

50376  
1978  
245

50376  
1978  
245

Exclu du prêt

# THESE

N° d'ordre 701

présentée

devant l'Université de Lille I

pour obtenir

le Diplôme de Doctorat de III<sup>e</sup> Cycle  
de Biologie du Développement et de la Reproduction  
(Mention Endocrinologie des Invertébrés)

par

Laurent MEIJER

CONTROLE HORMONAL DE LA MATURATION  
DES OVOCYTES CHEZ DEUX INVERTEBRES,  
*ARENICOLA MARINA* (ANNELIDE, POLYCHETE) ET  
*APLYSIA PUNCTATA* (MOLLUSQUE, GASTEROPODE)



Soutenu le 30 Juin 1978

devant la Commission d'Examen:

M. M. DURCHON	Président
M. A. DHAINAUT	} Examineurs
M. M. PORCHET	
M. P. GUERRIER	

*L'enfant ne sait rien  
Le philosophe sait qu'il ne  
sait rien  
Entre les deux, c'est la vanité*

*Passer sa vie à apprendre qu'on  
ne sait rien  
Passer sa vie à devenir enfant*

*(B. MEURICE, Fleurs de Corail)*

*Tard dans la nuit, l'oeil fixé à son microscope, examinant du plancton, il entendait soudain un chœur de voix. La première disait: " Quelle jolie petite chose, ni plante ni animal, mais réservoir de toute vie au monde. Si toutes ces particules venaient à mourrir, tout ce qui vit sur la terre mourrait à son tour".*

*La seconde voix disait: " Qu'est-ce que tu cherches, petit homme? Est-ce toi que tu cherches à identifier? Examines-tu de petites choses pour éviter les plus importantes?"*

*Et la troisième voix, la plus basse, disait: " Seul, tu es seul. A quoi bon celà sert-il de penser? Tu cherches à t' évader. Tu veux te débarrasser de ta solitude."*

*(STEINBECK, Tendre Jeudi)*

#### ABREVIATIONS

Ac	ACROSOME
AC	ALVEOLE CORTICAL
B I	PREMIER BLOCAGE DE LA MEIOSE
B II	DEUXIEME BLOCAGE DE LA MEIOSE
Ce	CENTRIOLE
Ch	CHORION
Chr	CHROMATINE, CHROMOSOME
Cp	CYTOPHORE
Cy	CYTOPLASME
DO	DENSITE OPTIQUE
EDM	EAU DE MER
EDMA	EAU DE MER ARTIFICIELLE
ELH	EGG LAYING HORMONE
EN	ENVELOPPE NUCLEAIRE
F	FUSEAU DE DIVISION MEIOTIQUE
Fl	FLAGELLE
G	APPAREIL DE GOLGI
GI	GLYCOGENE
GP	GLOBULE POLAIRE
GSS	GONAD STIMULATING SUBSTANCE
L	LIPIDES
M I	PREMIERE METAPHASE DE MEIOSE
M II	DEUXIEME METAPHASE DE MEIOSE
Mi	MITOCHONDRIE
MIS	MATURATION INDUCING SUBSTANCE
Mp	MEMBRANE PLASMIQUE
Me	MICROTUBULES
Mv	MICROVILLOSITE
N	NOYAU
Np	NUCLEOPLASME
Nu	NUCLEOLE
P I	PREMIERE PROPHASE DE MEIOSE
PR,p	PROSTOMIUM
RE	RETICULUM ENDOPLASMIQUE
RVG	RUPTURE DE LA VESICULE GERMINATIVE
Spz	SPERMATOZOIDES
SRM	SUBSTANCE REINITIATRICE DE LA MEIOSE
TA	TOUFFE APICALE
V	VITELLUS
VG	VESICULE GERMINATIVE

## SOMMAIRE

I - INTRODUCTION . . . . .	p. 1
1.1. Contrôle hormonal des phénomènes de reproduction . . . . .	p. 1
1.2. Maturation ovocytaire : définition - contrôle hormonal . . . . .	p. 3
1.3. Modèles étudiés : <u>Arenicola marina</u> et <u>Aplysia punctata</u> . . . . .	p. 3
1.3.1. <u>Arenicola marina</u> . . . . .	p. 3
1.3.2. <u>Aplysia punctata</u> . . . . .	p. 4
II - MATERIEL ET METHODES	
2.1. Récolte et élevage des animaux . . . . .	p. 6
2.2. Histologie . . . . .	p. 7
2.2.1. Microscopie photonique (M.P.) . . . . .	p. 7
2.2.1.1. Observations de cellules sur le vivant . . . . .	p. 7
2.2.1.2. Colorations histologiques . . . . .	p. 7
2.2.2. Microscopie électronique à transmission (M.E.T.) . . . . .	p. 7
2.2.3. Microscopie électronique à balayage (M.E.B.) . . . . .	p. 8
2.3. Expérimentation . . . . .	p. 8
2.3.1. Préparation d'extraits du système nerveux . . . . .	p. 8
2.3.2. Essais biologiques . . . . .	p. 8
2.3.3. Isolement de noyaux et de chorions d'ovocytes d'arénicole . . . . .	p. 9
2.3.4. Etude de la libération de calcium par une frac- tion subcellulaire d'ovocytes d'arénicole . . . . .	p. 10
III - <u>ARENICOLA MARINA</u> : RESULTATS . . . . .	p. 11
3.1. Système hormonal . . . . .	p. 11
3.1.1. Mise en évidence de l'existence d'un système hormonal . . . . .	p. 11
3.1.2. Propriétés générales de l'hormone . . . . .	p. 11
3.1.2.1. Origine de la SRM . . . . .	p. 11
3.1.2.2. Propriétés physico-chimiques . . . . .	p. 12
3.1.3. Propriétés du mode d'action de la SRM . . . . .	p. 13
3.1.3.1. Cinétique . . . . .	p. 13
3.1.3.2. Courbe dose-réponse . . . . .	p. 14
3.1.4. Autres essais . . . . .	p. 15
3.1.4.1. . . . .	p. 15
3.1.4.2. . . . .	p. 15

3.1.4.3.	3.1.4.4.	3.1.4.5.	p. 16
3.1.4.4.	3.1.4.5.		p. 16
3.1.4.5.			p. 16
3.2.	Changements morphologiques induits par la SRM		p. 16
3.2.1.	Description de l'ovocyte en prophase		p. 16
3.2.1.1.	Microscopie photonique		p. 16
3.2.1.2.	Microscopie électronique à transmission		p. 17
3.2.1.3.	Microscopie électronique à balayage		p. 19
3.2.2.	Description de l'ovocyte en métaphase		p. 19
3.2.2.1.	Microscopie photonique		p. 19
3.2.2.2.	Microscopie électronique à transmission		p. 20
3.2.2.3.	Microscopie électronique à balayage		p. 21
3.2.3.	Etude cinétique des changements morphologiques induits par la SRM		p. 21
3.3.	Rôle du calcium dans la réinitiation de la méïose		p. 24
3.3.1.	Action de substances modifiant les concentrations intracellulaires en calcium		p. 24
3.3.1.1.	Action de la tétracaïne et de la procaine.		p. 25
3.3.1.2.	Action du D-600 et de l'isoptine		p. 26
3.3.1.3.	Action du propranolol et de l'oxprénolol		p. 28
3.3.1.4.	Action du chlorure de lanthane		p. 29
3.3.1.5.	Action de l'ionophore A 23187 et de l'eau de mer artificielle sans calcium		p. 30
3.3.2.	Mise en évidence directe de calcium libéré par l'hormone réinitiatrice de la méïose		p. 30
3.3.3.	Mesure de la constante de dissociation des sites calciques		p. 32
3.4.	Importance des groupements -SH/SS- dans la réinitiation de la méïose		p. 33
3.4.1.	DiThioThréitol (DTT)		p. 34
3.4.2.	2,3 dimercaptopropanol (British Anti-Lewisite, BAL)		p. 34
3.5.	Acquisition de la fertilisabilité au cours de la maturation.		p. 35
3.5.1.	Obtention de spermatozoïdes actifs ("Capacitation")		p. 35
3.5.2.	Fécondation et activation parthénogénétique de l'ovocyte <u>in vitro</u>		p. 37
3.5.2.1.	Fécondation artificielle		p. 37
3.5.2.2.	Activation parthénogénétique		p. 38

3.5.3. Acquisition de la fertilisabilité au cours de la maturation . . . . .	p. 39
IV - <u>APLYSIA PUNCTATA</u> : RESULTATS . . . . .	p. 42
V - DISCUSSION . . . . .	p. 45
5.1. Contrôle de la maturation des ovocytes . . . . .	p. 45
5.1.1. Déclenchement par la fécondation . . . . .	p. 45
5.1.2. Déclenchement par contact avec le milieu extérieur. . . . .	p. 46
5.1.3. Déclenchement par levée d'une inhibition interne. . . . .	p. 46
5.1.4. Déclenchement par des protéases . . . . .	p. 46
5.1.5. Déclenchement par une hormone . . . . .	p. 47
5.1.5.1. Annélides Polychètes . . . . .	p. 49
5.1.5.2. Mollusques Gastéropodes . . . . .	p. 51
5.2. Maturation des ovocytes . . . . .	p. 52
5.2.1. Mode d'action intracellulaire de l'hormone inductrice de la maturation . . . . .	p. 54
5.2.1.1. Rôle de l'ion Ca <sup>++</sup> . . . . .	p. 54
5.2.1.2. Rôle des groupements -SH/-SS- . . . . .	p. 55
5.2.2. Modifications morphologiques au cours de la maturation . . . . .	p. 56
5.2.3. Acquisition de la fertilisabilité . . . . .	p. 58
VI - RESUME . . . . .	p. 60
SUMMARY . . . . .	p. 61
VII - BIBLIOGRAPHIE . . . . .	p. 62

# I - INTRODUCTION

## 1.1. Contrôle hormonal des phénomènes de reproduction

Le cycle gamétogénétique peut être régulé par des facteurs internes (endocrines ou nutritionnels) ou par des facteurs externes (Fig. 1). L'universalité du contrôle endocrine ou neuroendocrine des phénomènes de reproduction a été signalée par de nombreux auteurs (cf. revues par BERLIND (1977), FRONTALI et GAINER (1977), GOLDING (1974) et SCHUETZ (1969)). Le contrôle hormonal de l'ovogenèse par des hormones a été mis en évidence aussi bien chez de nombreux invertébrés (Coelentérés, Némertes, Annélides, Mollusques, Arthropodes et Echinodermes) que chez les Vertébrés. La plupart des études ont porté sur les premiers stades ou le déroulement de la gamétogénèse. Nous nous sommes attachés à l'étude des facteurs agissant sur le stade final de l'ovogenèse, la maturation des ovocytes.

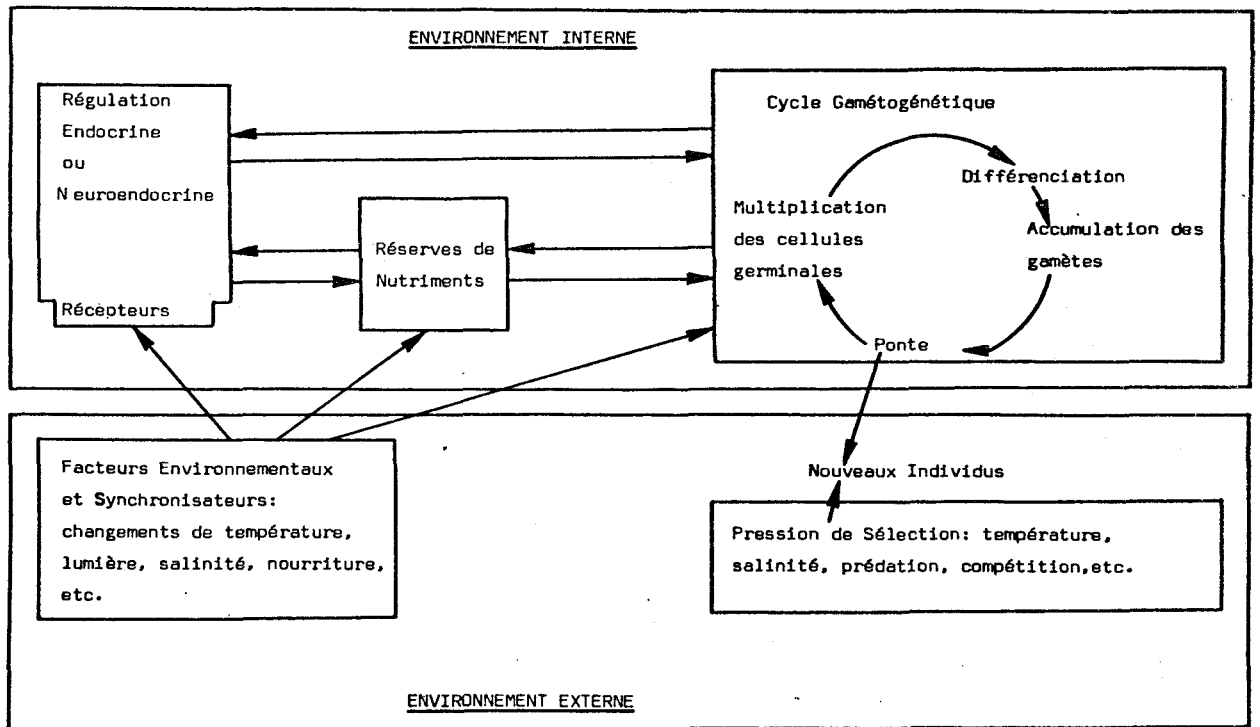
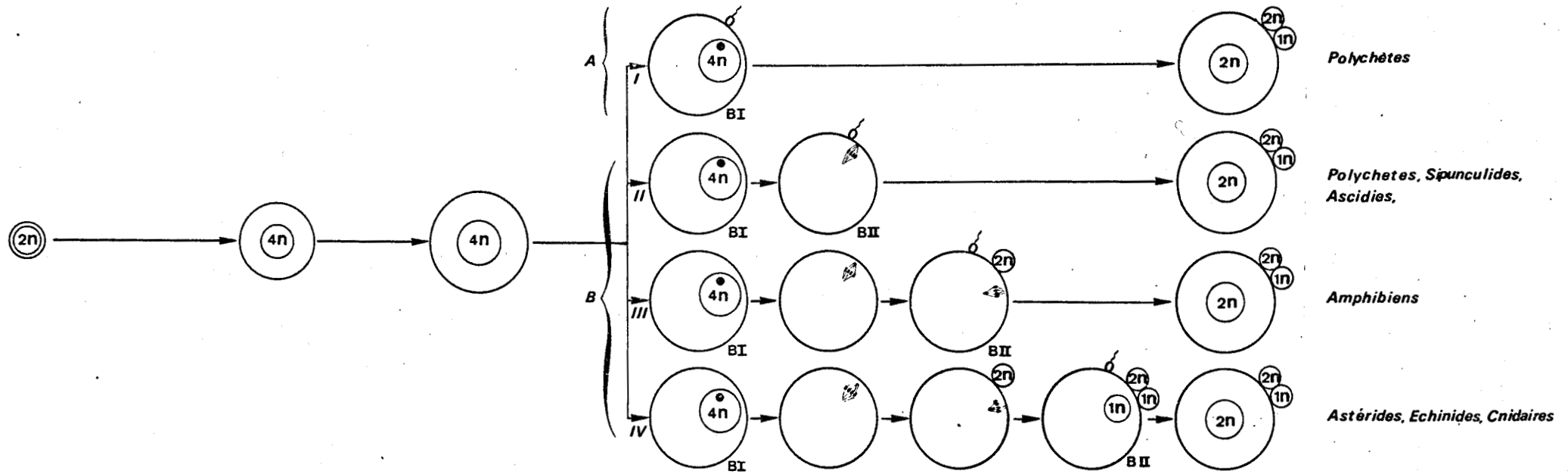


Fig. 1 - Diagramme d'un cycle gamétogénétique et de ses régulations internes et externes (d'après A.C. GIESE et J.S. PEARSE (1974)).



OVOGONIE	OVOCYTE I				OVOCYTE II	OVULE	ZYGOTE
	Leptotène Zygotène	Pachytène	Diplotène — Diacinèse	PROPHASE I	METAPHASE I	METAPHASE II	

Fig. 2 - Diagramme montrant les positions relatives de la maturation ovocytaire et de la fécondation dans le déroulement de l'ovogenèse chez différents groupes animaux.

Groupe A: Blocage I en prophase I; Fécondation en prophase I (I).

Groupe B: Blocage I en prophase I, Blocage II en métaphase I (II), métaphase II (III) ou stade d'ovule (IV); Fécondation au stade bloqué.

BI, blocage I; BII, blocage II; le spermatozoïde indique le stade auquel se fait la fécondation. (d'après BRACHET (1974), GALLIEN (1958), KANATANI (1973) et SCHUETZ (1974 b)).



