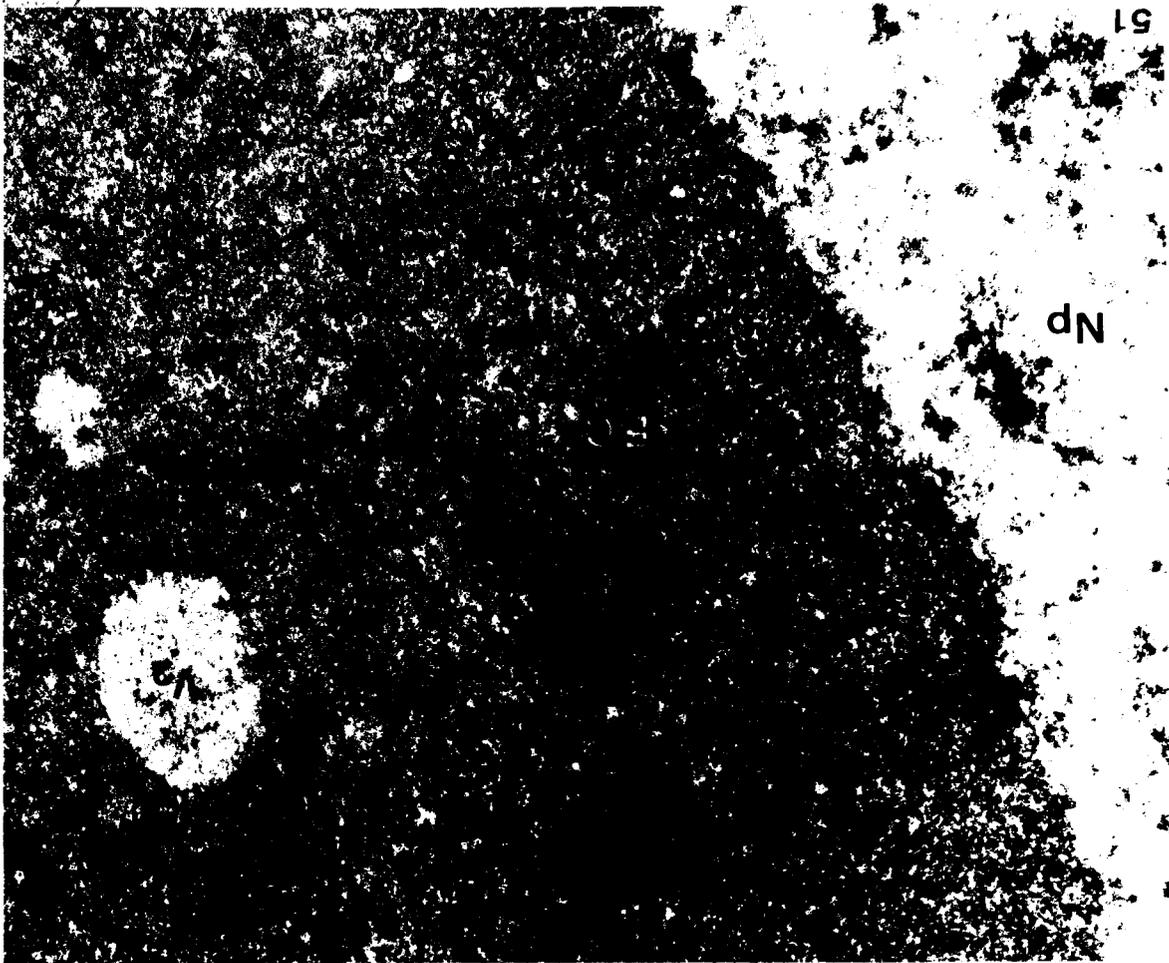


PLANCHE XIII

Stade maturité. Micronucléoles.

Figure 52 - Micronucléoles dans le nucléoplasme d'un ovocyte mature. D : micronucléoles denses. C : micronucléole clair. x 45 000

Figure 53 - Nucléoplasme sous-jacent à l'enveloppe nucléaire dans un ovocyte mature. On observe de nombreux micronucléoles denses (mNu) dont certains sont accolés (flèches) à des vésicules intranucléaires (VI). P : pores nucléaires sectionnés tangentièlement. x 18 000

Figure 54 - Région nucléoplasmique voisine de celle de la micrographie précédente. Micronucléole clair (mNu) en relation (flèches) avec des vésicules intranucléaires (VI). x 40 000





## PLANCHE XIV

Etude cytochimique du nucléole au cours de l'ovogenèse expérimentale.

Figure 55 - Ovocyte d'un diamètre initial de 90  $\mu$  après 6 jours de culture organotypique en absence de cerveau. Mise en évidence de l'ARN. Le nucléole présente une structure annulaire. Le matériel basophile est réparti à la périphérie de l'organite tandis qu'une vacuole non colorée occupe la partie centrale. (Bleu de toluidine pH 4,2). x 900

Figure 56 - Ovocyte d'un diamètre initial de 90  $\mu$  après 6 jours de culture. Mise en évidence des protéines basiques. La vacuole est nettement moins colorée que l'anneau nucléolaire. (Fast green pH 8,1 selon ALFERT et GESCHWIND). x 2 000

Figures 57 à 62 - Etude cytochimique du nucléole ségrégué. (ovocytes fixés 4 semaines après la décérébration in vivo).

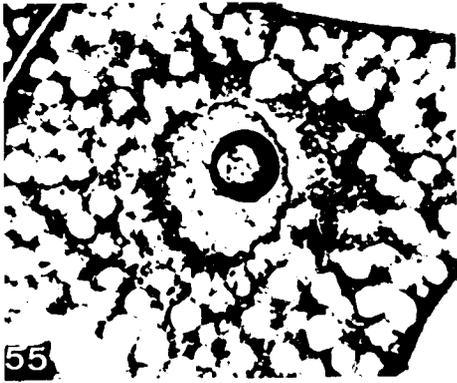
Figure 57 - Ovocyte d'un diamètre initial de 100  $\mu$ . Mise en évidence de l'ARN. Ségrégation entre un hémisphère vacuolisé basophile (HVB) et un hémisphère homogène acidophile (HHA). (Bleu de toluidine pH 4,2). x 2 000

Figures 58 et 59 - Ovocytes d'un diamètre initial de 90  $\mu$  (fig. 58) ou de 140  $\mu$  (fig. 59). Mise en évidence des protéines basiques après hydrolyse des acides nucléiques. La coloration est plus intense au niveau de l'hémisphère vacuolisé (HV) que de l'hémisphère homogène (HH). (Fast green pH 8,1 selon ALFERT et GESCHWIND). x 2000

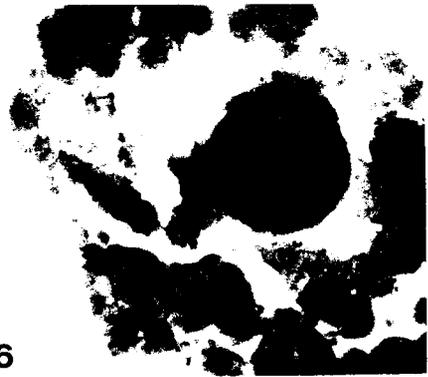
Figure 60 - Ovocyte d'un diamètre initial de 90  $\mu$ . Mise en évidence des protéines basiques sans hydrolyse préalable des acides nucléiques. Seul l'hémisphère homogène (HH) est coloré. HV : hémisphère vacuolisé. (Comparer avec la figure 58). (Fast green pH 8,1). x 2 000

Figure 61 - Ovocyte d'un diamètre initial de 80  $\mu$ . Mise en évidence des protéines acides. Coloration très faible au niveau de l'hémisphère vacuolisé (HV), très intense au niveau de l'hémisphère homogène (HH). Dans le nucléoplasme, des formations sphériques sont également colorées (flèches). (Bleu de toluidine pH 9 selon SMETANA et BUSCH). x 2 000

Figure 62 - Ovocyte d'un diamètre initial de 70  $\mu$ . Mise en évidence des protéines sulfhydrylées. Coloration faible au niveau de l'hémisphère vacuolisé (HV) très élevée au niveau de l'hémisphère homogène (HH).