## 1.2. Maturation ovocytaire : définition - contrôle hormonal

Au cours de l'ovogénèse l'ovocyte subit les premiers stades de la prophase de méiose (leptotène, zygotène, pachytène) et subit une croissance et une différenciation nucléaire et cytoplasmique qui l'amène à un stade de méiose (en général fin de la première prophase de méiose (stade de la vésicule germinative)) auquel il reste bloqué jusqu'à la période de ponte (Fig. 2, Blocage I).

Chez certaines espèces l'ovocyte en prophase I peut être fécondé tel quel (Fig. 2, Groupe A) et la fécondation suffit à déclencher la réinitiation de la méiose (maturation ovocytaire) (I).

Chez d'autres espèces, au contraire, l'ovocyte en prophase I doit d'abord subir une "prématuration" (Fig. 2, Groupe B) qui l'amène soit à un stade intermédiaire de la méiose (métaphase I (II) ou métaphase II (III), soit au stade d'ovule haploïde (émission des deux globules polaires)(IV), stade auquel il reste bloqué jusqu'à la fécondation (Blocage II). Dans ces cas la réinitiation de la méiose provient soit de l'action d'une hormone spécifique soit de la simple libération des ovocytes dans le milieu extérieur (par levée d'une inhibition interne, action d'une protéase spécifique ou réaction directe avec le milieu extérieur). La fécondation provoque une seconde réinitiation méiotique chez les ovocytes bloqués à un stade intermédiaire de la méiose (II, III).

Le contrôle hormonal de la maturation ovocytaire n'a été établi que chez les Echinodermes (KANATANI (1973)), les poissons (SUNDARARAJ et GOSWAMI (1970), les Amphibiens (BRACHET (1974)) et les Mammifères (LINDNER et al. (1977)). Il nous a semblé intéressant d'aborder l'étude de ce problème chez deux invertébrés, Arenicola marina (Annélide Polychète) et Aplysia punctata (Mollusque Gastéropode), chez lesquels les présomptions de l'existence d'un tel système de contrôle hormonal de la maturation ovocytaire étaient grandes.

## 1.3. Modèles étudiés : Arenicola marina et Aplysia punctata

### 1.3.1. Arenicola marina

Chez l'arénicole, les ovocytes, libres dans la cavité coelomique, sont bloqués au stade de la première prophase de méiose. Seuls les ovocytes ayant subi la maturation ovocytaire et ayant atteint le stade de la première métaphase de méiose (auquel ils sont à nouveau bloqués jusqu'à la fécondation) sont susceptibles d'être pondus. Ces ovocytes appartiennent donc au groupe II. Un changement dans la nature des ovocytes, associé à la maturation, est suffisant pour qu'ils soient captés par les néphromixies et pondus. Ponte et maturation sont donc étroitement liées, la réinitiation de la méiose étant suffisante pour que la ponte se déclenche.

Les expériences de HOWIE (1961-1966) ont montré que les femelles décérébrées, maintenues pendant la période de reproduction, ne pondent pas alors que les femelles non décérébrées (témoins) émettent leurs ovocytes. La maturation et la ponte des ovocytes peuvent être restaurées chez les individus décérébrés par l'administration d'extraits de prostomiums. Il semble que la partie postérieure du cerveau contienne une substance (neurohormone ?) capable de stimuler ces processus chez l'arénicole. Cette substance semble exister chez la femelle comme chez le mâle mais n'est présente que pendant la courte période de reproduction.

L'analogie du contrôle de la maturation et de la ponte des gamètes qui existe entre l'arénicole et les Astérides (Echinodermes) a été soulignée par DURCHON (1972). Il nous a donc semblé intéressant d'essayer d'étudier in vitro le système hormonal découvert par HOWIE chez l'arénicole.

### 1.3.2. Aplysia punctata

Chez l'aplysie, l'ovogenèse se déroule en même temps que la spermatogenèse dans l'ovotestis ; elle est très étendue dans le temps : les ovocytes de taille maximale voisinent tous les autres stades de l'ovogenèse. Tout au long de leur séjour dans l'ovotestis les ovocytes sont bloqués en prophase I. Au moment de la ponte ils commencent leur maturation et passent par le gonoducte vers la "chambre de fécondation", où ils sont fécondés par les spermatozoïdes provenant du réceptacle séminal (allosperme), puis vers les glandes annexes où ils sont empaquetés dans un cordon de ponte qui est émis à l'extérieur. La maturation semble commencer avant la fécondation, puisque l'on retrouve des ovocytes en métaphase I dans l'oviducte, avant la fécondation (THOMPSON et BEBBINGTON (1969)).

Depuis la découverte d'une "Egg-Laying Hormone" (E.L.H.), inductrice de la ponte chez l'aplysie, par KUPFERMANN (1967), le système hormonal de contrôle de la ponte a fait l'objet de nombreuses études. Celles-ci ont été résumées par ARCH (1976) ; elles sont principalement axées sur le système neuroendocrine lui-même (biochimie de l'E.L.H., mode de synthèse par les cellules sécrétrices du ganglion viscéral, transport axonal, physiologie de la libération de l'E.L.H., électrophysiologie des cellules neurosécrétrices de l'E.L.H.). Les cellules-cibles de cette hormone n'ont pas été étudiées, à l'exception de l'action de l'E.L.H. sur la contraction des cellules musculaires des follicules et la contractilité générale de la musculature du tractus génital.

Dans tous les groupes étudiés (étoiles de mer, poissons, amphibiens et mammifères), la maturation ovocytaire semble étroitement liée à l'ovulation (à la ponte) ; il nous a donc semblé intéressant d'étudier, in vitro, l'existence possible, et probable, d'un contrôle hormonal de la maturation ovocytaire lié à l'ovulation, chez l'Aplysie.

Récemment H. BERN (1977) a souligné l'intérêt de l'endocrinologie comparée dans l'étude du contrôle de la maturation ovocytaire. L'étude de ces deux invertébrés nous paraît donc bien s'intégrer dans l'endocrinologie de la maturation des ovocytes dans le règne animal.

## II - MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Récolte et élevage des animaux.

Les arénicoles ont été récoltées sur les plages de Calais, Boulogne-sur-mer, Ste Cécile et St Pol-de-Léon (Pempoull) (FRANCE), de Fairlie Sands et Kames Bay (Ecosse, GRANDE BRETAGNE) et de Texel (PAYS-BAS). Aussitôt après la récolte leur sexe est déterminé par examen du liquide coelomique obtenu par ponction; les individus de chaque sexe sont regroupés et maintenus soit dans des aquariums à eau de mer courante (Wimereux, Roscoff, Millport) soit dans des bacs d'eau de mer fréquemment renouvelée (Lille).

L'étude de l'arénicole a posé trois problèmes techniques majeurs: la période de ponte (durant laquelle la maturation peut être induite in vitro par des extraits de ganglions) est très courte (1-2 mois (Novembre-Décembre) au maximum). La récolte des arénicoles adultes qui, dans le nord de la France, ne peut se faire qu'en période de vives-eaux, dépend fortement des conditions atmosphériques. Enfin, chez certaines populations (Bretagne, Ecosse, Pays-Bas) la maturation ovocytaire ne semble pas pouvoir être déclenchée in vitro (même au cours de la période de ponte). Ces différentes populations pourraient avoir un système physiologique de contrôle de la maturation ovocytaire différent de celui des populations du nord de la France, ce qui nous semble peu probable; peut-être s'agit-il de "races physiologiques" qui ne différeraient que par la durée de réceptivité de l'ovocyte ou de stockage de l'hormone (très courte, probablement quelques heures avant la ponte, chez les animaux de Roscoff ou de Millport, plus longue (quelques semaines) chez les animaux du nord de la France). Cet isolement "physiologique" pourrait être favorisé par le peu de relations entre les diverses populations d'arénicoles (fécondation et développement sédentaires); signalons que ce problème de "races physiologiques" a été rencontré par TOULMOND (Communication personnelle) (physiologie de la respiration); Selon BRENNING (1965) le comportement de ponte de l'arénicole varie d'un endroit à l'autre. Une différenciation génétique pourrait, partiellement expliquer les différences dans la reproduction et d'autres caractères de l'arénicole; l'existence de races a été suggérée (DUNCAN (1959, 1960)). Chez Arenicola marina les petites populations localisées présentent un certain degré de différenciation génétique ou adaptative (WELLS (1957, 1963)). D'autres différences entre animaux de Roscoff et animaux du nord de la France ont été observées (production de mucus et d'un pigment jaune, aspect des ovocytes, comportement de "nage"). D'autre part il se pourrait que dans le nord de la France les stimulus qui déclenchent la synthèse de l'hormone et qui rendent l'ovocyte capable de subir la maturation soient très séparés dans le temps du stimulus qui déclenche la libération de l'hormone

(et donc la ponte). Si tous ces stimulus sont très proches dans le temps il devient difficile de déclencher la maturation (à partir de cerveaux et d'ovocytes compétents) pendant une longue période.

Les Aplysies, vivant normalement à l'étage infralittoral, remontent, au moment de la période de ponte (Mars-Juillet), à la limite des étages infra- et mediolittoraux. Les animaux ont été récoltés aux basses mers de vives-eaux dans les herbiers à Zostères de Pempoull et de l'île Callot (Baie de Morlaix, FRANCE). L'élevage pose certains problèmes, les animaux s'accouplant et pondant rapidement après la récolte; les individus isolés pondent également au bout de quelques jours.

## 2.2. Histologie

### 2.2.1. Microscopie Photonique (M.P.)

#### 2.2.1.1. Observations de cellules sur le vivant.

Entre lame et lamelle les ovocytes d'arénicole s'aplatissent et la distinction entre ovocyte en prophase et ovocyte en métaphase peut être faite aisément. L'observation des globules polaires de l'ovocyte d'aplysie est facilitée par l'emploi du microscope à contraste de phase. Les spermatozoïdes d'arénicole sont observés au microscope à contraste de phase.

#### 2.2.1.2. Colorations histologiques.

Les ovocytes d'arénicole ont été fixés au Bouin alcoolique ou au formol salé; cette fixation est suivie d'une déshydratation par l'éthanol, d'un passage par l'alcool butylique et d'une inclusion à la paraffine; les coupes ( $6\mu$  d'épaisseur) ont été colorées selon neuf techniques: Hémalun-picro-indigo-carmin, Azan, Bleu alcian, Bleu de toluidine, Feulgen, P.A.S., Mann-Dominici, Trichrome à l'azofuchsine, de Brookes et Vert solide. Le montage se fait dans une résine synthétique (Terpen Resin). Des coupes semi-fines d'ovocytes préparés pour la microscopie électronique à transmission (voir 2.2.2.) ont été réalisées sur l'ultramicrotome PORTER-BLUM et colorées par le Bleu Azur puis montées dans l'araldite entre lame et lamelle.

### 2.2.2. Microscopie Electronique à Transmission (M.E.T.)

La fixation au glutaraldéhyde 2,5% - Chlorure de sodium 2,5% - tampon phosphate 0,4 M (3:15:6) est suivie d'un rinçage au tampon phosphate 0,4 M - sucrose 0,33 M (1:3) puis d'une post-fixation au tétroxyde d'osmium 2% - tampon phosphate 0,4 M - Chlorure de sodium 2,5% (5:3:2); après déshydratation par l'éthanol et passage par l'oxyde de propylène, l'inclusion se fait dans l'araldite. Les coupes effectuées sur l'ultramicrotome PORTER-BLUM sont colorées à l'acétate d'uranyle suivi du citrate de plomb. D'autres fixations (Glutaraldéhyde en tampon cacodylate pH 7,4; présence d' $H_2O_2$ ; Tétroxyde d'osmium en solution dans l'eau de mer;  $KMnO_4$  en tampon cacodylate; paraformal-

déhyde; emploi de sucrose 1 M) n'ont pas donné de meilleurs résultats. L'observation des coupes se fait sur le microscope Siemens Elmiskop 1 A.

### 2.2.3. Microscopie Electronique à Balayage (M.E.B.)

La fixation est identique à celle utilisée pour la microscopie électronique à transmission. Après un rinçage au tampon phosphate 0,4 M - Sucrose 0,33 M (1:3), puis à l'eau distillée, les pièces sont déshydratées par lyophilisation, par l'acétone ou par la méthode du point critique (déshydratation par l'alcool, passage par le CO<sub>2</sub> liquide). Cette dernière méthode s'est avérée très supérieure aux deux premières. Les échantillons recouverts d'une couche d'or-palladium (1:1) ont été observés sur un microscope Stereoscan (Cambridge).

## 2.3. Expérimentation

### 2.3.1. Préparation d'extraits du système nerveux

Les arénicoles ont été anesthésiées par immersion dans une solution de chlorure de magnésium à 7,77% dans l'eau distillée pendant trente minutes environ; le système nerveux (prostomium, proéminent chez l'animal anesthésié) disséqué est homogénéisé à 4°C dans un volume d'eau de mer à l'aide d'un homogénéiseur de Potter. L'homogénat est ensuite centrifugé (Wimereux: MSE Minor, 5 minutes, température ambiante, vitesse 5; Millport: MSE High Speed 18, 10 minutes, 4°C, 6000 tours/min.). Le surnageant est recueilli et conservé à -20 °C jusqu'à l'essai biologique. La concentration de l'extrait est exprimée en nombre de prostomiums par volume d'eau de mer d'homogénéisation. L'extraction par un solvant organique (diéthyl ether, chloroforme) a été faite à partir de l'extrait précédent; la phase organique, après évaporation du solvant, est reprise par de l'eau de mer filtrée.

L'aplysie est anesthésiée par immersion dans une solution de Mg Cl<sub>2</sub> à 7,77 % dans l'eau distillée, puis disséquée par la face dorsale. Le ganglion viscéral, bien visible, est sectionné au niveau des connectifs et l'homogénéisation est faite dans de l'eau de mer à l'aide d'un homogénéiseur de Potter. Après centrifugation le surnageant est recueilli et servira aux essais biologiques. La concentration de l'extrait est exprimée en nombre de ganglions viscéraux par volume d'eau de mer d'homogénéisation.

### 2.3.2. Essais biologiques

Pour l'arénicole les ovocytes sont obtenus par recueil du liquide coelomique (qui contient les gamètes) après incision du corps ou par ponction; après précipitation on obtient une "solution" concentrée d'ovocytes; ces derniers (0,1 ml) sont incubés dans un verre de montre soit avec de l'eau de mer filtrée (1 ml) (témoin) soit avec un volume identique d'extrait de système nerveux (essai). Le pourcentage d'ovocytes dont la vésicule germinative s'est

rompue (% rupture de la vésicule germinative, % RVG) est déterminé sur des photos de la population ovocytaire faites après 0, 2 et 4 heures d'incubation.

Pour les mâles une goutte de liquide coelomique contenant des spermatozoïdes en plaquettes est incubée avec 0,25 ml d'extrait de système nerveux ou d'eau de mer filtrée. L'examen se fait après 0 et 4 heures d'incubation. L'estimation quantitative de la désagrégation des plaquettes de spermatozoïdes a été faite de trois façons: échelle arbitraire, absorbance de la solution de spermatozoïdes ou détermination des proportions respectives de plaquettes de spermatozoïdes et d'agrégats de spermatocytes (non affectés, semble-t-il, par les extraits de système nerveux). Cette dernière méthode s'est avérée la plus précise. D'autres méthodes d'obtention de spermatozoïdes libres et mobiles ont été testées (MEIJER (1976)).

Pour l'aplysie le bio-essai initial a été mis au point sur des fragments d'ovotestis isolés et incubés soit dans de l'eau de mer (témoins) soit dans un extrait de ganglion viscéral (essai). Diverses méthodes ont été essayées pour obtenir des ovocytes isolés de taille maximale: traitement par la trypsine (1 mg/ml EDM), collagénase (1 mg/ml), avec ou sans agitation, ou dilacération mécanique (cette dernière technique semblant être la plus efficace). Après filtration sur gaze (qui retient les débris de gonades et les spermatozoïdes) et lavages répétés par de l'eau de mer on obtient une population homogène d'ovocytes isolés et qui restent en prophase (Pl. XVII, Fig. 1).

### 2.3.3. Isolement de noyaux et de chorions d'ovocytes d'arénicole

Nous avons essayé, sans succès, de préparer des vésicules germinatives isolées par plusieurs méthodes (THALER et al. (1969), KIRSCHNER et CHAMBERS (1970), méthode à la glycine). En effet le chorion semble très résistant et beaucoup plus que l'enveloppe nucléaire. Il résiste à la pronase 1%, la trypsine 1%, l'hyaluronidase 1%, l' $\alpha$ -amylase 1%, l'eau de javel 1%. La Glycine 1 M ramollit le chorion mais ne le détruit pas. La résistance mécanique du chorion est également confirmée lors des tentatives d'électrophysiologie de l'ovocyte. En effet les microélectrodes en verre se brisent avant de pouvoir percer le chorion. La technique suivante d'isolement des chorions a été mise au point:

- 1 ml d'ovocytes centrifugés

- 10 ml | Sucrose 1 M  
          | MgCl<sub>2</sub> 2 mM  
          | Triton X-100 2% (P/V)

pendant 10 minutes

- homogénéisation (4 coups de piston en Teflon)

- centrifugation: 3000 T/min. pendant 3 min.

- culot: lavages répétés par MgCl<sub>2</sub> 0,1 M

Comme on l'observe en microscopie photonique (Pl. IV, Fig. 5) et en microscopie

électronique à transmission (pl. IV, Fig. 6) on obtient une fraction relativement propre de chorions. Les membranes plasmiques ont été, du moins partiellement, dissoutes par le triton X-100.

2.3.4. Etude de la libération de calcium par une fraction subcellulaire d'ovocytes d'arénicole (DOREE, MOREAU et GUERRIER, sous presse)

Des ovocytes conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  ont été décongelés et lavés par du tampon NaCl 0,53 M - Tris Maleate 0,05 M pH 8,2 (passé sur une colonne de Chelex 100) puis homogénéisés dans ce milieu. Après centrifugation le culot est rincé dans le tampon et mis en suspension dans du Triton X-100 à 0,02% dans le même tampon, puis centrifugé; le surnageant, riche en membranes, est recueilli.

Cinq prostomiums ont été homogénéisés dans 1 ml de tampon NaCl 0,53 M - Tris maleate 0,05 M pH 8,2 (passé sur colonne de Chelex 100); après centrifugation le surnageant est passé sur une colonne de Chelex 100; les 10 premières fractions de 3ml sont retenues.

L'aequorine (Sigma) est préalablement purifiée par chromatographie sur une petite colonne de Sephadex G 25 équilibrée avec de l'EDTA 2 M - Acétate de Na 10 mM pH 6,8.

Pour le dosage du calcium la solution d'aequorine ( $50\mu\text{l}$ ) est mise avec la fraction subcellulaire ( $400\mu\text{l}$ ) dans un récipient en plastique transparent monté directement sur un photomultiplicateur contenu dans un boîtier à l'abri de la lumière; les effecteurs (extrait de prostomium, drogues) ( $50\mu\text{l}$ ) sont ajoutés par une pipette Eppendorf dans le récipient contenant l'aequorine et la fraction subcellulaire. Le flash lumineux correspondant à la stimulation de l'aequorine par le calcium ionique libéré par la fraction subcellulaire est capté par le photomultiplicateur et transformé en un signal amplifié que l'on recueille sur oscilloscope.



### III - ARENICOLA MARINA: RESULTATS

#### 3.1. Système hormonal.

##### 3.1.1. Mise en évidence de l'existence d'un système hormonal

Les ovocytes d'arénicole restent bloqués en prophase pendant plusieurs mois dans le liquide coelomique; la maturation ovocytaire a lieu dans le coelome et seuls les ovocytes ayant subi la maturation sont acceptés par les néphridies et émis dans le milieu extérieur, comme le montrent les coupes de néphridies remplies d'ovocytes en métaphase chez les animaux en cours de ponte ; les ovocytes pondus ont tous subi la maturation. Ceci est en faveur d'un déclenchement d'origine interne (ou externe par l'intermédiaire d'un "relais" interne) de la maturation ovocytaire in vivo.

Les ovocytes obtenus par ponction montrent une vésicule germinative bien visible ; la population d'ovocytes est très homogène (taille des ovocytes ; rapport diamètre du noyau sur diamètre de l'ovocyte).

Incubés dans de l'eau de mer filtrée ils restent à ce stade de prophase I (Pl. I, fig. 1, 3, 5).

Incubés avec un extrait de prostomium les ovocytes voient leur vésicule germinative se rompre (Pl. I, fig. 2, 4). L'histologie (Pl. I, fig. 6) confirme que ces ovocytes ont subi la maturation ovocytaire (réinitiation de la méiose), visualisée par la rupture de la vésicule germinative (RVG) et que, du stade de prophase I (Pl. I, fig. 5), ils sont passés au stade de métaphase I (Pl. I, fig. 6).

Le prostomium semble donc renfermer une "substance réinitiatrice de la méiose" (SRM) capable d'agir, in vitro, sur les ovocytes d'Arenicola marina. Le phénomène décrit in vitro semble similaire à la maturation qui se déroule in vivo.

##### 3.1.2. Propriétés générales de l'hormone

###### 3.1.2.1. Origine de la SRM

.....  
Les essais d'extraits de prostomium et de chaînes nerveuses montrent que l'activité de réinitiation de la méiose semble localisée au niveau du prostomium (Tabl. 1)

Il ne semble pas exister de spécificité sexuelle ; les prostomiums des individus mâles ont les mêmes propriétés que ceux des femelles ; l'action des extraits se fait aux mêmes concentrations et dans des délais identiques.

Incubation	Temps (Heures)	0	1	5
	EDM		0	0
3 chaînes nerv./ml		-	0	0
0,5 prostomium/ml		-	100	100

Tableau 1 - Arenicola marina : % de rupture de la vésicule germinative (RVG) après 0, 1 et 5 heures d'incubation en présence d'eau de mer (EDM), d'extrait de chaînes nerveuses ou d'extrait de prostomiums.

### 3.1.2.2. Propriétés physico-chimiques

#### 1. Résistance thermique

D'après des essais préliminaires (MEIJER, 1976), la SRM semble être une substance stable à la chaleur ; l'activité peut, d'autre part, être conservée après congélation des extraits à -20°C et de nombreuses congélations et décongélations. L'extrait maintenu pendant plusieurs heures à température ambiante (15-20°C) et pendant deux ans à -20°C conserve son activité.

#### 2. Extraction par le chloroforme et l'éther

La SRM reste dans la phase aqueuse après extraction à l'éther (Tabl. 2) ; une partie de l'activité de réinitiation de la méïose passe dans la phase chloroformée (probablement par l'intermédiaire de l'eau restant dans le chloroforme).

Incubation	Temps (Heures)	0	1	5
	<b>I. Extraction par l'éther</b>			
Eau de mer		0	0	0
Phase aqueuse		-	100	100
Phase étherée		-	0	0
0,5 prostomium/ml		-	100	100
<b>II. Extraction par le chloroforme</b>				
Eau de mer		0	0	0
Phase aqueuse		-	100	100
Phase étherée		-	2,2	16,5
0,5 prostomium/ml		-	100	100

Tableau 2 - Arenicola marina : % de RVG après 0, 1 et 5 heures d'incubation en présence d'eau de mer, d'extrait de prostomium, de phase aqueuse ou de phase organique après extraction par l'éther ou le chloroforme.

Des extraits lyophilisés ont été extraits par différents solvants (eau distillée, éthanol 100°, éthanol 80°, acétone 100°, acétone 80°, chloroforme, éther, benzène, eau de mer). Des extraits ont été traités par la pronase, la trypsine ou la pepsine (inactivation par chauffage à 100°C) ou la trypsine (inactivation par le "Soy Bean Trypsin Inhibitor" (SBTI)). Des fractions dialysables et adialysables ont été préparées; enfin des extraits concentrés ont été filtrés sur colonne de gel Sephadex G 25 et G 50 (équilibrées soit à l'eau distillée, soit à l'eau de mer). Malheureusement ces extraits n'ont pas encore pu être testés par manque d'ovocytes matures.

### 3.1.3. Propriétés du mode d'action de la SRM

#### 3.1.3.1. Cinétique

Une étude cinétique de la RVG après addition de la SRM a été réalisée. Elle montre que la population ovocytaire se comporte de façon très homogène (les ovocytes répondent tous, à 5 minutes près, dans le même temps). D'autre part le moment de la RVG se situe environ 30 minutes après le début de l'incubation en présence d'extrait de prostomium (Fig. 3). Le moment de

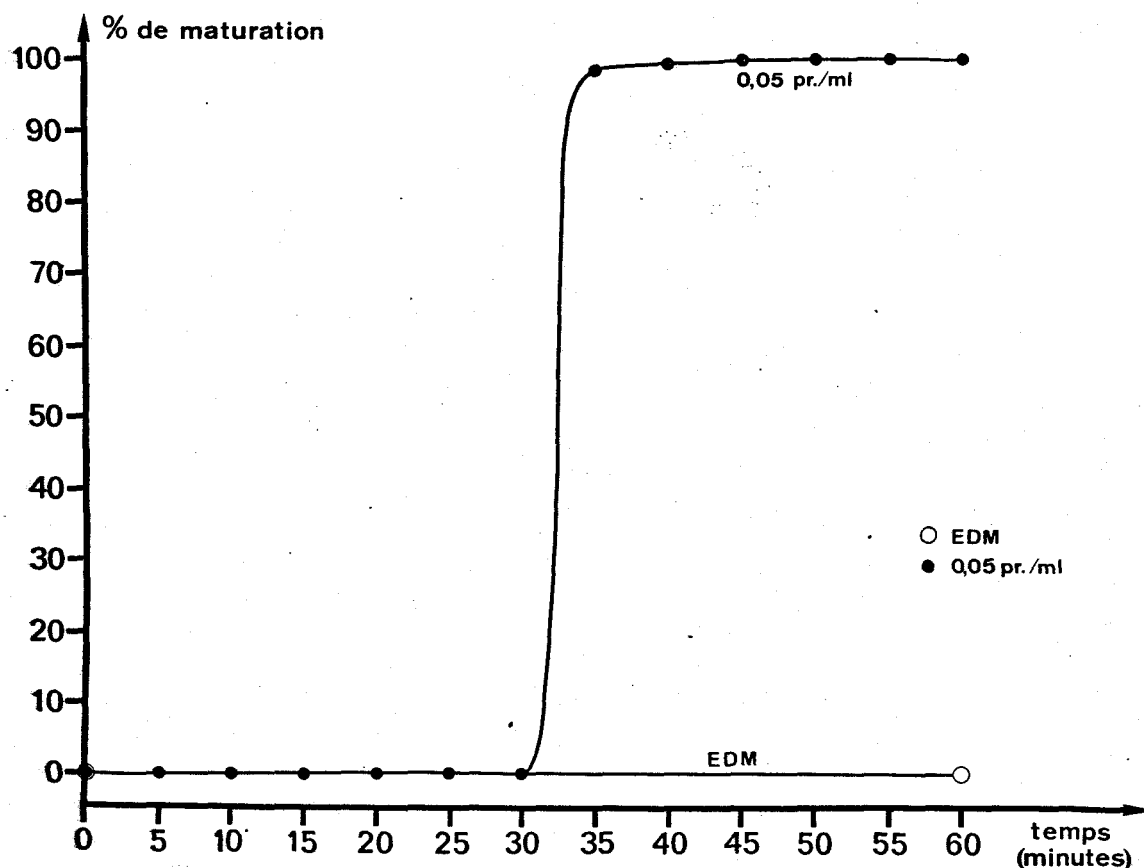


Figure 3 - Arenicola marina. Expérience type montrant le % de RVG en fonction du temps d'incubation en présence d'un extrait de 0,05 prostomium par millilitre (pr./ml) (●) ou d'eau de mer (EDM) (○).

déclenchement de la RVG dépend de la température ; la RVG a lieu d'autant plus rapidement que la température est plus élevée. La cinétique de la RVG dépend également de la concentration de l'extrait de prostomium. A des concentrations inférieures à 0,1000 pr./ml le % maximal de RVG est atteint au bout d'un temps d'autant plus long que l'extrait est moins concentré (Fig. 4).

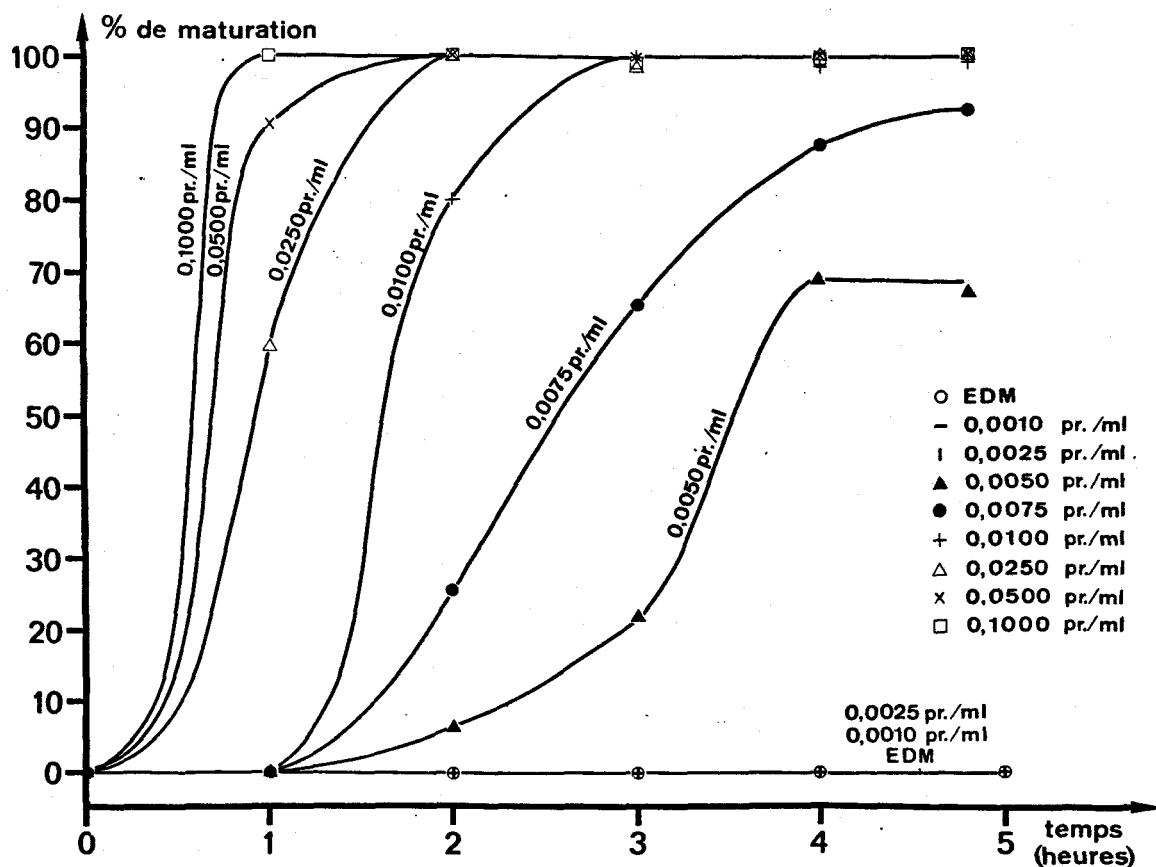


Figure 4 - *Arenicola marina*. % de maturation ovocytaire en fonction du temps et de la concentration en extrait de prostomium (pr./ml) ; EDM, eau de mer.

### 3.1.3.2. Courbe dose-réponse

Une courbe dose-réponse a été établie (Fig. 5) ; elle montre que la concentration active minimale se situe entre 0,0050 et 0,0025 prostomium/ml ; au delà de cette concentration la réponse est identique et maximale quelle que soit la concentration.

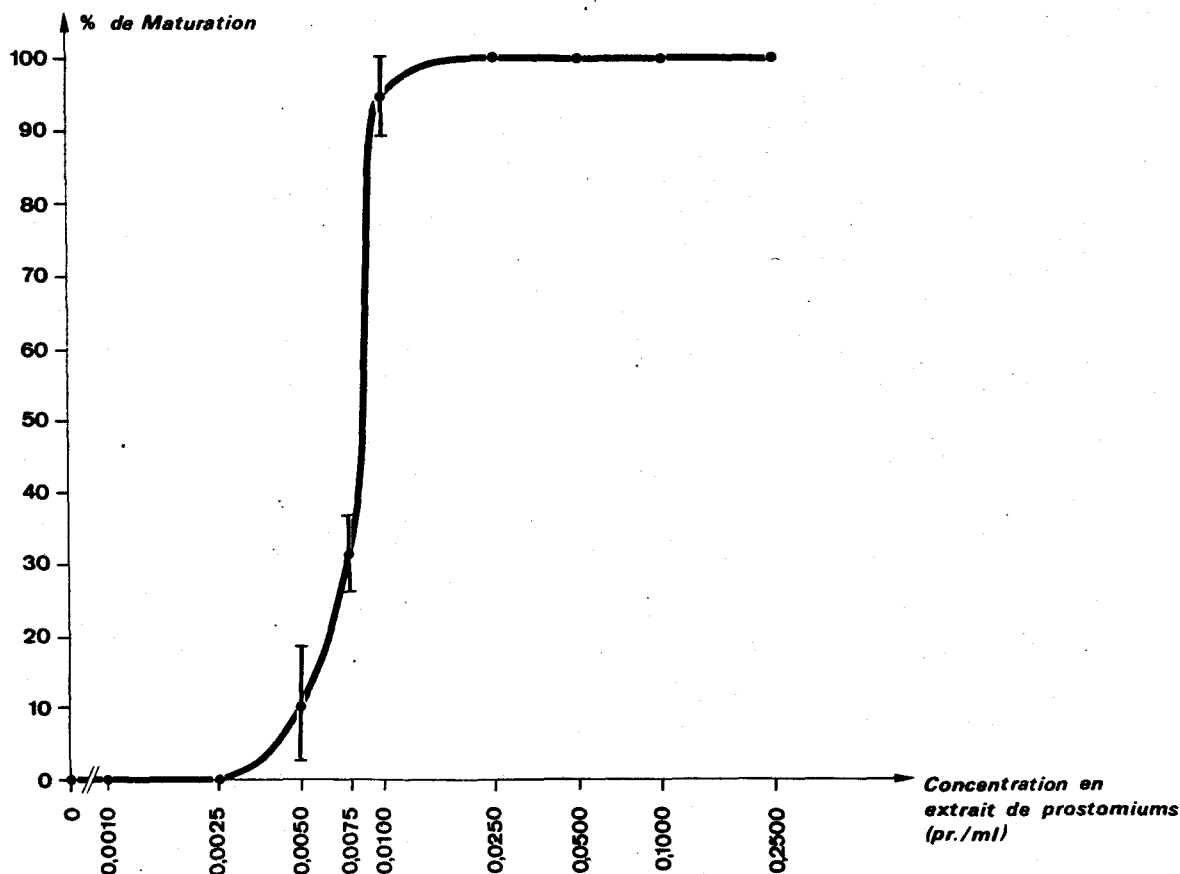


Figure 5 - Arenicola marina : Courbe dose-réponse : % de RVG en fonction de la concentration de l'extrait de prostomium. Moyenne  $\pm$  E.S. de 4 expériences.