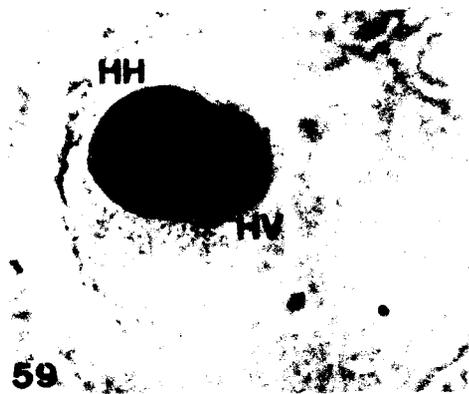
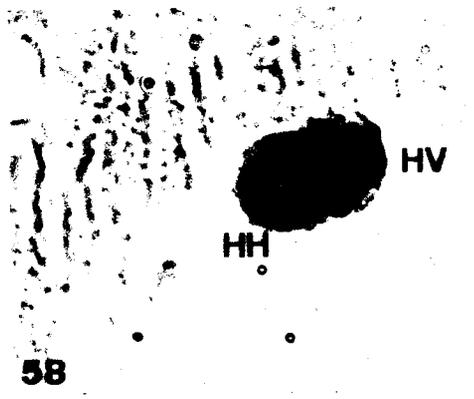
55



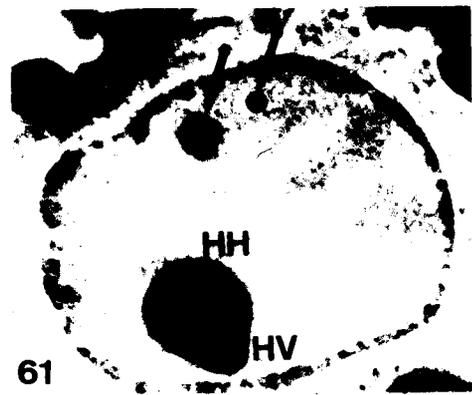
56



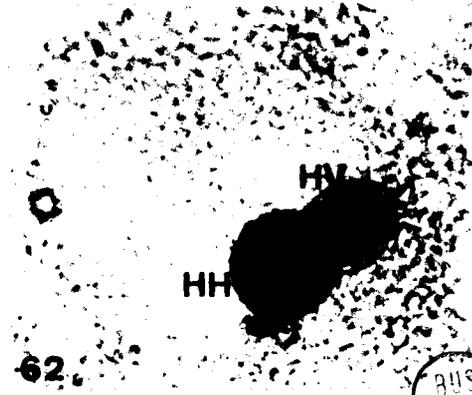
58



59



61



62

BUS  
L. 10. 1968

PLANCHE XV

Figures 63 à 66 - Etude autoradiographique des synthèses d'ARN au cours de l'ovogenèse expérimentale. (Incorporation d'uridine tritiée pendant 48 heures après des durées variables d'évolution en absence de cerveau. Ovocytes d'un diamètre initial de 90  $\mu$ ). Les ovocytes représentés sur ces 4 figures proviennent d'une même série expérimentale.

Figure 63 - Incorporation après 10 jours d'évolution. Le nucléole possède une structure annulaire. L'anneau nucléolaire présente un marquage intense. Aucun grain d'argent n'est visible au niveau de la vacuole centrale. Remarquer le marquage élevé du cytoplasme. x 900

Figure 64 - Ovocyte témoin. Radioactivité élevée du nucléole. Le marquage du cytoplasme est moins important qu'après 10 jours d'évolution en condition an hormonale (comparer avec la fig. 63). x 900

Figure 65 - Incorporation après 22 jours d'évolution. Les deux hémisphères, basophile (HB) et acidophile (HA), du nucléole ségrégué présentent quelques grains d'argent. Le marquage des autres sites cellulaires est pratiquement nul. x 2 000

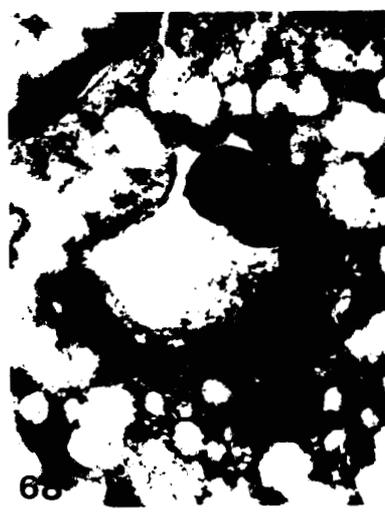
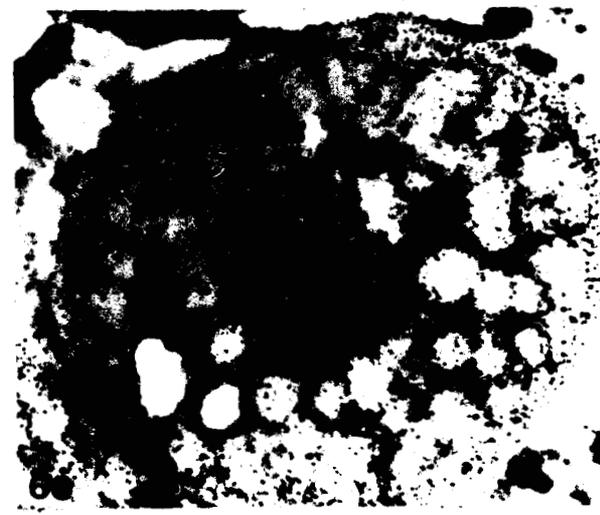
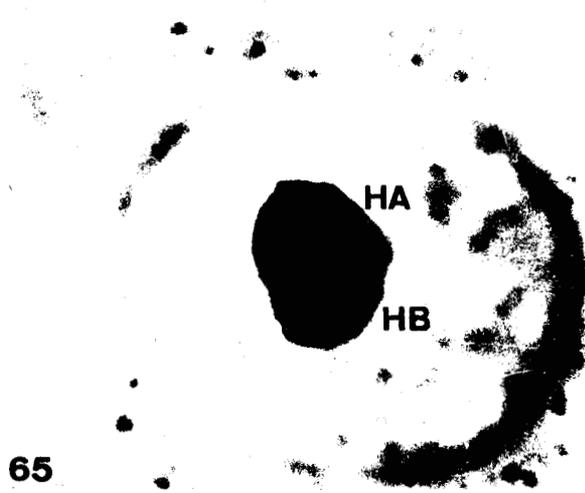
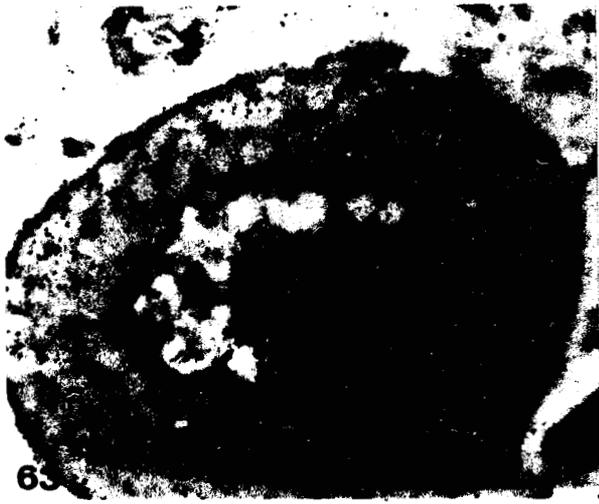
Figure 66 - Incorporation après 10 jours d'évolution, fixation au 22e jour d'évolution. Marquage très intense de tous les sites cellulaires. La radioactivité nucléolaire est concentrée au niveau de l'hémisphère acidophile (HA). HB : hémisphère basophile. x 900

Figures 67 à 69 - Effets du rétablissement du facteur cérébral au cours de l'ovogenèse expérimentale (ovocytes d'un diamètre initial de 90  $\mu$  en culture organotypique à 20° C. Coloration par le Bleu de toluidine pH 4,2). Les ovocytes représentés sur ces 3 figures proviennent d'une même série expérimentale.

Figure 67 - Ovocytes cultivés pendant 24 jours dont les 3 premiers en condition an hormonale. Remarquer la structure annulaire des nucléoles. x 300

Figure 68 - Ovocytes cultivés pendant 24 jours dont les 6 premiers en condition an hormonale. Le nucléole a subi la ségrégation de ses constituants. x 1 200

Figure 69 - Ovocytes cultivés pendant 6 jours en condition an hormonale. Les nucléoles présentent une structure annulaire. x 600



BUS  
LIFE

PLANCHE XVI

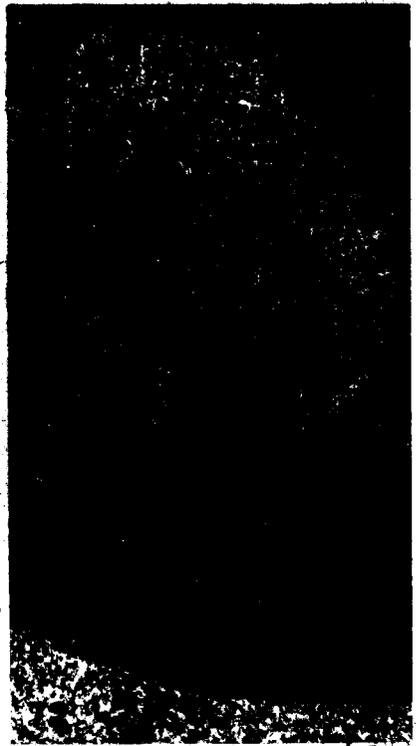
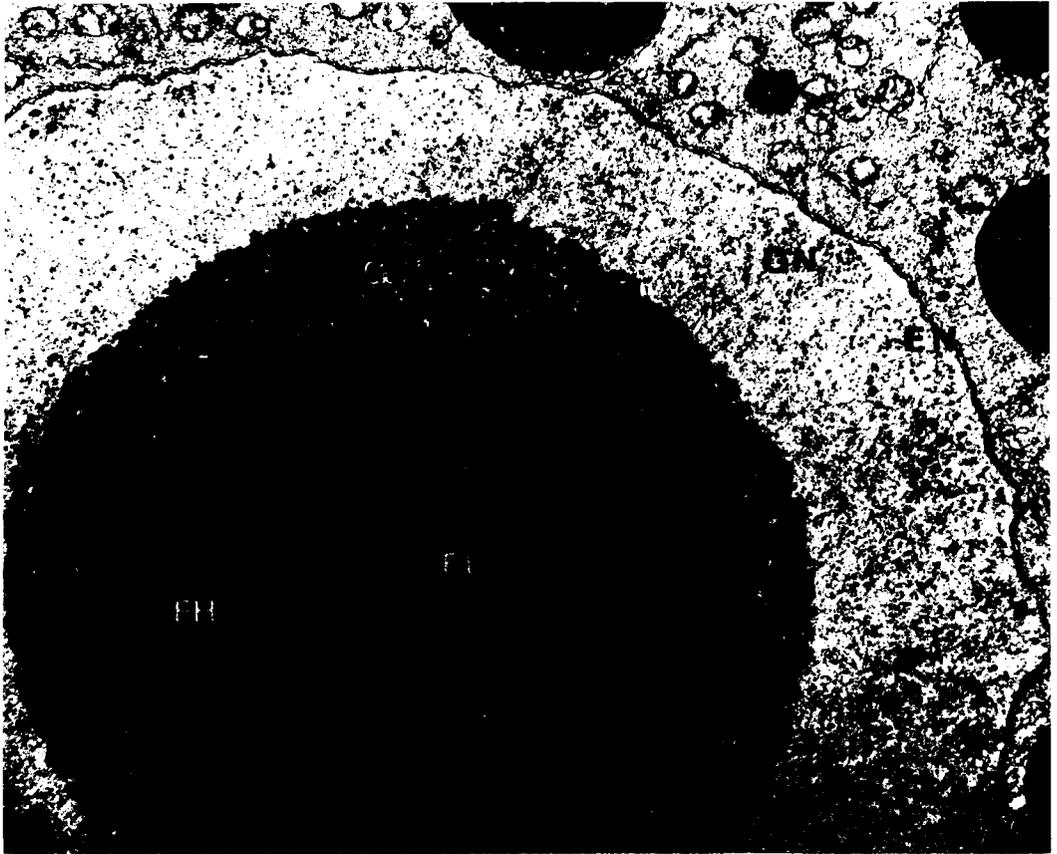
Formation du nucléole annulaire.

Figure 70 - Nucléole d'un ovocyte de 70  $\mu$  après 24 heures de culture organotypique en absence de cerveau. La structure du nucléole n'est pas modifiée. On observe les 3 zones concentriques, caractéristiques du nucléole de l'ovocyte en phase de vitellogenèse protéique (voir planche VI) : zone fibrillaire lacunaire (FL), zone fibrillaire homogène (FH), zone granulaire (G).  
GN : granulations nucléoplasmiques. EN : enveloppe nucléaire.  
x 12 000

Figure 71 - Détail de la région corticale du nucléole de la figure 70.  
Remarquer l'organisation du composant granulaire (G) en trabécules anastomosés. FH : zone fibrillaire homogène. X 30 000

Figure 72 - Nucléole d'un ovocyte de 70  $\mu$  après 48 heures de culture.  
Une vacuole (V), d'un diamètre moyen de 2,5  $\mu$  s'est développée au centre de l'organite. Les constituants fibrillaire et granulaire sont situés au niveau de l'anneau nucléolaire (ANu).  
X 20 000