### 3.1.4. Autres essais

3.1.4.1. Un extrait de prostomium a été réalisé à partir de prostomiums lyophilisés de femelles d'Arenicola cristata (obtenu par l'obligeance du Prof. D'ASARO et de C. WHITE, University of West Florida, Pensacola, Florida, U.S.A.) et testé sur des ovocytes d'Arenicola marina. Cet extrait présente une activité de réinitiation de la méiose identique à celle des extraits de prostomiums d'Arenicola marina (Tabl. 3)

3.1.4.2. La 1-Méthyladénine, "Maturation Inducing Substance" (MIS) des étoiles de mer (Echinodermes) semble inactive sur les ovocytes d'arénicole, du moins dans la gamme de concentrations utilisées ( $4 \cdot 10^{-7}$  à  $4 \cdot 10^{-5}$  M).

Temps (Heures)	I		II		III	
	0	2	0	2	0	2
Incubation						
EDM		0		0		0
0,05 p. <u>A. marina</u> /ml		100		97,8		88,5
0,01 p. <u>A. cristata</u> /ml		4,1		0		7,2
0,05 p. <u>A. cristata</u> /ml		98,8		96,6		79,6
0,10 p. <u>A. cristata</u> /ml		99,0		97,8		88,9
0,50 p. <u>A. cristata</u> /ml		97,5		98,8		84,9
1,00 p. <u>A. cristata</u> /ml		100		97,4		87,3

Tableau 3 - Arenicola marina : % de RVG d'ovocytes d'Arenicola marina après 0 et 2 heures d'incubation en présence d'EDM, d'extrait de prostomium d'A. marina ou d'A. cristata.

3.1.4.3. La présence de plaquettes de spermatozoïdes ou de spermatozoïdes libres et mobiles ne provoque ni réinitiation de la méiose chez les ovocytes, ni activation.

3.1.4.4. Un lavage répété des ovocytes par de l'eau de mer filtrée (afin d'éliminer le liquide coelomique et les coelomocytes) ne provoque pas de modifications dans la maturation induite par les extraits de prostomiums.

3.1.4.5. La chlorure de Magnésium (employé comme anesthésique au cours de la préparation des extraits) ne présente pas d'activité de réinitiation méiotique.

### 3.2. Changements morphologiques induits par la SRM

#### 3.2.1. Description de l'ovocyte en prophase

##### 3.2.1.1. Microscopie photonique

Bien avant la période de ponte les ovocytes quittent les ovaires et continuent leur développement dans la cavité coelomique ; ce dernier semble assez synchrone. La distribution des diamètres des ovocytes est extrêmement homogène ; tous les ovocytes sont au même stade morphologique (dimensions) et physiologique (possibilité de répondre aux extraits de prostomiums).

Au moment de la période de ponte leur diamètre est d'environ 180  $\mu$ . Ils sont dépourvus de cellules folliculaires. Ils présentent une forme lenticulaire (deux faces convexes) et une des deux faces convexes présente une dépression (cf. 3.2.1.3.). Leurs inclusions cytoplasmiques confèrent aux ovocytes une couleur brun-foncé qui masque presque totalement le noyau (vésicule germinative).

Entre lame et lamelle, l'ovocyte s'aplatit légèrement, laissant apparaître la vésicule germinative très claire et bien délimitée (Pl. I, fig. 3). Le cytoplasme, bourré d'inclusions, est limité par une membrane, elle-même entourée par un chorion ("Membrane vitelline"), peu réfringent et plaqué contre la membrane plasmique et qui semble assez résistant (2.3.3.).

L'étude des coupes histologiques (MEIJER, (1976)) montre que l'ovocyte est entouré par un chorion (P.A.S.-positif) et coloré en bleu par le Bleu Alcian (présence de groupements glucidiques). Cette enveloppe, assez résistante, se détache facilement de l'ovocyte lors de la préparation des coupes. Le cytoplasme est coloré en rouge par le P.A.S., en bleu clair par le Bleu de Toluidine (basophilie due aux acides nucléiques ?). Les inclusions sont nombreuses mais mal définies. Le noyau, bien visible, présente un nucléoplasme très peu basophile (coloration très pâle au Bleu de Toluidine) ; la chromatine n'est pas visible, la réaction de Feulgen est négative. Par contre le nucléole est intensément coloré (bleu foncé par le Bleu de Toluidine) indiquant une forte concentration en acides nucléiques. Ce nucléole, dont la structure en amphinucléole est parfois visible, est souvent accompagné de micronucléoles. Ces caractéristiques du noyau laissent à penser que l'ovocyte se trouve au stade diplotène ("dictyate stage of diplonema") de la première prophase de méiose (LUYKX, (1974); RHOADES, (1961)).

L'étude des coupes semi-fines, colorées au Bleu Azur, permet de mieux distinguer les différentes inclusions cytoplasmiques: alvéoles corticaux (répartis en une couche régulière sous la membrane plasmique), lipides (clairs) et granules de vitellus (plus foncés); la membrane plasmique envoie de très nombreuses microvillosités à travers le chorion.

#### 3.2.1.2. Microscopie Electronique à Transmission

L'ovocyte en prophase présente un chorion d'environ 2  $\mu$  d'épaisseur traversé par de nombreuses microvillosités (de diamètre: 0,1 - 0,2  $\mu$ ; densité: environ 230/ 100  $\mu^2$  de chorion) formées par un repli de la membrane plasmique (Pl. IV, fig. 1, 2). Le chorion, de structure fibrillaire, peu dense aux électrons, présente deux sous-couches chez les ovocytes peu de temps avant la période de ponte. Les microvillosités, parfois ramifiées, dépassent du chorion sur une longueur de 0,5  $\mu$ ; un léger espace (artefact?) sépare la

base du chorion de la membrane plasmique sous-jacente. En dehors des points de départ des microvillosités la membrane plasmique ne suit pas le chorion de façon très parallèle mais présente de nombreuses ondulations irrégulières (v. fig. 6). Cette membrane se caractérise par ses microvillosités et également par de rares invaginations, de petite taille, aux contours denses aux électrons, qui correspondent probablement à une activité de pinocytose.

Le cytoplasme renferme des particules de glycogène (mis en évidence par la méthode de THIERY (1967)) et des ribosomes libres.

Le cytoplasme contient également des gouttelettes lipidiques plus ou moins arrondies ( $2\mu$  de diamètre) et de densité électronique assez faible (Pl. V, fig. 1). Ces gouttelettes sont parfois associées à un empilement de vésicules aplaties de reticulum endoplasmique (Pl. V, fig. 4); elles sont réparties de façon uniforme dans tout le cytoplasme à une densité d'environ  $40/\mu^2$ .

Deux types de granules ont été observés:

1) les alvéoles corticaux (Pl. V, fig. 1), de forme elliptique ( $1-1,5\mu$  de longueur;  $0,1-0,5\mu$  de largeur); bordés d'une membrane, ils ont un contenu homogène dense aux électrons; il est parfois difficile de les distinguer de certains granules de vitellus; ils se situent sous la membrane plasmique, disposés en une couche bien nette (parfois en empilements de quelques granules), à une concentration d'environ 30 par  $10\mu$  de longueur de membrane plasmique et sur une profondeur de  $10\mu$ . Ils semblent être plus nombreux sur les bords de l'ovocyte.

2) les grains de vitellus, plus arrondis et plus denses en général, et de taille assez variable ( $0,5-1,5\mu$  de diamètre), au contenu homogène bordé par une membrane; ils sont répartis de façon régulière dans tout le cytoplasme (Pl. V, fig. 1) à une concentration d'environ  $44/\mu^2$ .

Les mitochondries, souvent allongées ou elliptiques, sont assez peu nombreuses. Elles sont soit isolées dans le cytoplasme soit, parfois, regroupées en agrégats de plusieurs dizaines de mitochondries (Pl. V, fig. 3). Leur matrice est assez claire et leurs crêtes sont bien développées.

On trouve de nombreux dictyosomes (Pl. V, fig. 2, 5) principalement localisés à proximité de la membrane plasmique; leur saccules sont minces et aplatis.

Le réticulum endoplasmique est limité à quelques saccules isolés et à de rares empilements associés aux gouttelettes lipidiques (Pl. V, fig. 4). Seuls les ovocytes de taille sub-maximale semblent présenter des lamelles annelées.

De contour irrégulier (Pl. VII, fig. 1), la vésicule germinative est limitée par une enveloppe nucléaire présentant de très nombreux pores nucléaires (diamètre  $550-750\text{ \AA}$ ) aux bords denses (Pl. VII, fig. 2, 3). La vésicule germinative a une forme similaire à celle de l'ovocyte qui la contient; elle se



située sous la dépression de l'ovocyte (Pl. VII, fig. 1). Le nucléoplasme est assez homogène; la chromatine y est extrêmement diffuse et totalement décondensée, à l'exception, peut-être, de quelques masses plus denses qui ressemblent à des chromosomes lampbrush (qui, s'ils existent, sont probablement de très petite taille et ne semblent pas pouvoir être préparés facilement par la méthode de GALL (1966) (CALLAN, communication personnelle)). Le nucléole (environ  $10\mu$ ) est souvent un amphinucléole comportant plusieurs parties de densités différentes: une partie périphérique dense qui s'élargit en forme de calotte à une extrémité du nucléole; une zone centrale plus claire, divisée en plusieurs zones de densité et d'homogénéité différentes (Pl. IX, fig. 1, 2).

### 3.2.1.3. Microscopie Electronique à Balayage

A faible grossissement le microscope électronique à balayage permet de rendre compte de la forme générale de l'ovocyte (Pl. III, fig. 1), montrant la face convexe et la face creusée d'une dépression. A de plus forts grossissements on constate que la surface de l'ovocyte en prophase est recouverte d'une quantité de protubérances irrégulières, de petite taille (diamètre:  $0,2-0,3\mu$ ) formant un "tapis" uniforme (Pl. III, fig. 3, 5). Ces protubérances semblent correspondre aux extrémités des microvillosités dépassant du chorion.

### 3.2.2. Description de l'ovocyte en métaphase

Au cours de l'incubation des ovocytes, in vitro, en présence d'extrait de prostomiums les ovocytes subissent la maturation qui les fait passer de prophase I en métaphase I.

#### 3.2.2.1. Microscopie photonique

Entre lame et lamelle l'ovocyte en métaphase ne présente plus de vésicule germinative, mais une petite tache claire aux contours mal délimités (Pl. I, fig. 4).

L'histologie (Pl. I, fig. 6) montre que la limite entre nucléoplasme et cytoplasme s'est estompée; la région nucléaire est devenue basophile (coloration bleue par le Bleu Alcian et le Bleu de Toluidine), le nucléole a disparu (après la rupture de la vésicule germinative et l'apparition de la basophilie) et un fuseau de maturation est apparu à la périphérie de l'ovocyte. La chromatine s'est fortement condensée en petits chromosomes Feulgen-positifs, colorés intensément par le Bleu de Toluidine. Les chromosomes (en petit nombre) sont disposés, dans le fuseau, en plaque métaphasique caractéristique. Comme aucun globule polaire n'a été émis, on peut en conclure que les ovocytes se trouvent au stade de la première métaphase de la méiose.

Les coupes semi-fines montrent que les microvillosités ont disparu; la distribution des alvéoles corticaux semble moins régulière; ils sont parfois regroupés en petits amas sous la membrane plasmique. La région nucléaire (mélange nucléoplasme-cytoplasme) prend beaucoup mieux la coloration au Bleu Azur (basophilie).

#### 3.2.2.2. Microscopie Electronique à Transmission

L'ovocyte en métaphase présente plusieurs différences par rapport à l'ovocyte en prophase:

- les microvillosités semblent s'être rétractées, laissant la surface du chorion de l'ovocyte lisse et de nombreux canaux vides à l'intérieur du chorion (Pl. IV, fig. 4). On retrouve quelques microvillosités dans l'espace situé entre la membrane plasmique et le chorion. Signalons que l'incubation des ovocytes dans un extrait de prostomium contenant de la cytochalasine B (5  $\mu$ l d'une solution à 1 mg/ml de DMSO par ml d'une solution à 0,25ml d'ovocytes par ml) n'empêche pas la rupture de la vésicule germinative; en microscopie électronique on constate que la rétraction des microvillosités a été ralentie (elles sont toujours dans le chorion bien qu'elles ne dépassent plus à sa surface). Les ovocytes témoins, incubés dans un extrait de prostomium, avec ou sans DMSO, subissent une rétraction normale des microvillosités.
- la membrane plasmique, en dehors de quelques microvillosités, suit la face interne du chorion de façon beaucoup plus parallèle (Fig. 6).
- Les alvéoles corticaux subissent un léger changement de répartition : d'une part ils disparaissent au-dessus du fuseau méiotique (migration latérale ?) ; d'autre part les alvéoles corticaux des autres régions de l'ovocyte semblent s'éloigner un peu de la membrane plasmique et se regrouper en petits amas au lieu de former la couche homogène de l'ovocyte en prophase. En tous cas le nombre moyen d'alvéoles corticaux ne semble pas diminuer (environ 33/10  $\mu$  de longueur et sur une profondeur de 10  $\mu$ ).
- La vésicule germinative s'est rompue ; l'enveloppe nucléaire a disparu, le nucléole également, le nucléoplasme s'est mêlé au cytoplasme. La chromatine s'est condensée en chromosomes denses aux électrons. Ces chromosomes se sont disposés au centre d'un fuseau de maturation (longueur 20  $\mu$ ) formé de microtubules issus de deux pôles (asters) ; à chaque pôle se situe une paire de centrioles (Pl. X, fig. 2, 3, 4). Le fuseau, orienté perpendiculairement à la membrane plasmique, est situé à sa proximité (au centre de l'ovocyte, du côté de l'ancienne dépression). Les chromosomes forment une "plaque métaphasique" caractéristique. Dans toute la région fusoriale on note la présence de mitochondries et une absence de gouttelettes lipidiques ainsi qu'une raréfaction des grains de vitellus (Pl. X, fig. 3).

### 3.2.2.3. Microscopie Electronique à Balayage

A faible grossissement on constate que l'ovocyte en métaphase a changé de forme : la dépression de l'ovocyte en prophase a disparu. L'ovocyte présente maintenant une face convexe et une face plane (sous laquelle se situe le fuseau méïotique) (Pl. III, fig. 2, 4).

A de plus forts grossissements la surface de l'ovocyte semble beaucoup plus lisse (parfois recouverte de petites sphérules (chorion contracté ?)) laissant entrevoir de nombreuses petites dépressions, correspondant aux orifices par lesquels débouchaient les microvillosités qui se sont rétractées (Pl. III, fig. 6).

### 3.2.3. Etude cinétique des changements morphologiques induits par la SRM

Une étude cinétique des changements morphologiques induits par la SRM a été réalisée par fixation, toutes les 5 minutes pendant 1 heure, d'ovocytes en incubation dans un extrait de prostomium (0,05 p./ml) ; les témoins, incubés dans de l'eau de mer, ont été fixés aux temps 0 et 60 minutes. L'étude a été faite par examen de coupes semi-fines et ultrafines. Cette cinétique concerne des ovocytes ayant subi la RVG après 35 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium (Pl. II, fig. 1-28).

Les microvillosités commencent à se rétracter vers la 35e-40e minute ; elles sont toujours dans le chorion mais ne dépassent plus à sa surface ; à la 50e minute la rétraction est plus avancée et elle semble achevée à la 60e minute (Pl. IV, fig. 3). La membrane plasmique devient parallèle au chorion vers la 35e minute (Fig. 6).