71  
LILLE

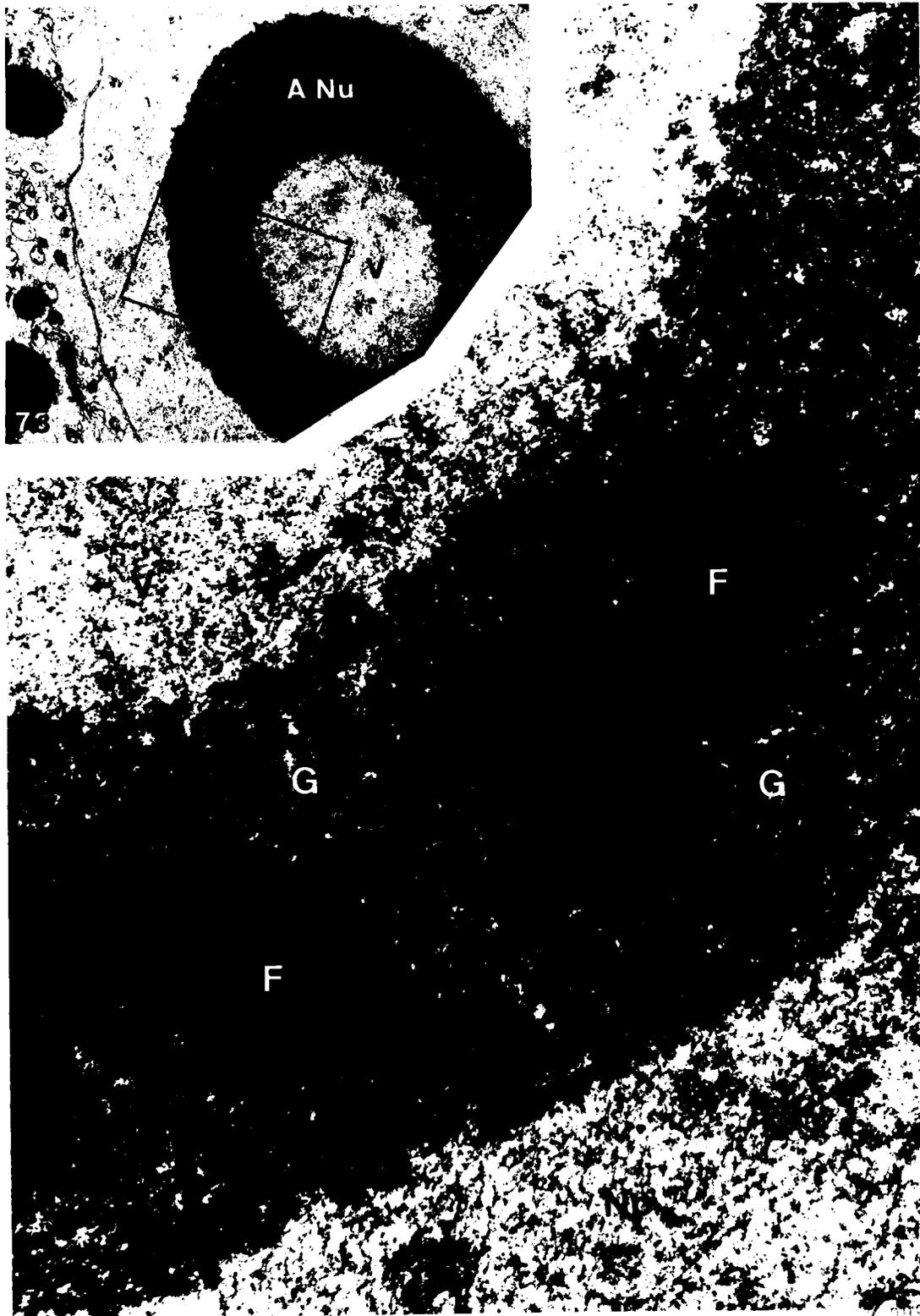
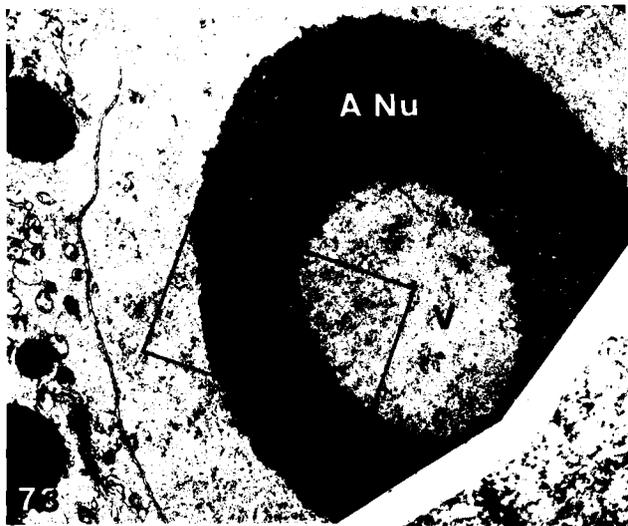
PLANCHE XVII.

Stade du nucléole annulaire.

Figure 73 - Nucléole après 3 jours de culture (ovocyte d'un diamètre initial de  $60 \mu$ ). Vacuole (V) de  $5 \mu$  délimitée par l'anneau nucléolaire (ANu). x 6 500

Figure 74 - Vue de détail de la partie encadrée de la figure 73. L'anneau nucléolaire est constitué de plages fibrillaires (F) dispersées dans le composant granulaire (G). La flèche indique une formation de  $1\ 000 \text{ \AA}$  issue de la fragmentation du composant granulaire situé à la périphérie de la vacuole (V). Np : nucléoplasme. x 45 000





## PLANCHE XVIII

Stade du nucléole annulaire.

Figure 75 - Détail de la structure du nucléole après 3 jours de culture (ovocyte d'un diamètre initial de  $80 \mu$ ). Le composant granulaire (G) situé à la périphérie de la vacuole se fragmente en formations de  $1000$  à  $2000 \text{ \AA}$  (flèches). Le contenu vacuolaire (granules de  $150 \text{ \AA}$  (Gr) et matériel amorphe lâchement organisé) semble résulter de la dissociation de ces formations. F : plage fibrillaire. GN : granulations nucléoplasmiques provenant vraisemblablement, comme au cours de l'ovogenèse naturelle, de l'évolution du matériel granulaire de la région corticale du nucléole. x 58 000

Figure 76 - Relations nucléocytoplasmiques dans un ovocyte (diamètre initial de  $60 \mu$ ) après 3 jours de culture. GN : granulations nucléoplasmiques. P : pore de l'enveloppe nucléaire. Ex : extrusion nucléaire. M : mitochondrie. X 42 000

Figure 77 - Appareil de Golgi après 3 jours de culture (ovocyte d'un diamètre initial de  $60 \mu$ ). La structure du dictyosome est caractéristique du stade de vitellogenèse protéique. Les vésicules golgiennes (VG), participant à l'accroissement des granules vitellins, sont nombreuses. SG : saccules golgiens. M : mitochondrie. x 49 000



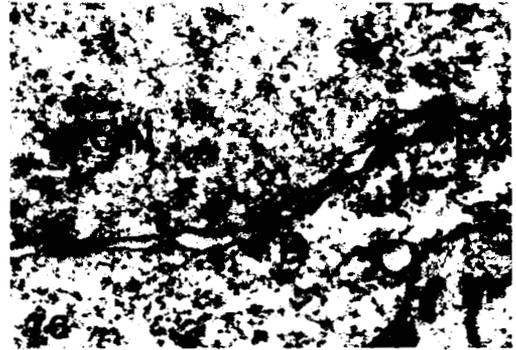
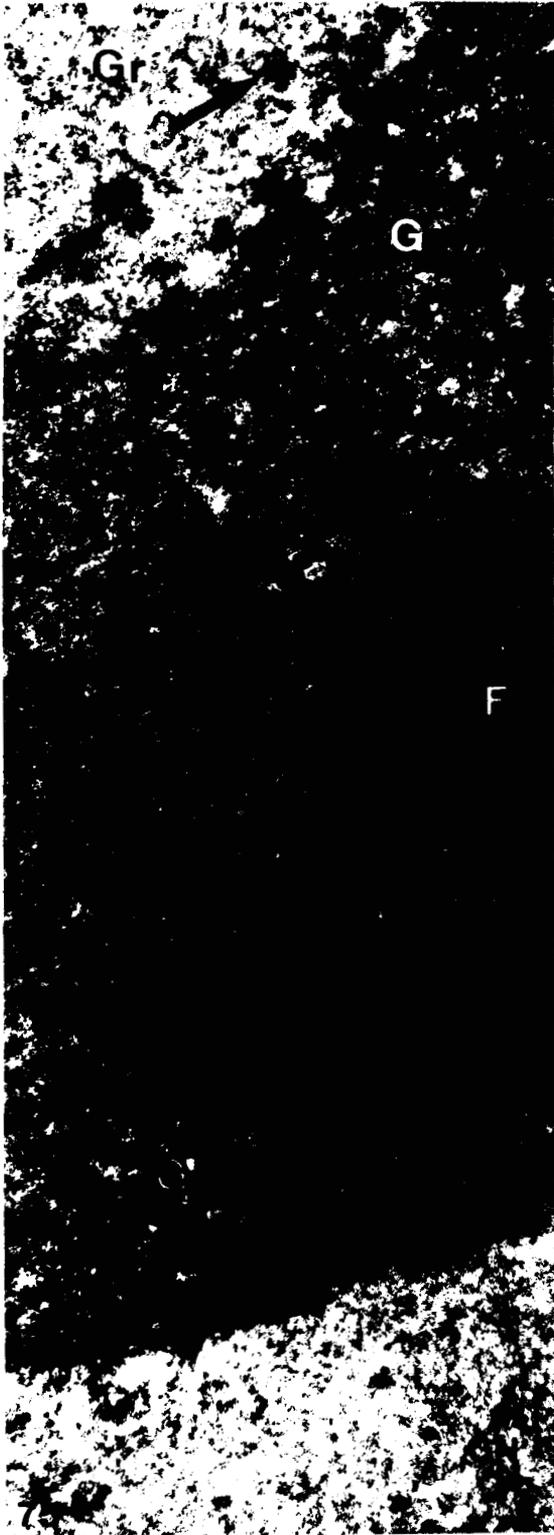


PLANCHE XIX

Fin du stade du nucléole annulaire.

Figure 78 - Nucléole après 6 jours de culture (ovocyte d'un diamètre initial de  $60 \mu$ ). Coupe semi-fine colorée par le bleu azur. Le diamètre de la vacuole (V) atteint  $11 \mu$ . La largeur de l'anneau nucléolaire (ANu) ne dépasse pas  $0,8 \mu$ . x 1 800

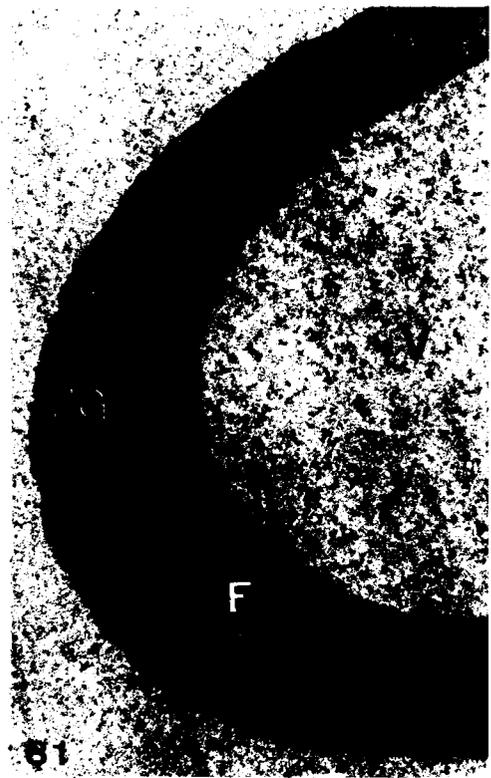
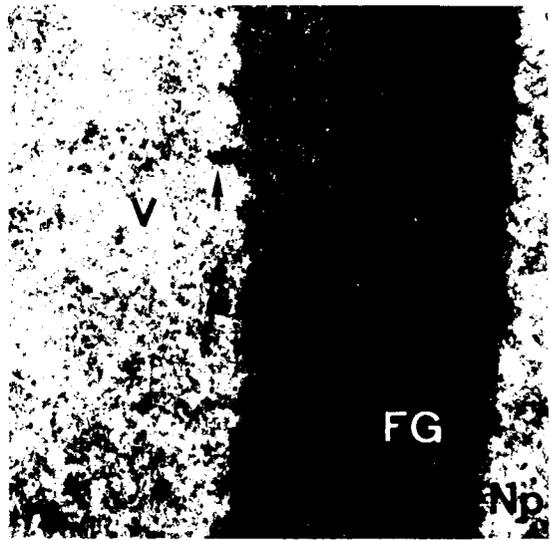
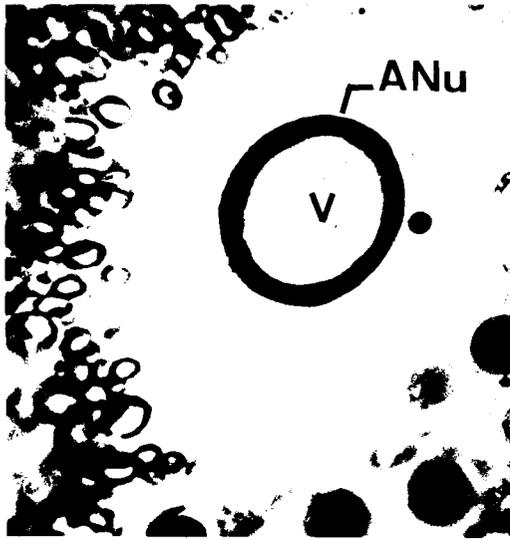
Figure 79 - Détail de la structure du nucléole de la figure 78 montrant le constituant fibrillo-granulaire (FG) au niveau de l'anneau nucléolaire. Le contenu de la vacuole (V) continue à être élaboré à partir du matériel de l'anneau nucléolaire (flèches) selon le processus déjà observé après 3 jours d'expérimentation (Pl. XVIII, fig. 75). Np : nucléoplasme. x 42 000

Figure 80 - Nucléole annulaire dans un ovocyte d'un diamètre initial de  $90 \mu$ , ayant subi une évolution de 18 jours après décérébration in vivo. L'organisation du nucléole est semblable à celle qui est observée in vitro. V : vacuole. ANu : anneau nucléolaire. x 5 000

Figure 81 - Vue de détail du nucléole de la figure 80. L'anneau nucléolaire est constitué de plages fibrillaires (F) dispersées dans le constituant fibrillo-granulaire (FG). La vacuole (V) contient de nombreuses formations issues de la fragmentation du constituant fibrillo-granulaire. x 7 500

Figure 82 - Structure des dictyosomes de l'ovocyte dont provient le nucléole des figures 80 et 81 (18 jours d'évolution in vivo). Les vésicules golgiennes (VG) sont peu nombreuses. SG : saccules golgiens. M : mitochondrie. x 27 000