La migration des alvéoles corticaux vers l'intérieur de l'ovocyte et leur regroupement en petits amas semble commencer vers la 20e minute et devient nette vers la 30e minute. A la 55e minute il reste très peu d'alvéoles corticaux plaqués contre la membrane plasmique. Quand aux A.C. situés au-dessus de la vésicule germinative (du côté de la face concave), ils commencent à diminuer en nombre vers la 30e-40e minute ; à la 45e minute il ne reste plus d'alvéoles corticaux à hauteur du fuseau (qui se trouve du côté de la face plane de l'ovocyte). Ces migrations d'alvéoles corticaux n'apparaissent pas dans les ovocytes témoins incubés dans l'eau de mer.

La rupture de la vésicule germinative commence entre la 30e et la 35e minute (Pl. VIII, fig. 1-9) ; les pores nucléaires se raréfient avant la rupture de l'enveloppe nucléaire ; l'E.N. prend alors un aspect circonvolué et semble se briser en plusieurs endroits. Vers la 35e

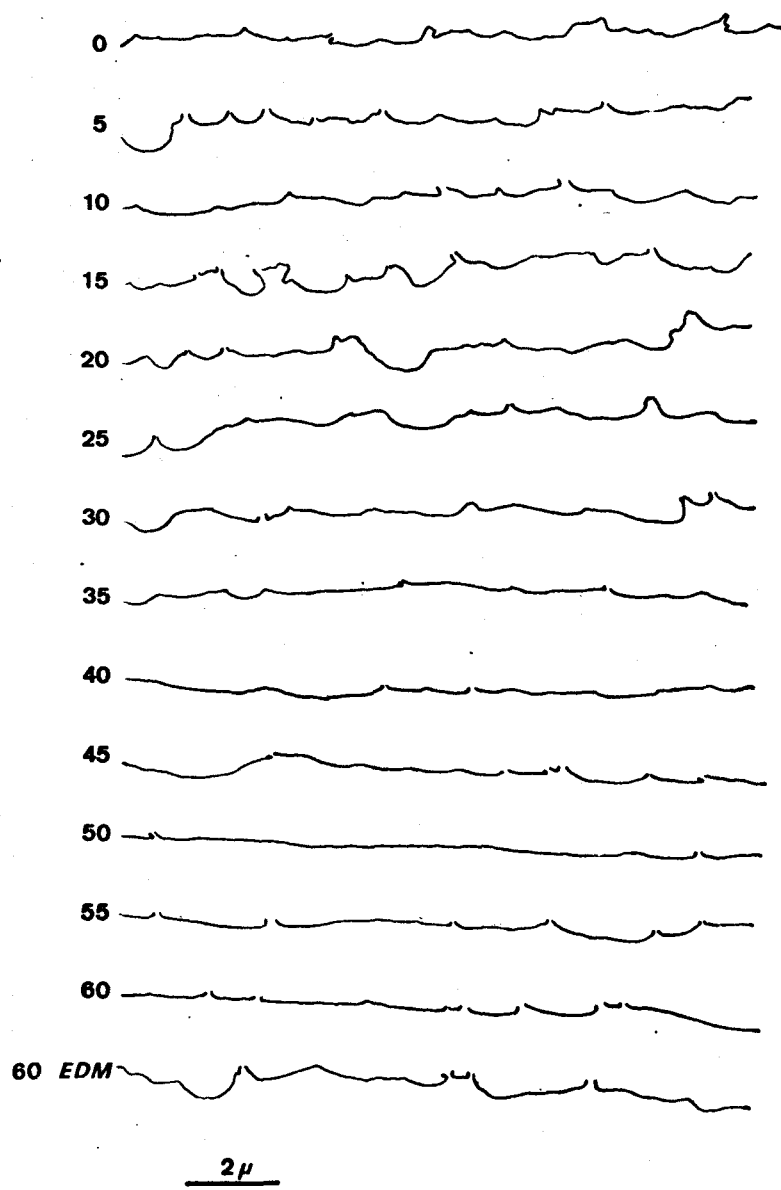


Figure 6 - Arenicola marina : Profil de la membrane plasmique en fonction de la durée d'incubation des ovocytes dans un extrait de prostomium (0,05 p./ml) ou dans l'eau de mer (EDM).

minute on note l'apparition de reticulum endoplasmique d'aspect frippé et dépourvu de ribosomes (Pl. VI, fig. 1, 2) ; ce "réticulum" pourrait, en fait, provenir directement des "restes" de l'enveloppe nucléaire. Vers la 40e minute l'enveloppe nucléaire apparaît nettement rompue, le mélange cytoplasme-nucléoplasme est bien avancé, comme le montrent les inclusions cytoplasmiques que l'on retrouve dans le nucléoplasme. La basophilie de la région nucléaire apparaît. Vers la 25e minute des "filaments" apparaissent dans le cytoplasme

près de la vésicule germinative, qui pourraient être les microtubules du fuseau en cours de polymérisation (Pl. VI, fig. 3 ; Pl. X, fig. 1). Les tubules se développent à la 30e minute. Puis il se regroupent en faisceaux et vers la 45e minute un début de fuseau apparaît. Un ou deux centrioles sont parfois observés aux sommets du fuseau.

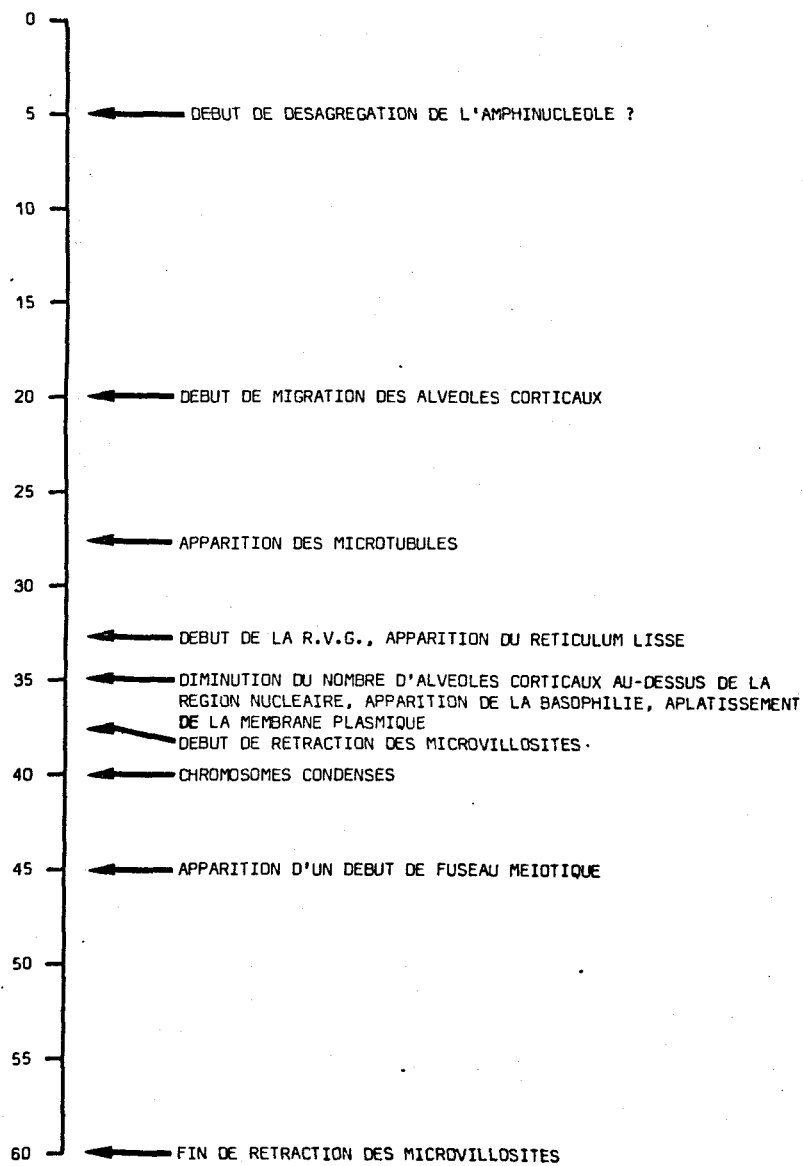


Figure 7 - Arenicola marina : Séquence des changements morphologiques induits par la SRM (temps en minutes).

Les chromosomes semblent commencer à se condenser assez tôt après le début de la stimulation hormonale, mais il n'apparaissent nettement que vers la 40e minute ; ils ne se disposent dans le fuseau de division que plus tard. L'amphinucléole semble subir des modifications (désagrégation, écoulement de la zone interne, plus claire, à travers la "paroi" externe, plus dense) assez tôt (5e minute ? 15e-25e minute). On observe parfois des nucléoles normaux et entiers dans des ovocytes ayant déjà subi la RVG (40e minute).

La SRM induit donc des changements morphologiques à quatre niveaux (général (forme) ; cortical (membrane plasmique, microvillosités), cytoplasmique (alvéoles corticaux) et nucléaire (V.G., fuseau de division méiotique)). La séquence de ces changements est résumée dans la Figure 7.

### 3.3. Rôle du calcium dans la réinitiation de la méiose

Le rôle de l'ion  $Ca^{++}$  comme médiateur intracellulaire des actions hormonales a été proposé par divers auteurs (HALES et al., 1977 ; RASMUSSEN, 1977 ; RASMUSSEN et GOODMAN, 1977). D'autre part l'importance du  $Ca^{++}$  dans la maturation est connue depuis longtemps aussi bien chez les invertébrés que chez les vertébrés. Pour étudier le rôle éventuel des ions  $Ca^{++}$  au cours de l'induction de la maturation ovocytaire chez l'arénicole par la SRM nous avons utilisé différentes substances qui modifient les concentrations intracellulaires de calcium et d'autre part, nous avons appliqué la méthode de DOREE, MOREAU et GUERRIER (sous presse) qui permet de visualiser directement le calcium libéré par la membrane plasmique dans le milieu intracellulaire sous l'action de l'hormone réinitiatrice de la méiose. Enfin nous avons essayé de calculer la constante de dissociation des substances intracellulaires liant le calcium (protéines, phospholipides).

#### 3.3.1. Action de substances modifiant les concentrations intracellulaires en calcium

Le mode d'action des différentes drogues utilisées est résumé dans le tableau 4. Toutes ces substances provoquent des modifications de concentrations intracellulaires de calcium en agissant sur la perméabilité calcique de la membrane plasmique ou sur la liaison du calcium avec des phospholipides ou des protéines.

Substance utilisée	Mode d'action
Tétracaïne (1) Procaïne (1)	Favorisent le déplacement de calcium à partir des membranes ; libération de $Ca^{++}$ à partir de complexes Ca-phospholipides membranaires
D-600 (2) Isoptine (2)	Inhibent les flux calciques transmembranaires et peuvent déplacer le calcium des sites membranaires.
Propranolol (3) Oxprénolol (3)	Agissent sur les sites calciques membranaires et modifient la perméabilité calcique.
Chlorure de lanthane (1)	Ralentit les échanges calciques ; agit sur les sites calciques de la membrane plasmique et favorise le relargage de $Ca^{++}$ lié intracellulaire.
Ionophore A 23187 (4)	Transporte le calcium à travers les membranes

Tableau 4 - Liste et mode d'action des drogues utilisées. (1) Sigma ; Laboratoires KNOLL AG, ALlemagne ; (3) Laboratoires Ciba-Geigy, France ; (4) Laboratoires E. Lilly, U.S.A.

3.3.1.1. Action de la tétracaïne et de la procaïne

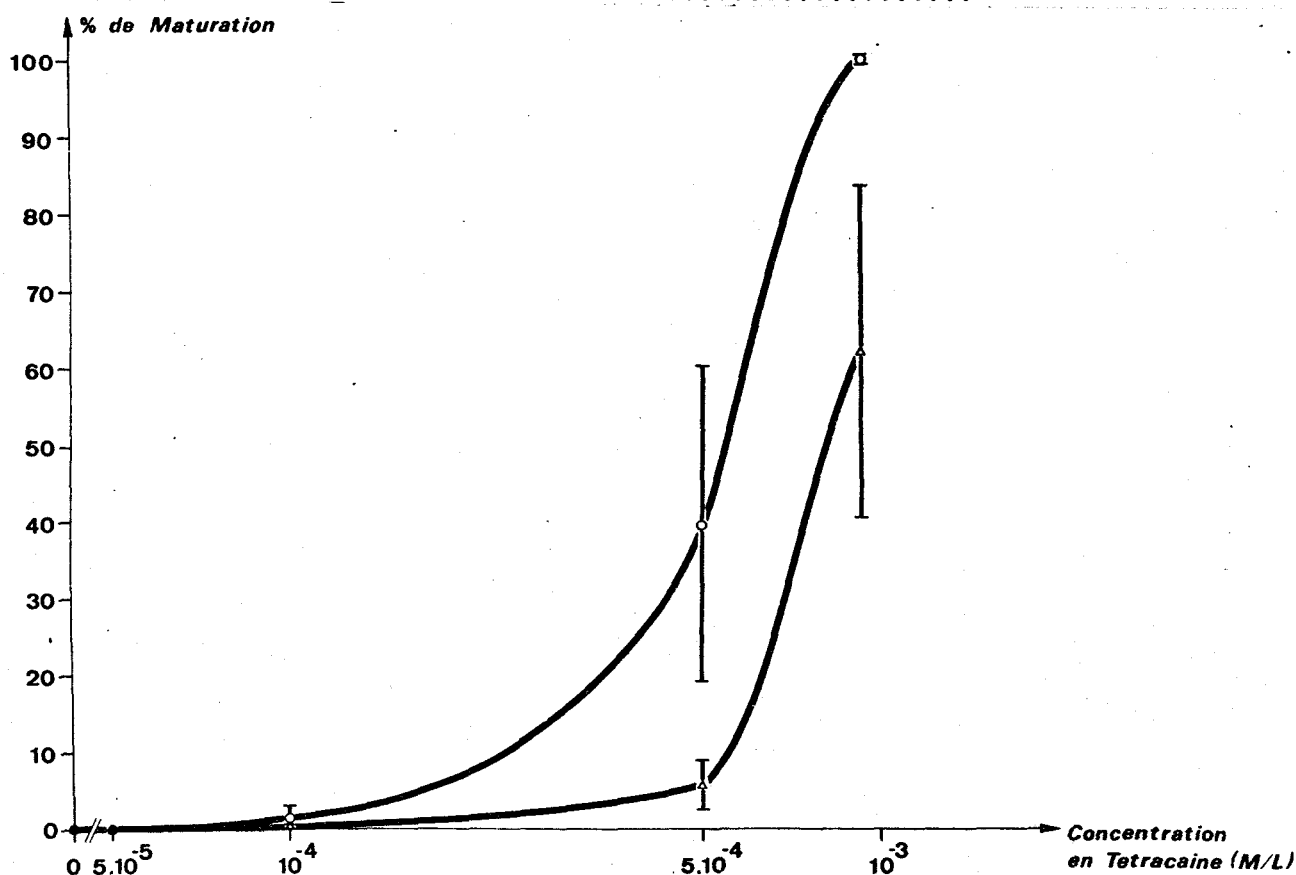


Figure 8 - Arenicola marina : % de la R.V.G. en fonction de la concentration en tétracaïne. Chaque point représente la moyenne de 4 expériences (Moyenne + erreur standard) (Δ: 2 h d'incubation ; O: 4 h d'incubation).

La tétracaïne, en solution dans l'eau de mer, est capable d'induire la maturation ovocytaire à partir de concentrations de  $10^{-4}$  M/L (Fig. 8).

La procaïne, analogue de la tétracaïne, en solution dans l'eau de mer, induit la maturation ovocytaire à partir de concentrations de  $2,5 \cdot 10^{-3}$  M ; elle est donc moins active que la tétracaïne (Tabl. 5).

Incubation	Temps (Heures)	I		II	
		0	2	0	2
Eau de mer		0	0	0	0
0,05 p./ml			100		97,2
Procaïne $10^{-5}$			0		0
$2,5 \cdot 10^{-5}$			0		0
$5 \cdot 10^{-5}$			0		0
$10^{-4}$			0		0
$2,5 \cdot 10^{-4}$			0		0
$5 \cdot 10^{-4}$			0		0
$7,5 \cdot 10^{-4}$			0		0
$10^{-3}$			0		0
$2,5 \cdot 10^{-3}$			5,8		4,7
$5 \cdot 10^{-3}$			63,3		76,1

Tableau 5 - *Arenicola marina* : % de RVG après 0 et 2 heures d'incubation en présence d'eau de mer, d'extraits de prostomiums ou de procaïne ( $10^{-5}$  à  $5 \cdot 10^{-3}$  M/L).

### 3.3.1.2. Action du D-600 et de l'Isoptine

Le D-600 et l'isoptine sont connus comme inhibiteurs des courants calciques transmembranaires. Ils n'inhibent par la maturation induite par les extraits de prostomiums (Tabl. 6 et 7) mais sont capables de l'induire dans l'eau de mer (Tabl. 8).