1954  
LILLIE

PLANCHE XX

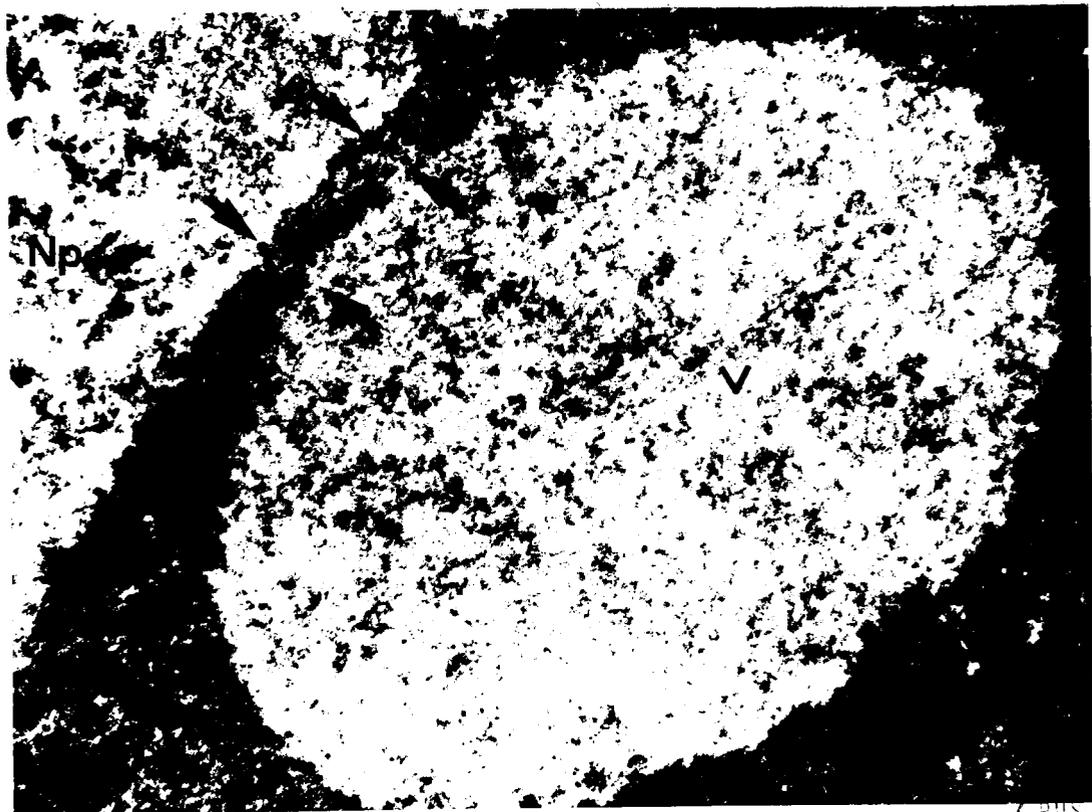
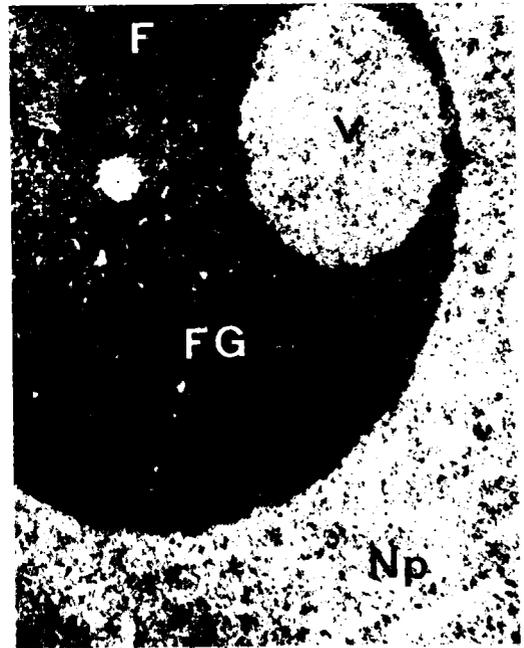
Régression de la vacuole.

Figure 83 - Nucléole après 7 jours de culture (ovocyte d'un diamètre initial de  $80 \mu$ ). Coupe semi-fine colorée par le bleu azur. Le nucléole a diminué de taille ( $8 \mu$ ) et a retrouvé un aspect compact à la suite de la disparition de la vacuole centrale. Seules de petites vacuoles, d'un diamètre moyen de  $1 \mu$ , sont visibles (flèches). x 2 500

Figure 84 - Nucléole après 7 jours de culture (ovocyte d'un diamètre initial de  $80 \mu$ ). Une vacuole (V) de  $4 \mu$  se trouve à la périphérie de l'organite. F : constituant fibrillaire. FG : constituant fibrillo-granulaire. Remarquer l'aspect très granuleux du nucléoplasme (Np). x 6 000

Figure 85 - Vue de détail de la vacuole du nucléole de la figure 84. Le contenu de la vacuole (V) n'est séparé du nucléoplasme (Np) que par un fin cordon de 2 000 à 3 000 Å. Certaines régions de ce cordon sont constituées d'un matériel extrêmement lâche (flèches). Le nucléoplasme contient de nombreuses granulations de densité variable. x 28 000





BUS  
LTD.

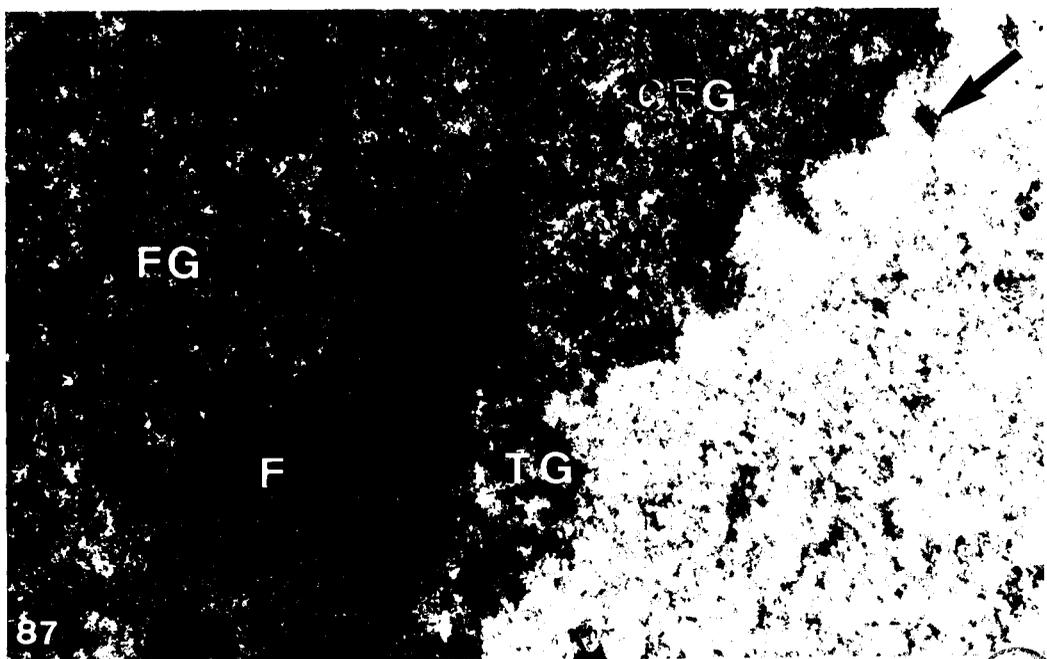
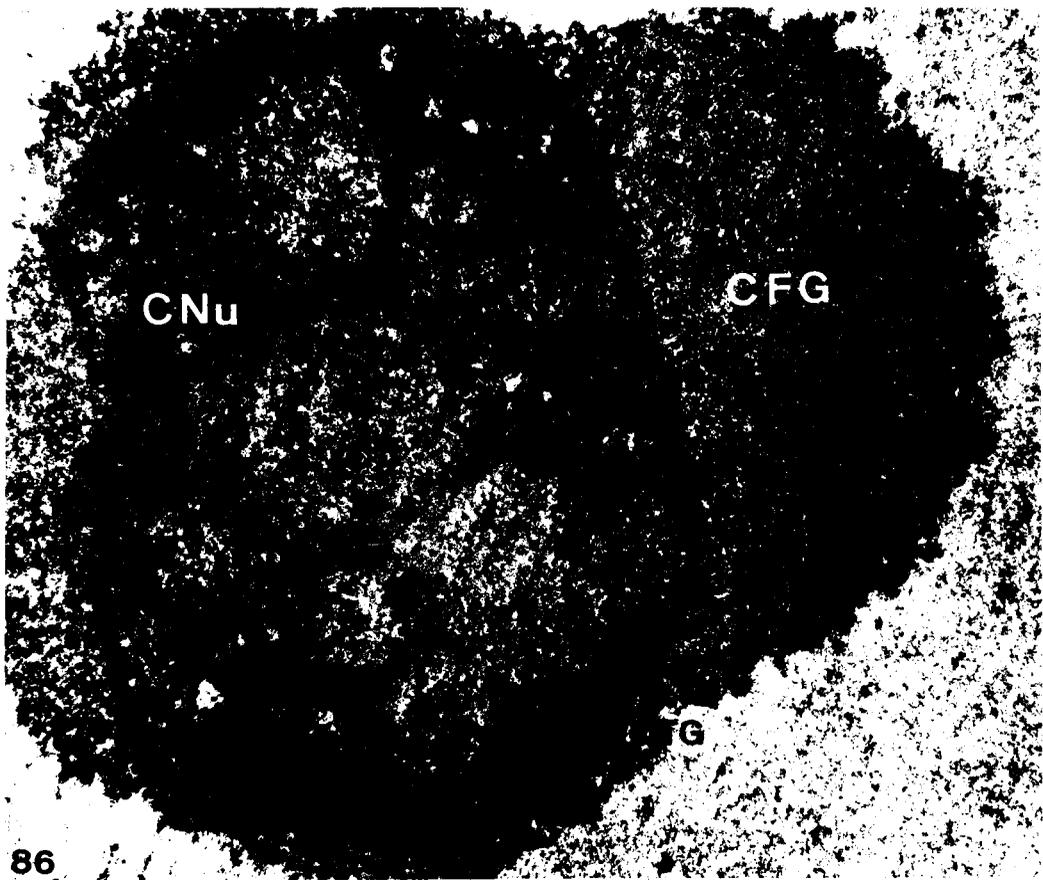
PLANCHE XXI

Formation de la coiffe nucléolaire.