Incubation	Temps (Heures)		
	0	2	4
EDM	0	0	—
EDM + éthanol (0,5%)		0	0
0,05 p. /ml		100	—
0,05 p. /ml + éthanol (1 %)		100	100
EDM + D-600 ( $5 \cdot 10^{-4}$ M)		75,4 ± 24,3	100
0,05 p./ml + D-600 ( $5 \cdot 10^{-5}$ M)		98,5 ± 1,5	—
0,05 p./ml + D-600 ( $10^{-4}$ M)		99,8 ± 0,3	—
0,05 p./ml + D-600 ( $5 \cdot 10^{-4}$ M)		100	—

Tableau 6 - *Arenicola marina* : % de R.V.G. après 0, 2 et 4 heures d'incubation en présence d'EDM, d'extrait de prostomiums, d'EDM + D-600 et d'extrait de prostomiums + D-600. (Le D-600 a été dissous dans l'éthanol puis dilué dans l'EDM ou l'extrait de prostomium à raison de 5  $\mu$ l/ml d'EDM ou d'extrait de prostomium). (Moyenne + erreur standard de 3 expériences).

Incubation	Temps (Heures)		
	0	2	4
EDM	0	0	—
EDM + Ethanol (0,5 %)		0	0
0,05 p. /ml		100	—
0,05 p. /ml + Ethanol (1 %)		100	100
EDM + Isoptine ( $10^{-4}$ M)		0	13,2 ± 6,2
0,05 p. /ml + Isoptine ( $10^{-4}$ M)		99,8 ± 0,3	—
0,05 p. /ml + Isoptine ( $5 \cdot 10^{-5}$ M)		100	—

Tableau 7 - *Arenicola marina* % de RVG après 0, 2 et 4 heures d'incubation en présence d'EDM, d'extrait de prostomium, d'EDM + Isoptine et d'extrait de prostomium + Isoptine. (L'Isoptine a été dissoute dans l'éthanol puis diluée dans l'EDM ou l'extrait de prostomium à raison de 5  $\mu$ l/ml d'EDM ou d'extrait). (Moyenne + erreur standard de 3 expériences).

Incubation	Temps (heures)		
	0	2	4
EDM	0	0	0,6 ± 0,3
EDM + Ethanol (0,5 %)		0	6,0 ± 7,4
0,05 p. /ml		99,8 ± 0,3	100
0,05 p. /ml + Ethanol (0,5 %)		99,6 ± 0,5	99,8 ± 0,3
EDM + D-600 (10 <sup>-4</sup> M)		43,7 ± 35,3	72,3 ± 31,4
EDM + D-600 (5.10 <sup>-4</sup> M)		96,6 ± 3,8	99,8 ± 0,2
EDM + D-600 (10 <sup>-3</sup> M)		99,5 ± 0,6	99,6 ± 0,5
EDM + Isoptine (10 <sup>-4</sup> M)		15,3 ± 9,5	58,3 ± 29,7

Tableau 8 - Arenicola marina : % de RVG après 0, 2 et 4 heures d'incubation en présence d'EDM, d'extrait de prostomiums, de D-600 ou d'Isoptine (en solution dans l'éthanol puis dilué à 0,5 % dans l'EDM). Moyenne ± E.S. de 3 expériences.

### 3.3.1.3. Action du propranolol et de l'oxprénolol

Le propranolol induit la maturation ovocytaire à des concentrations variables selon les individus (Tabl. 9) ; il en est de même pour l'oxprénolol, qui semble, cependant, moins actif (Tabl. 10) ; de fortes concentrations de ces deux produits provoquent une lyse des ovocytes.

Incubation	Temps (H.)			I			II			III			IV		
	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4
EDM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05 p. /ml		100	100		100	98,7		98,8	100		100	100		100	100
Propranolol 10 <sup>-4</sup> M		0	0		0	0		0	0		0	0		0	1,4
Propranolol 5.10 <sup>-4</sup> M		0	0		0	22,4		0	20,8		0	20,8		0	20,7
Propranolol 10 <sup>-3</sup> M		8,2	20,5		1,6	87,4		1,9	98,6		0	80,0		0	80,0
Propranolol 5.10 <sup>-3</sup> M		91,2	94,0		6,8	Lyse		16,3	Lyse		99,3	Lyse?		99,3	Lyse?

Tableau 9 - Arenicola marina : % de RVG après 0, 2 et 4 heures d'incubation en présence d'EDM, d'extrait de prostomiums et de propranolol en solution dans l'EDM, chez 4 individus (I-IV).

Incubation	Temps (H.)			I			II			III			IV		
	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4	0	2	4
EDM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05 P./ml		100	100		100	98,7		98,8	100		100	100		100	100
Oxprénolol $5 \cdot 10^{-4}$ M		0	5,5		0	4,2		0	4,8		0	1,4		0	1,4
Oxprénolol $10^{-3}$ M		0	25,9		0	26,6		0	24		0	64,8		0	64,8
Oxprénolol $5 \cdot 10^{-3}$ M		36,7	76,4		0	Lyse		19,8	Lyse		26	68,3		26	68,3
Oxprénolol $10^{-2}$ M		49,7	77,4		6,6	Lyse		14	Lyse		48	Lyse		48	Lyse

Tableau 10 - *Arenicola marina* : % de RVG après 0, 2 et 4 heures d'incubation en présence d'EDM, d'extrait de prostomiums et d'oxprénolol en solution dans l'eau de mer, chez 4 individus (I-IV).

Une étude comparée de la cinétique de maturation induite par la SRM (0,05 p./ml) et par le propranolol a montré que le propranolol agit dans les mêmes délais que l'extrait de prostomiums.

3.3.1.4. Action du chlorure de lanthane

Le chlorure de lanthane induit la maturation ovocytaire à partir d'une concentration de  $10^{-3}$  M (Fig. 9).

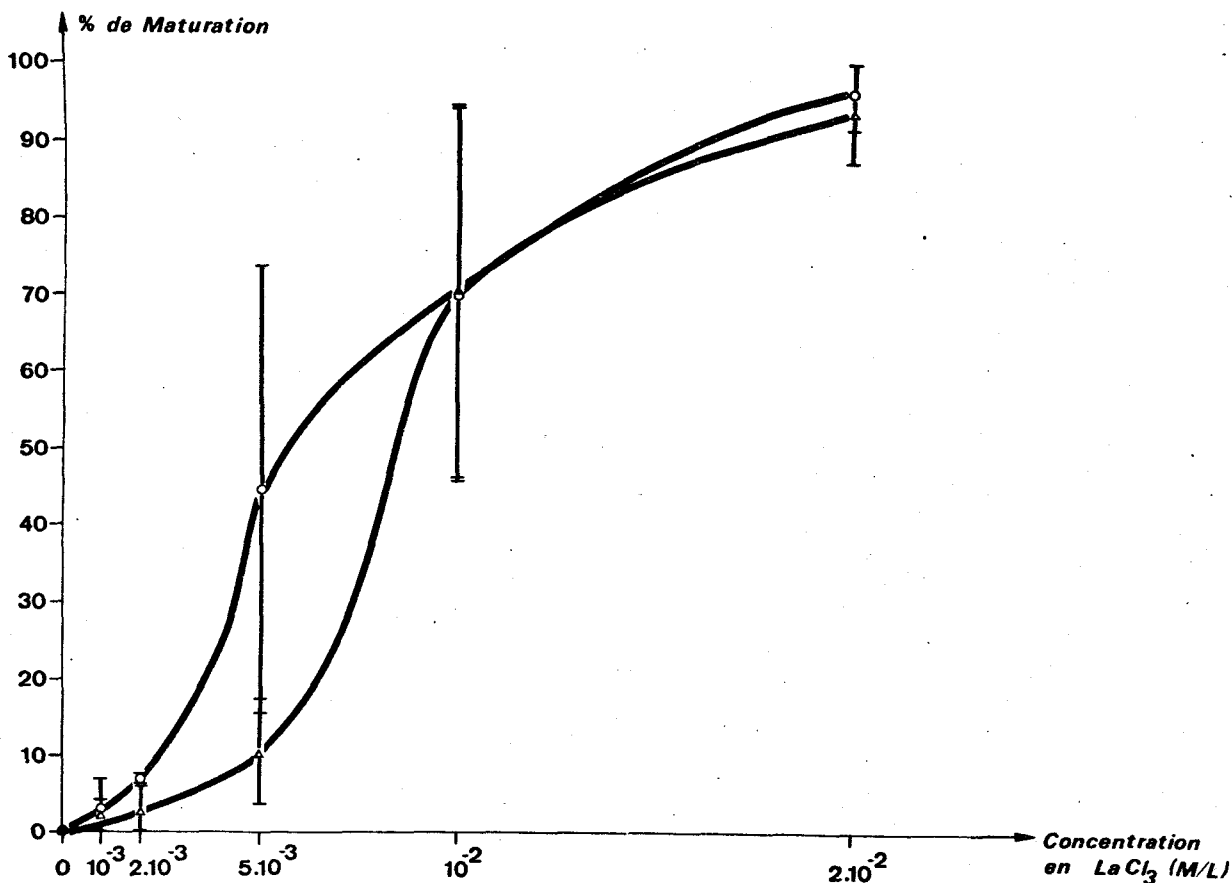


Figure 9 - *Arenicola marina* : % de RVG en fonction de la concentration en chlorure de lanthane (2 H ( $\Delta$ ) et 4 H ( $O$ ) d'incubation). Moyenne et erreur standard de 3 expériences (sauf  $2 \cdot 10^{-3}$  M: 2 exp.).

La solution de chlorure de lanthane à  $2.10^{-2}$  M a un pH de 5,8. L'EDM présente un pH de 8; les ovocytes incubés dans de l'eau de mer dont le pH a été amené à 5,8 par de l'HCl ne subissent pas de maturation; l'effet du chlorure de lanthane n'est donc pas dû à un effet de pH.

Le chlorure de lanthane semble agir dans les mêmes délais que l'extrait de prostomiums comme le montre l'étude comparée de la cinétique de maturation induite par la SRM ou le chlorure de lanthane.

3.3.1.5. Action de l'ionophore A 23187 et de l'Eau de Mer Artificielle  
.....  
sans calcium  
.....

L'ionophore A 23187 ne déclenche pas la maturation ovocytaire entre  $5.10^{-7}$  et  $5.10^{-6}$  M.

Les ovocytes incubés dans de l'eau de mer artificielle sans calcium subissent la maturation (Tabl. 11).

Temps (H.)	I		II		III	
	0	2	0	2	0	2
Incubation						
EDM	0	0	0	0	0	0
0,05 p. /ml		100		100		100
EDMA		0		2,6		22,2
EDMA sans Ca		63,3		99,4		57,9
0,05 p. /ml EDM		100		100		100
0,05 p. /ml EDM sans Ca		100		100		100

Tableau 11 - *Arenicola marina* : % de RVG après 0 et 2 heures d'incubation en présence d'EDM, d'EDMA, d'EDMA sans calcium ou d'extrait de prostomiums préparés dans de l'EDM, l'EDMA ou de l'EDMA sans calcium, chez 3 individus (I-III).

3.3.2. Mise en évidence directe de calcium libéré par l'hormone réinitiatrice de la méiose

L'aequorine est une photoprotéine qui émet de la lumière lorsqu'elle se trouve en présence d'ions  $Ca^{++}$  en très faibles quantités. Cette propriété a été utilisée par GUERRIER, MOREAU et DOREE pour étudier l'action de la 1-Méthyladénine sur l'ovocyte d'étoile de mer. Lorsque de l'aequorine est injectée dans un ovocyte et que ce dernier est stimulé par la 1-Méthyladénine on observe un flash lumineux. Ceci traduit donc l'apparition passagère de  $Ca^{++}$  ionique dans le cytoplasme qui a activé l'aequorine. L'action de la 1-Méthyladénine semble donc médiée par le  $Ca^{++}$  (GUERRIER et al.

(1978); MOREAU et al. (1978)). La 1-Méthyladénine est capable de provoquer une libération de calcium ionique in vitro, à partir d'une fraction subcellulaire riche en membranes plasmiques préparée à partir de cortex d'ovocytes. Avec l'aide de GUERRIER et MOREAU nous avons réalisé une expérience analogue avec l'arénicole : un extrait de prostomium (ne contenant pas de  $\text{Ca}^{++}$ ) a été préparé, ainsi qu'une fraction "membranaire" d'ovocytes (dont la pureté n'était, cependant pas très satisfaisante).

Lorsque 50  $\mu\text{l}$  de tampon NaCl 0,53 M - Tris Maléate 0,05 M pH 8,2 sont ajoutés au mélange aequorine (50  $\mu\text{l}$ ) - fraction membranaire (400  $\mu\text{l}$ ) on n'observe aucun flash lumineux.

L'addition de 50  $\mu\text{l}$  d'extrait de prostomium au mélange aequorine (50  $\mu\text{l}$ ) - tampon NaCl 0,53 M - Tris Maléate 0,05 M pH 8,2 (400  $\mu\text{l}$ ) ne provoque aucun flash lumineux.

Au contraire l'addition de 50  $\mu\text{l}$  d'extrait de prostomium au mélange aequorine (50  $\mu\text{l}$ ) - fraction membranaire (400  $\mu\text{l}$ ) provoque un flash lumineux, témoin d'une libération de calcium ionique par la fraction ovocytaire sous l'action d'extrait de prostomium. La 7e fraction (35  $\mu\text{g}$  protéines/ml) recueillie après passage sur la colonne de chelex 100 semble la plus active (la seconde fraction semble contenir la plupart des protéines (387  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )) (Fig. 10).

Le D-600 (concentration finale :  $5 \cdot 10^{-4}$  M), la tétracaïne (concentration finale :  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M) et le DTT (concentration finale :  $4,5 \cdot 10^{-3}$  M) libèrent également du calcium à partir de la fraction ovocytaire. Le propranolol semble presque inactif (Fig. 10).

Ces trois substances peuvent avoir déclenché une libération de calcium non spécifique (à partir de mitochondries ou de réticulum, par exemple); il nous semble que l'extrait de prostomium doit avoir agi de façon beaucoup plus spécifique sur la membrane plasmique. Cette expérience préliminaire semble donc en faveur du rôle de "second messenger intracellulaire" du calcium dans la réinitiation de la méiose par la SRM chez l'arénicole.

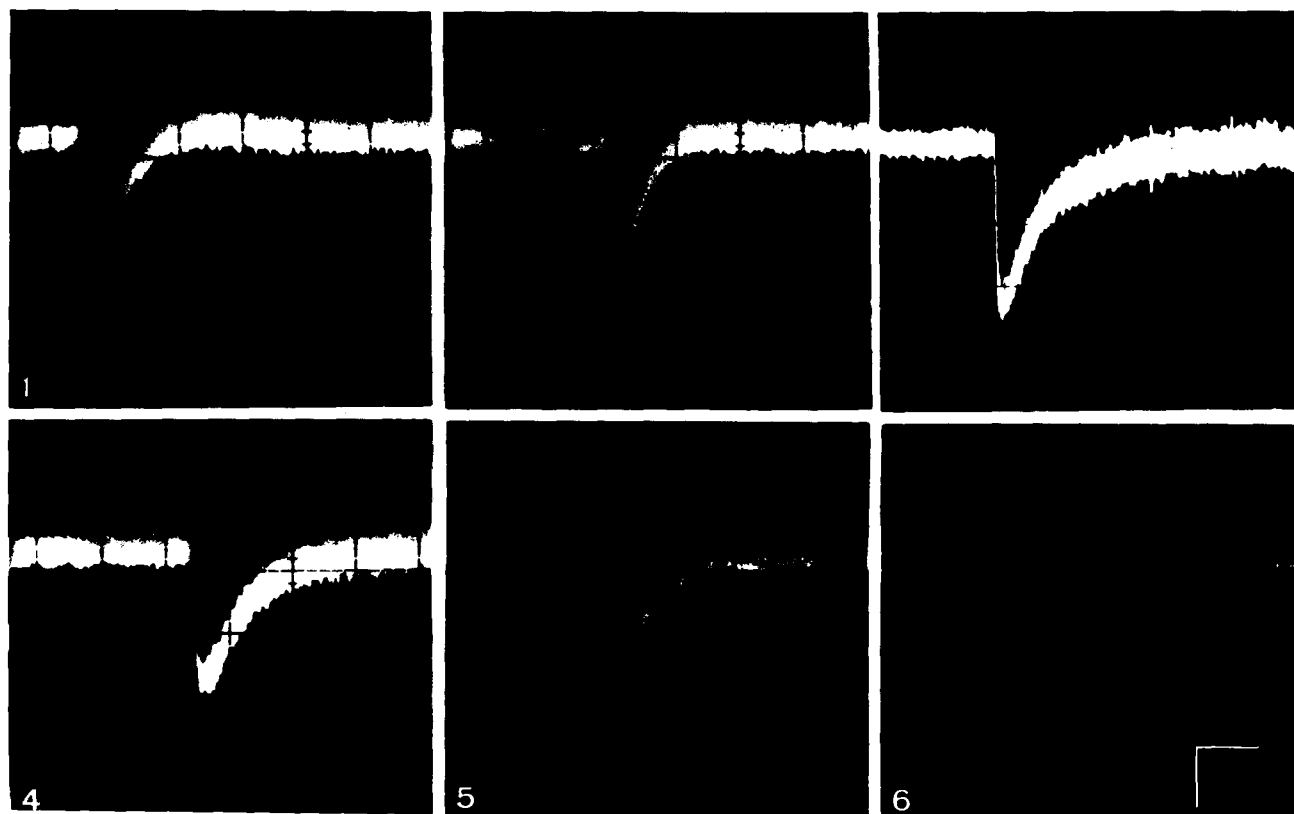


Figure 10 - Tracés de flash lumineux émis par l'aequorine en présence d'une fraction "membranaire" d'ovocytes d'arénicole soumis à un extrait de prostomium (1, 2), du DTT (concentration finale :  $4,5 \cdot 10^{-2}$  M) (3), de la Tétracaïne (concentration finale :  $0,11 \cdot 10^{-3}$  M) (4), du D-600 (concentration finale :  $0,39 \cdot 10^{-3}$  M) (5) et du propranolol ( $0,45 \cdot 10^{-3}$  M) (6).  
(abscisse : temps (échelle 1 sec.); ordonnée : intensité (échelle 0,2 nA)).

### 3.3.3. Mesure de la constante de dissociation des sites calciques

Si l'action hormonale se traduit par une augmentation de la concentration en ions  $Ca^{++}$ , dans le cytoplasme, provenant du compartiment Calcium lié, il doit nécessairement y avoir une augmentation de la constante de dissociation des substances liant le  $Ca^{++}$  (protéines, phospholipides). Nous avons essayé de mesurer cette constante de dissociation sur des homogénats d'ovocytes d'*Arenicola marina* en utilisant la méthode de NAKAMURA et YASUMASU (1974) qui mesure, par spectrophotométrie d'absorption atomique (grâce à l'aide de M. VANDORPE), la concentration en  $Ca^{++}$  d'homogénats

dialysés contre diverses solutions de  $\text{CaCl}_2$ . Un calcul permet de déduire la constante de dissociation et, en fonction de la concentration en Calcium totale, la concentration en calcium ionique libre. Nous avons trouvé une valeur de  $0,69 \cdot 10^{-3}$  pour la constante de dissociation (ce qui n'est pas très éloigné de la constante de l'ovocyte d'oursin :  $10^{-4}$  (ovocyte non fécondé) ;  $10^{-3}$  (ovocyte fécondé). Si on admet que la concentration totale en Calcium est de 1 mM la concentration en ions  $\text{Ca}^{++}$  devrait être de  $40 \mu\text{M}$ . Le manque de matériel ne nous a pas permis de faire une étude plus détaillée au cours de la maturation, mais cette méthode pourrait peut-être s'avérer intéressante pour l'étude de l'action hormonale. Chez le Xénope deux types de protéines liant le  $\text{Ca}^{++}$  ont été décrites : une cytosoluble et l'autre associée aux mélanosomes (OZON et al. (1976)).

#### 3.4. Importance des groupements -SH/SS- dans la réinitiation de la méïose

L'importance des groupements SH/SS au cours de la maturation a été mise en évidence chez les Echinodermes, les Amphibiens et les Mammifères. Elle a été suggérée par deux types d'expériences :

- utilisation de substances agissant sur les groupements SH et les ponts disulfures ;
- mesure directe des variations de taux de -SH et de ponts disulfures dans l'ovocyte.

Nous avons étudié l'importance des groupements -SH et -SS- au cours de la maturation de l'ovocyte d'arénicole en essayant une coloration spécifique des groupements -SH (méthode du DDD, Disulfure de 2,2'-dihydroxy-6,6'-dinaphtyle) sur coupes histologiques, mais la coloration diffuse de l'ovocyte et la précision de cette méthode ne permet sans doute pas de détecter de faibles variations des groupements -SH.

D'autre part, un dosage des groupements -SH ovocytaires par la méthode ampérométrique à l' $\text{AgNO}_3$  donne une valeur de  $4-5 \mu\text{M}$  de SH/ml d'ovocytes centrifugés dont  $0,2 \mu\text{M}$  se trouvent au niveau du cortex. Malheureusement le manque de matériel ne nous a pas permis de continuer les dosages au cours de la maturation ovocyttaire.

Nous avons utilisé également deux substances réductrices des ponts disulfures, le Dithiothréitol (DTT) et le 2,3-dimercapto-éthanol (BAL, British Anti-Lewisite).

### 3.4.1. DiThioThréitol (DTT)

Le DTT induit la maturation ovocytaire à partir de concentrations de  $10^{-3}$  M (Fig. 11).

Le DTT déclenche également une libération de calcium à partir de la fraction membranaire d'ovocytes.

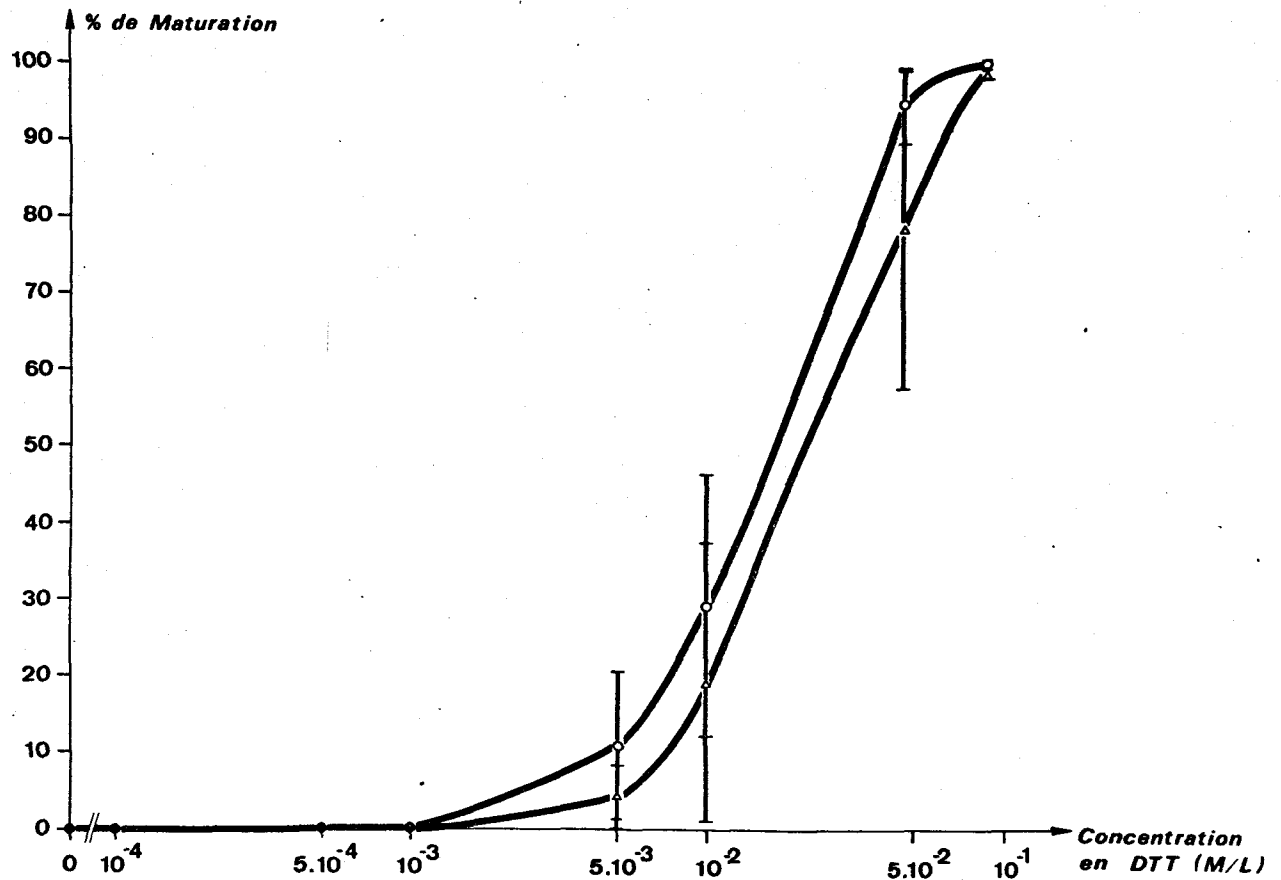


Figure 11 - Arenicola marina : % de RVG en fonction de la concentration en DTT (2 ( $\Delta$ ) et 4 (O) heures d'incubation). Moyenne et erreur standard de 3 expériences.

### 3.4.2. 2,3 dimercaptopropanol (British Anti-Lewisite, BAL)

Le BAL induit la maturation ovocytaire à des concentrations variables selon le lot d'ovocytes, mais devient inactif aux doses élevées (sans provoquer de lyse pour autant) (Fig. 11).



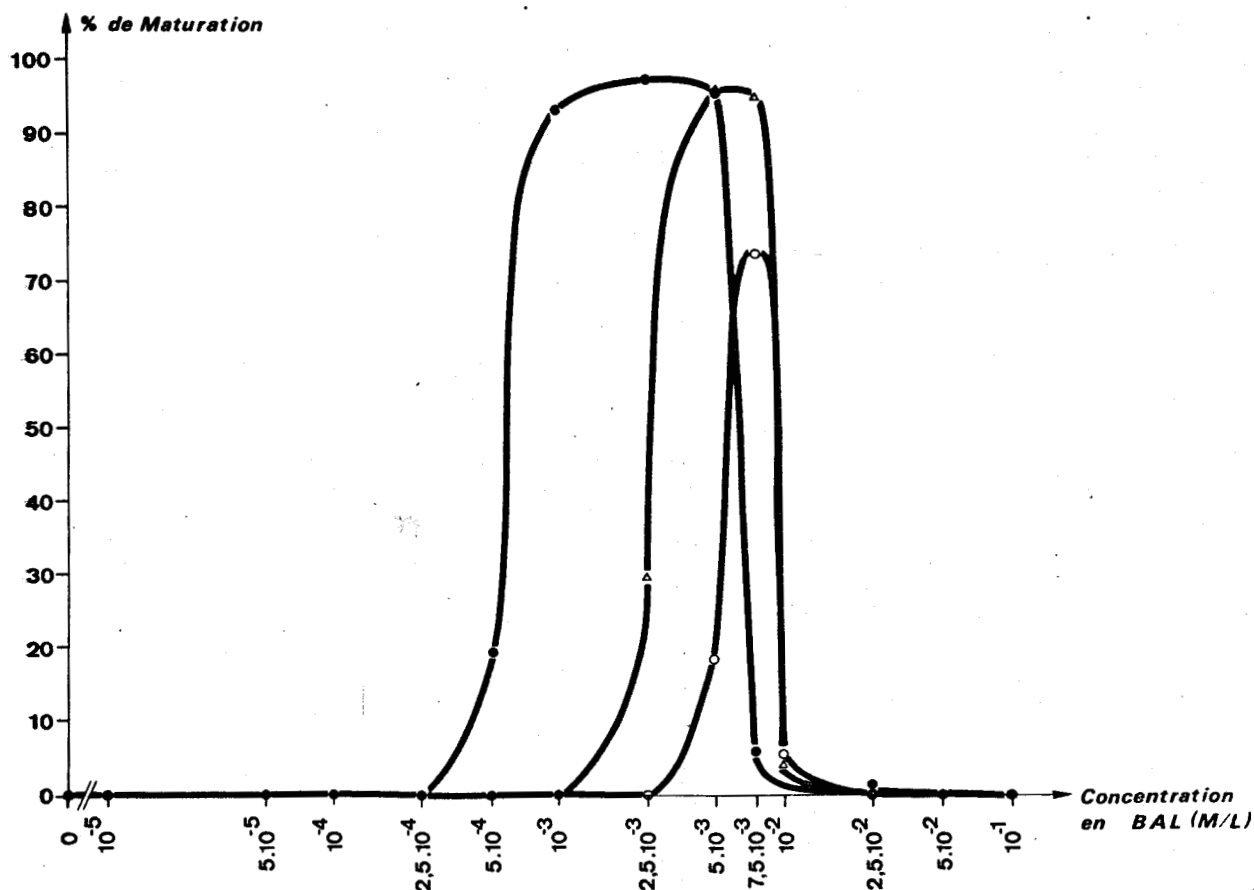


Figure 12 - *Arenicola marina* : % de RVG en fonction de la concentration en BAL pour 3 lots d'ovocytes (●, ○, △).

Les substances qui provoquent une augmentation des groupements -SH dans l'ovocyte déclenchent donc la maturation.

### 3.5. Acquisition de la fertilisabilité au cours de la maturation

Chez de nombreuses espèces, l'ovocyte n'est pas fécondable avant la maturation. Chez l'arénicole, les ovocytes coelomiques ne sont pas fécondables (HOWIE (1961 b)) ; seuls les ovocytes pondus (et ayant donc subi la maturation) peuvent être fécondés ; nous avons étudié l'acquisition de la fertilisabilité au cours de la maturation induite, in vitro, par la SRM.

#### 3.5.1. Obtention de spermatozoïdes actifs ("capacitation") (MEIJER (1976))

Le liquide coelomique des arénicoles mâles, obtenu par ponction, contient des amas de spermatocytes et des spermatozoïdes groupés en plaquettes

composées d'un cytophore sur lequel sont fixées les têtes de spermatozoïdes (Pl. XI, fig. 1, 4, 6). Le spermatozoïde comporte quatre parties différentes (Pl. XI, fig. 5, 7, 8):

- une région étroite, antérieure, de structure complexe, l'acrosome.
- une zone renflée, contenant le noyau.
- une partie plus étroite, contenant le centriole, la base du flagelle et la (les) mitochondrie(s).
- un flagelle.

Les flagelles des spermatozoïdes en plaquettes sont peu ou pas mobiles; ils adhèrent les uns aux autres par leur extrémité distale et forment ainsi soit une touffe de chaque côté de la plaquette, soit un ensemble de petites touffes. Ces spermatozoïdes ne peuvent être utilisés pour effectuer des fécondations artificielles: ils sont sans effets sur les ovocytes en métaphase.

Selon HOWIE (1961-1966) la dissociation des agrégats de spermatozoïdes (et leur émission, qui en découle) peut être induite in vivo par deux types de substances:

- une substance de nature lipidique (extraite par l'éther et le benzène, saponifiable, stable à la chaleur, présente chez le mâle et la femelle et les individus immatures, pendant toute l'année, dans le tube digestif, le liquide coelomique et la paroi du corps),
- une substance non lipidique (non extraite par l'éther, inactivée par la chaleur, présente dans le prostomium et capable de restaurer la capacité d'émission des gamètes inhibée par décérébration).

Nous avons repris l'étude in vitro de la désagrégation des plaquettes de spermatozoïdes (MEIJER (1976)):

Incubés en présence d'eau de mer les plaquettes de spermatozoïdes ne se modifient pas; en présence d'extrait de prostomiums elles se désagrègent (Pl. XI, fig. 2), libérant grand nombre de spermatozoïdes mobiles (Pl. XI, fig. 3), utilisables pour les fécondations artificielles. Les extraits actifs peuvent être dilués jusqu'à une concentration de 0,01 prostomium/ml; ils n'agissent que sur les agrégats de spermatozoïdes (et non sur les spermatocytes); la substance active semble instable à la chaleur et stable à la congélation; une partie de l'activité peut être extraite par l'éther. Les agrégats de spermatozoïdes se dissocient lorsqu'ils sont incubés en présence d'hyaluronidase mais pas de trypsine. En plus des ponts cytoplasmiques qui relient les spermatozoïdes entre eux ou au cytophore (Pl. XI, fig. 4) le calcium semble jouer un rôle important dans le maintien de la structure agrégée des spermatozoïdes; en effet, alors que les plaquettes de spermatozoïdes restent intactes dans l'eau de mer artificielle, elles se dissocient dans l'eau de mer artificielle sans calcium; elles se dissocient également dans les solutions d'EDTA (en solution dans l'eau de mer). En milieu alcalin (pH 10,1-10,5) les spermatozoïdes

se séparent et deviennent actifs; cette méthode a aussi été utilisée pour obtenir des spermatozoïdes actifs pour les fécondations artificielles.

### 3.5.2. Fécondation et activation parthénogénétique de l'ovocyte in vitro

Nous avons donc réalisé les fécondations artificielles à partir d'ovocytes ayant subi la maturation in vitro et de spermatozoïdes libres et mobiles obtenus par incubation, in vitro, des plaquettes de spermatozoïdes dans de l'eau de mer alcalinisée.