Figure 86 - Nucléole après 10 jours de culture (ovocyte d'un diamètre initial de  $90 \mu$ ). Le corps nucléolaire (Nu) comprend un réseau dense aux électrons constitué de matériel fibrillaire, et des plages plus claires occupées par le composant fibrillo-granulaire. La coiffe nucléolaire (CFG) est uniquement de nature fibrillo-granulaire. Des trabécules de matériel granulaire (TG) sont localisées à la périphérie de l'organite. x 16 500

Figure 87 - Vue de détail du nucléole de la figure 86, montrant la structure des différents composants nucléolaires : composants fibrillaire (F) et fibrillo-granulaire (FG) du corps nucléolaire, coiffe fibrillo-granulaire (CFG), trabécules granulaires (TG) qui se fragmentent en formations de  $1000 \text{ \AA}$  (flèche). x 42 000





BUS  
FILE

PLANCHE XXII

Stade du nucléole ségrégué.

Figure 88 - Nucléole après 20 jours de culture (ovocyte d'un diamètre initial de  $90 \mu$ ). Le corps nucléolaire (CNU) a diminué de taille au profit de la coiffe fibrillo-granulaire (CFG). Le corps nucléolaire est essentiellement de nature fibrillaire. Quelques plages de matériel fibrillo-granulaire subsistent encore sous forme de zones plus claires, finement vacuolisées. TG : trabécules granulaires. VI : vésicules intranucléaires. x 13 000

Figure 89 - Vue de détail du nucléole de la figure 88, montrant le composant fibrillaire du corps nucléolaire (CNU), le composant fibrillo-granulaire de la coiffe nucléolaire (CFG) et les trabécules granulaires (TG) en position périphérique. x 60 000

Figure 90 - Vue de détail du corps nucléolaire montrant le constituant fibrillaire (F) et une plage fibrillo-granulaire (FG).  
x 34 000

Figure 91 - Nucléole ségrégué dans un ovocyte d'un diamètre initial de  $140 \mu$ . On retrouve les différents constituants observés chez les ovocytes plus jeunes au moment de la mise en culture : coiffe fibrillo-granulaire (CFG), corps nucléolaire (CNU), trabécules granulaires (TG) plus développés à la périphérie du corps nucléolaire que de la coiffe fibrillo-granulaire. x 10 000



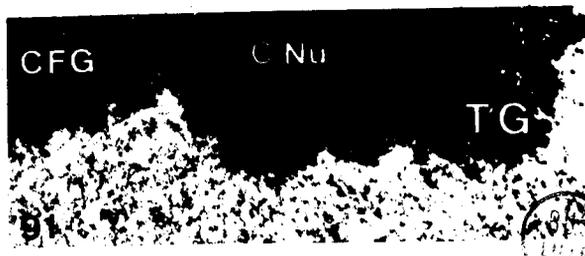
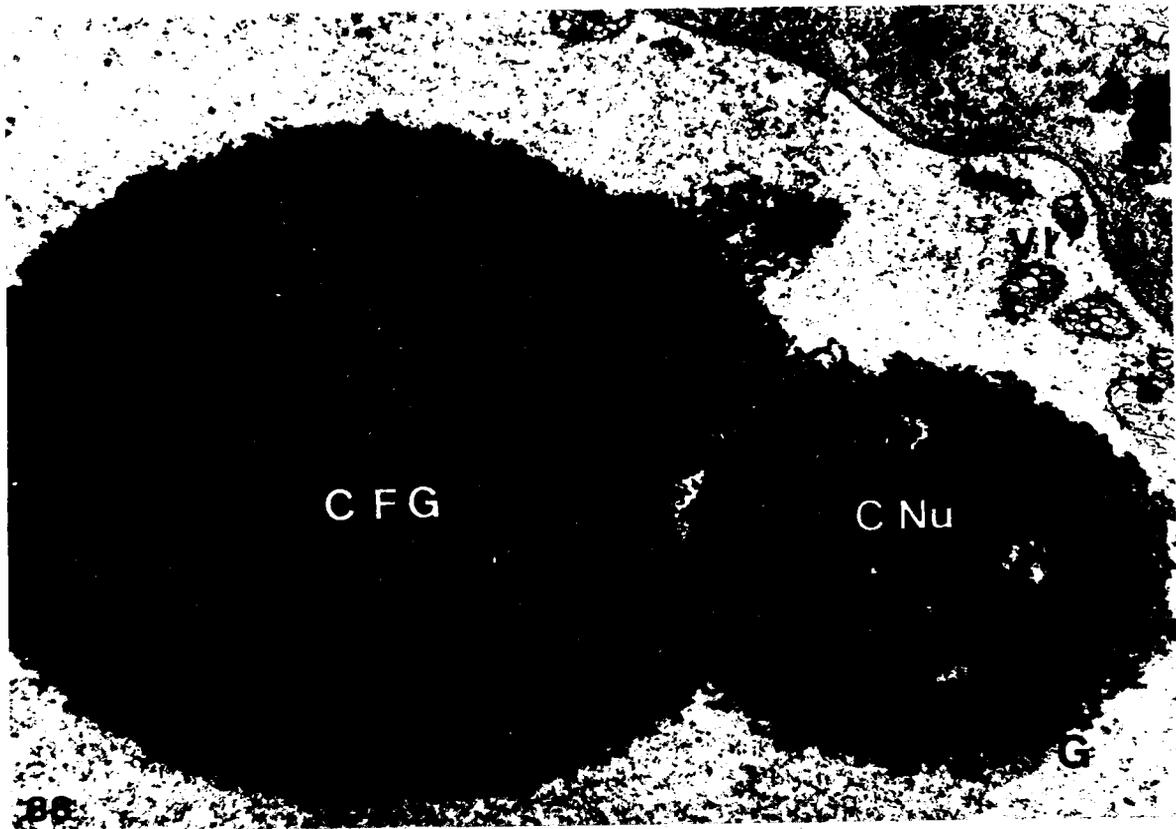


PLANCHE XXIII

Stade du nucléole ségrégué. Micronucléoles et vésicules intranucléaires.

Figure 92 - Nucléoplasme sous-jacent à l'enveloppe nucléaire après 10 jours de culture (ovocyte d'un diamètre initial de 90  $\mu$ ). Les vésicules intranucléaires (VI) sont très nombreuses, chacune d'elles contient 3 à 4 granules denses. x 6 000

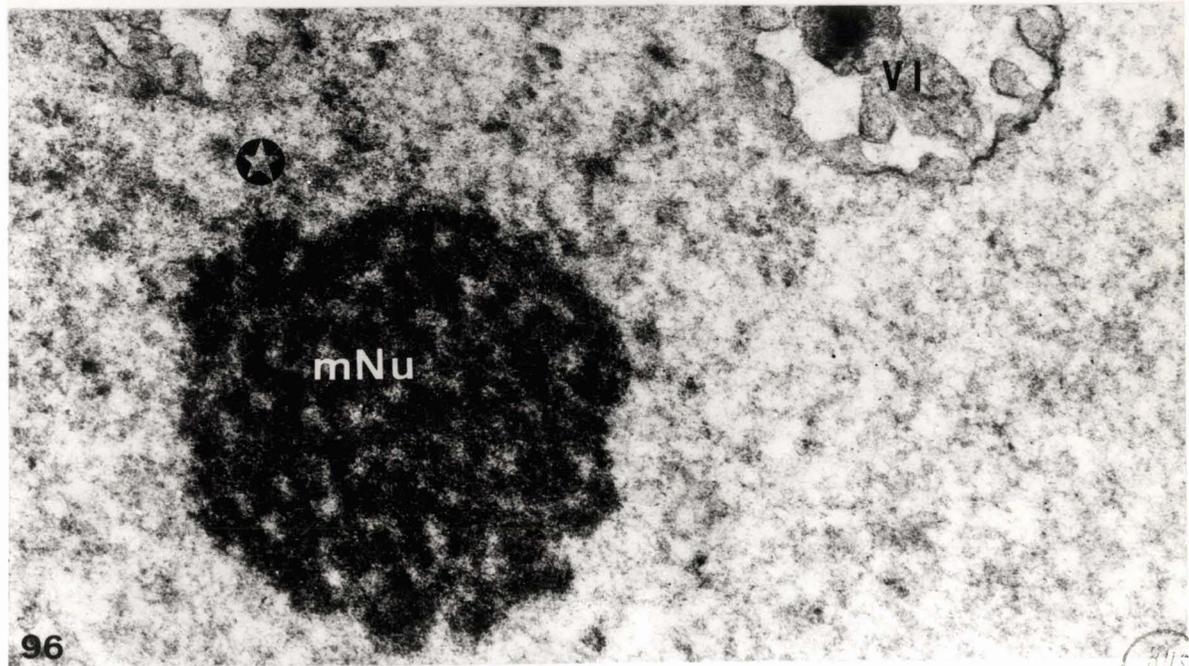
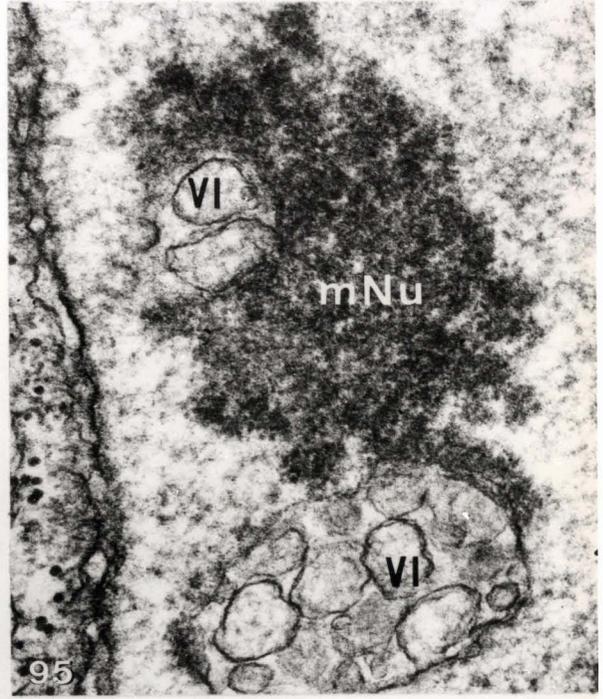
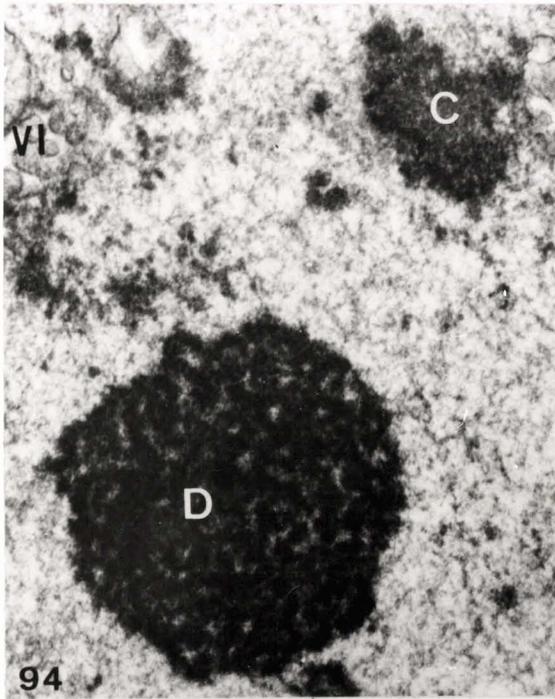
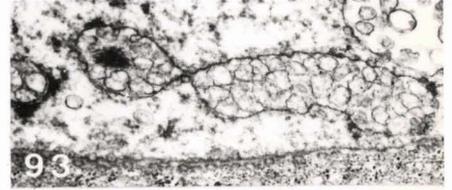
Figure 93 - Nucléoplasme sous-jacent à l'enveloppe nucléaire après 20 jours de culture (ovocyte d'un diamètre initial de 90  $\mu$ ). Le contenu des vésicules est d'une densité analogue à celle du nucléoplasme. x 14 000

Figure 94 - Micronucléoles dans le nucléoplasme sous-jacent à l'enveloppe nucléaire, après 20 jours de culture (ovocyte d'un diamètre initial de 90  $\mu$ ). D : micronucléole dense. C : micronucléole clair. VI : vésicule intranucléaire. x 35 000

Figure 95 - Micronucléole clair (mNu) en contact avec des vésicules intranucléaires (VI). La nature fibrillo-granulaire de ce type de micronucléole est très nette. x 60 000

Figure 96 - Micronucléole dense (mNu), constitué d'un matériel fibrillaire organisé en trabécules anastomosés, dont les plus externes se dissocient dans le nucléoplasme (étoile). VI : vésicule intranucléaire. x 60 000





BUS  
LILLE

## PLANCHE XXIV

Action d'inhibiteurs métaboliques sur la structure du nucléole.

Figure 97 - Structure du nucléole d'un ovocyte de 80  $\mu$  (stade de vitellogenèse protéique) 24 heures après une injection d'actinomycine D in vivo (150  $\mu\text{g/g}$ ). L'organisation nucléolaire n'a pas évolué par rapport à celle des témoins (voir Pl. VI, fig. 31).  
ZF : zone fibrillaire. ZG : zone granulaire. x 13 000

Figure 98 - Structure du nucléole d'un ovocyte de 150  $\mu$  (stade d'élaboration des glucides) 24 heures après une injection d'actinomycine D in vivo (150  $\mu\text{g/g}$ ). La structure du nucléole n'est pas modifiée par rapport à celle des témoins (voir Pl. IX, fig. 40).  
F : constituant fibrillaire. FG : constituant fibrillo-granulaire. x 18 000

Figure 99 - Structure du nucléole d'un ovocyte de 80  $\mu$  maintenu en présence de puromycine (20  $\mu\text{g/ml}$ ) pendant 3 jours en culture organotypique. On retrouve les 3 zones caractéristiques du stade de vitellogenèse protéique : fibrillaire lacunaire (FL), fibrillaire homogène (FH), granulaire (G). La zone fibrillaire lacunaire comporte des vacuoles dont certaines sont très développées (V). Remarquer la dilatation des espaces clairs compris entre les trabécules de la zone granulaire qui semble subir une fragmentation très intense. x 15 000