#### 3.5.2.1. Fécondation artificielle

Quelques minutes après addition des spermatozoïdes apparaît une "membrane" de fécondation, transparente, bien individualisée, lisse ou légèrement ondulée, séparée de la membrane plasmique par un espace périvitellin; l'apparition de cet espace périvitellin correspond, en fait, à une diminution du diamètre de l'ovocyte, le chorion conservant les mêmes dimensions. De très nombreuses et très fines microvillosités apparaissent dans l'espace périvitellin (aspect épineux) (Pl. XII, fig. 2, 3, 4, 5). L'ovocyte prend une forme biconvexe (Pl. XII, fig. 4). L'apparition de microvillosités et le changement de forme de l'ovocyte pourraient expliquer la diminution de taille de l'ovocyte. Peu après le premier, puis le second, globule polaire sont émis au centre de la face plane de l'ovocyte en métaphase (où se trouvait le fuseau de première division meiotique). Les ovocytes fécondés se développent normalement jusqu'au stade de la trochophore (Pl. XII, fig. 6).

En microscopie électronique à transmission l'espace périvitellin n'apparaît pas très marqué (contraction du chorion lors de la préparation des échantillons pour la microscopie?). Les microvillosités sont visibles entre la membrane plasmique et la membrane de fécondation; le nombre moyen d'alvéoles corticaux ne semble pas subir de variations importantes; du matériel peu dense aux électrons apparaît sous le chorion, surtout à proximité des globules polaires. (Pl. XV, fig. 4)

La microscopie électronique à balayage permet de mieux visualiser le changement de forme de l'ovocyte, qui prend une forme biconvexe (Pl. XIII, fig. 1, 4, 5). Les premiers stades du contact et de la pénétration du spermatozoïde peuvent être suivis (Pl. XIV):

- le spermatozoïde commence par se fixer sur le chorion (il s'agit d'une fixation suffisamment stable pour résister aux nombreux rinçages de l'ovocyte au cours de la préparation des échantillons pour la microscopie). (Pl. XIV, fig. 1).
- la présence d'une petite excroissance à l'avant du spermatozoïde pourrait correspondre à la réaction acrosomiale (Pl. XIV, fig. 2, 3).
- Un orifice apparaît à la surface du chorion par lequel la tête du spermato-

zoïde s'engage; le spermatozoïde ne semble pas s'enfoncer perpendiculairement à la surface du chorion mais presque tangentiellement (sous la membrane plasmique) (Pl. XIV, Fig. 4, 5, 6; 7, 8).

- le flagelle semble rentrer partiellement dans l'ovocyte; il se détachera sans doute par la suite (Pl. XIV, fig. 9, 10, 11).

- l'orifice dans la membrane plasmique se referme rapidement alors que celui laissé dans le chorion reste béant (Pl. XIV, fig. 12).

Il ne semble pas y avoir de zone préférentielle de pénétration du spermatozoïde, bien que nous ayons rencontré des spermatozoïdes surtout sur la face supérieure de l'ovocyte (du côté où apparaissent les globules polaires):

Le globule polaire, dont la forme est visible sous le chorion, apparaît très rapidement après l'entrée du spermatozoïde. Il en est de même pour les microvillosités qui sont visibles sous le chorion (Pl. XIII, fig. 6, 7, 8).

### 3.5.2.2. Activation parthénogénétique

Comme les spermatozoïdes, l'ionophore A 23187 (à partir de  $10^{-6}$  M) est capable d'induire l'activation de l'ovocyte ayant préalablement subi la maturation: il provoque le soulèvement de la membrane de fécondation, l'apparition des microvillosités, l'émission des globules polaires, le changement de forme de l'ovocyte (Pl. XII, fig. 10, 12, 13, 14). Les ovocytes témoins, incubés dans de l'eau de mer contenant de l'éthanol à  $10 \mu\text{l/ml}$  d'eau de mer, ne subissent pas d'activation. Au cours de l'activation par l'ionophore le nombre moyen d'alvéoles corticales reste constant (Tabl. 12).

Une brève incubation des ovocytes en métaphase dans le glycérol 1 M (dans l'eau distillée) déclenche également l'activation (Pl. XII, fig. 11).

Milieu d'incubation	nombre d'AC / $10 \mu$ de longueur et sur $10 \mu$ de profondeur
EDM	29,91 $\pm$ 4,05
EDM + $10 \mu\text{l}$ Ethanol/ml	30,70 $\pm$ 2,41
EDM + $10 \mu\text{l}$ A 23187/ml	31,18 $\pm$ 2,86
0,05 p./ml	32,90 $\pm$ 1,66
0,05 p./ml + $10 \mu\text{l}$ Ethanol/ml	32,73 $\pm$ 1,63
0,05 p./ml + $10 \mu\text{l}$ A 23187/ml	28,48 $\pm$ 3,31

Tableau 12 - Arenicola marina : Densité des alvéoles corticales (AC) observés en microscopie électronique à transmission dans des ovocytes en prophase (EDM) ou en métaphase (0,05 p./ml) traités ou non par de l'ionophore A 23187 ( $10 \mu\text{l}$  d'une solution à  $10^{-3}$  M dans l'éthanol/ml d'EDM ou d'extrait de prostomium). Moyenne  $\pm$  E.S.

Les ovocytes en prophase (incubation dans l'eau de mer) ne subissent pas de changements après addition de spermatozoïdes: ils ne sont pas fécondables. De même l'ionophore A 23187 et le glycérol 1 M sont sans action sur l'ovocyte bloqué en prophase.

Au cours de la maturation induite par l'hormone la possibilité d'être fécondé avec succès (développement embryonnaire), la fertilisabilité, est acquise. L'hormone réinitiatrice de la méiose induit donc un changement physiologique dans l'ovocyte qui lui permet de répondre à la stimulation du spermatozoïde par l'embryogenèse.

### 3.5.3. Acquisition de la fertilisabilité au cours de la maturation

L'acquisition de la fertilisabilité de l'ovocyte peut se situer à différents niveaux (qui, d'ailleurs, ne s'excluent pas les uns les autres); en effet les ovocytes ayant subi ou non la maturation peuvent différer par:

- la fixation des spermatozoïdes sur l'ovocyte,
- la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte,
- le déclenchement de la réaction corticale:
  - rupture des alvéoles corticales,
  - soulèvement de la membrane de fécondation,
  - blocage de la polyspermie,
- la possibilité de décondensation de la chromatine du noyau spermatique dans le cytoplasme de l'ovocyte,
- la possibilité de clivage de l'ovocyte.

Nous avons étudié quelques-uns de ces aspects dans l'acquisition de la fertilisabilité de l'ovocyte d'arénicole.

1) Quelques spermatozoïdes fixés à des ovocytes en prophase ont été observés (Pl. XIII, fig. 9); l'observation sur le vivant confirme cette fixation des spermatozoïdes sur les ovocytes n'ayant pas subi la maturation comme sur ceux qui ont subi la maturation.

2) La pénétration d'ovocyte en prophase n'a pas été observée, quoiqu'elle ne puisse être exclue.

3) Le déclenchement de la réaction corticale (comme on l'observe en microscopie photonique) ne peut se faire dans l'ovocyte en prophase; elle n'est possible que dans l'oeuf ayant subi, ou du moins commencé, sa maturation. Le soulèvement de la membrane de fécondation, et ses conséquences physiologiques, en réponse aux spermatozoïdes, à l'ionophore A 23187 ou au Glycérol 1 M ne devient possible qu'au cours de la maturation induite par l'hormone (Pl. XII, fig. 1, 2, 7, 8, 9, 10).

Une étude cinétique de l'acquisition de la possibilité de soulèvement d'une membrane de fécondation sous l'action des spermatozoïdes (Fig. 13) (Pl. XVI) ou de l'ionophore A 23187 (Fig. 14) montre que l'ovocyte ne peut être activé

que 10 à 15 minutes après la rupture de la vésicule germinative, à un moment où la rétraction des microvillosités est déjà bien avancée. La réaction est d'autant plus nette que le temps écoulé après la rupture de la vésicule germinative (et donc après le début de la rétraction des microvillosités) est long.

4) Le blocage à la polyspermie n'a malheureusement pas pu être étudié; signalons que nous n'avons toujours vu qu'un seul spermatozoïde pénétrant des ovocytes en métaphase.

5) Les deux autres aspects (formation du pronucleus mâle, contractilité corticale) n'ont pas été étudiés.

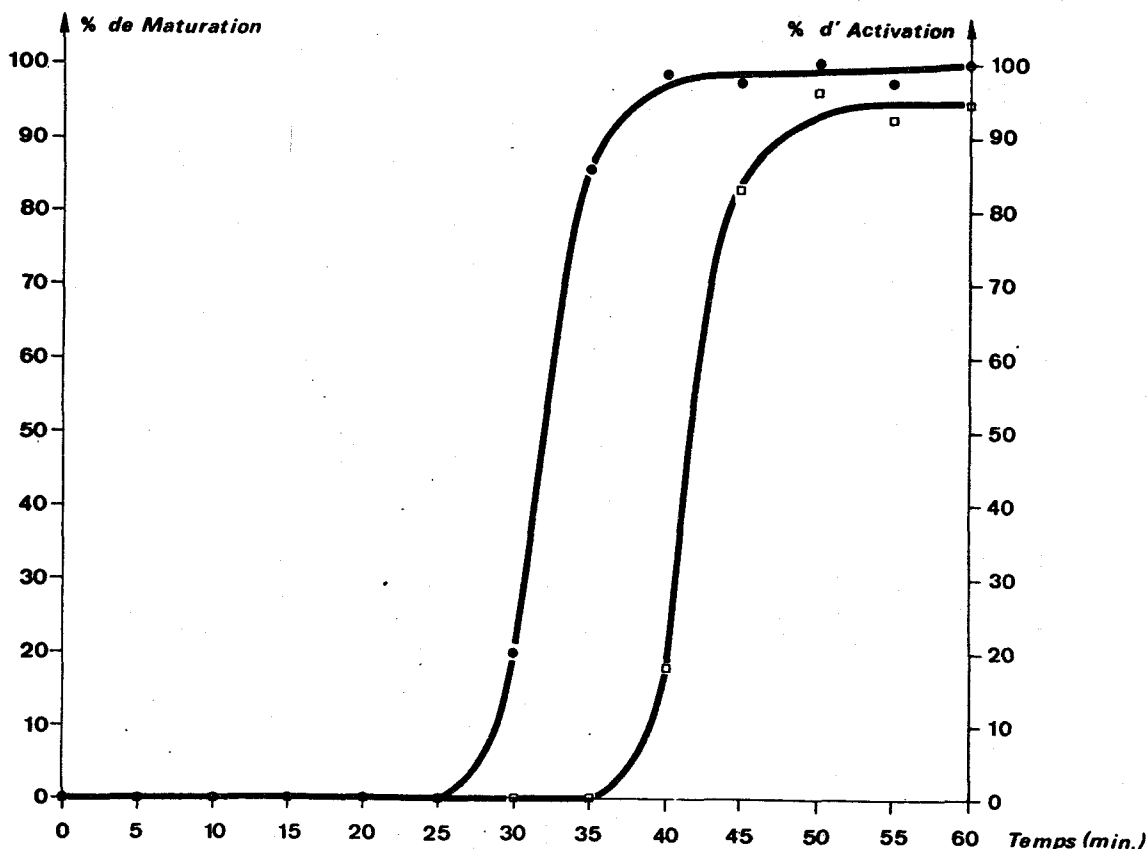


Figure 13 - *Arenicola marina* : % de RVG (●) en fonction du temps d'incubation en présence d'extrait de prostomiums (0,05 p./ml). Le % d'activation (□) correspond au % de soulèvement de la membrane de fécondation observé après 3 minutes de contact avec les spermatozoïdes (300  $\mu$ l de plaquettes de spermatozoïdes incubés pendant 4 heures dans 3 ml d'extrait de prostomium à 0,05 p./ml; 50  $\mu$ l de cette solution de spermatozoïdes actifs sont ajoutés à 300  $\mu$ l d'une solution d'ovocytes à 100  $\mu$ l d'ovocytes/ml d'extrait).

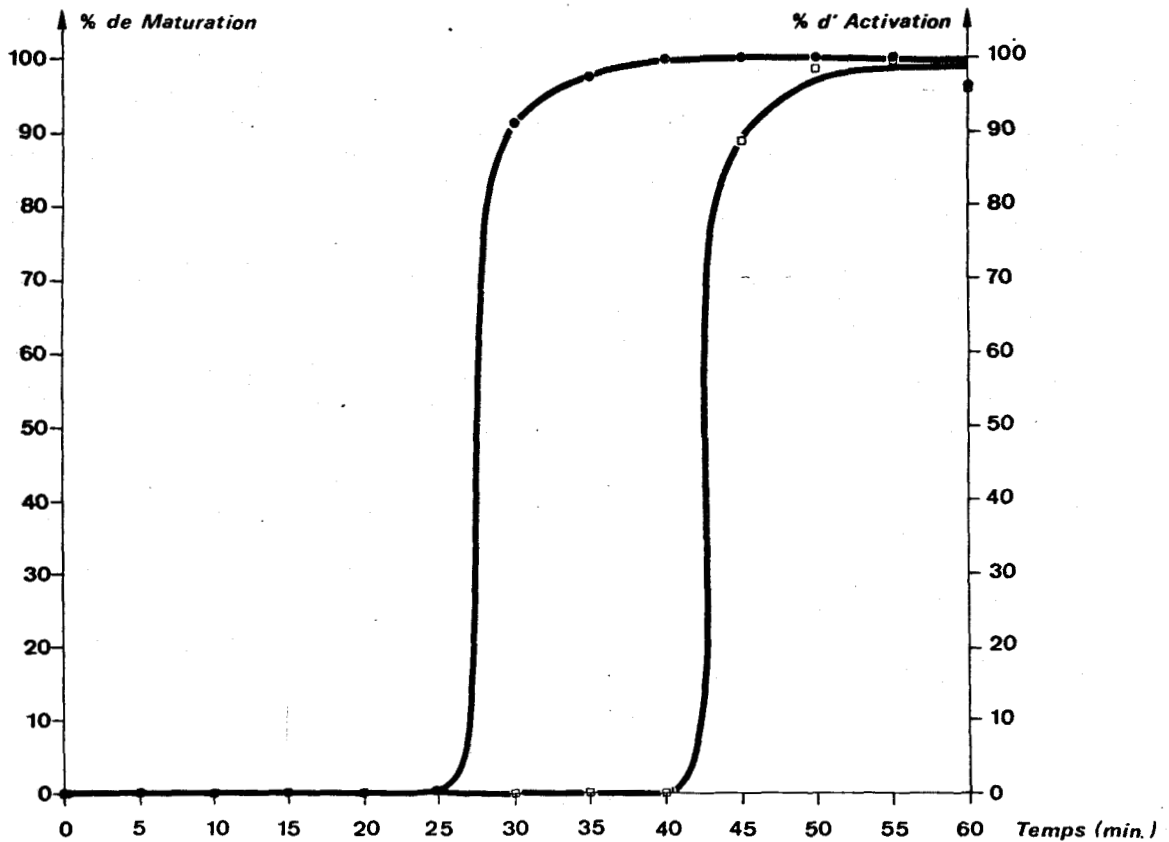


Figure 14 - *Arenicola marina* : % de RVG (●) en fonction du temps d'incubation en présence d'extrait de prostomiums (0,05 p./ml). Le % d'activation (□) correspond au % de soulèvement de la membrane de fécondation observé après 3 minutes de contact avec l'ionophore A 23187 (concentration finale:  $5 \cdot 10^{-6}M$ ) ( $3 \mu l$  de solution d'ionophore A23187  $5 \cdot 10^{-4} M$  dans l'éthanol/  $300 \mu l$  d'une solution d'ovocytes à  $100 \mu l$  d'ovocytes /ml d'extrait).



#### IV - APLYSIA PUNCTATA: RESULTATS

Les fragments de gonades isolés et incubés in vitro dans de l'eau de mer ne subissent pas de modifications.

Au contraire l'incubation de ces fragments in vitro dans un extrait de ganglions viscéraux provoque, après une heure, l'ovulation. Les ovocytes libérés sont débarrassés de leurs cellules folliculaires et ont subi la rupture de la vésicule germinative. Ils poursuivent leur maturation en dehors de l'ovotestis jusqu'à émission des trois globules polaires (le premier se divise) après 6 heures (Pl. XVII, fig. 3 - 9).

Il semble donc que les ganglions viscéraux contiennent une substance capable d'induire l'ovulation et la maturation des ovocytes. Cette substance pourrait être l'E.L.H. (Egg-Laying Hormone), hormone produite par les ganglions viscéraux et qui déclenche la ponte quand elle est injectée dans l'animal intact (ARCH (1976)).

Par analogie avec ce qui est connu chez les échinodermes et les vertébrés (où une hormone d'origine nerveuse déclenche l'ovulation et la maturation ovocytaire par l'intermédiaire d'une seconde hormone produite par la gonade) nous avons essayé de savoir si une seconde hormone pouvait également exister chez l'aplysie.

Trois expériences sont en faveur de cette hypothèse de l'existence d'un "relais hormonal":

1) Le pourcentage de maturation des ovocytes ovulés à partir de fragments d'ovotestis incubés dans l'extrait de ganglions viscéraux est élevé (entre 95 et 100 %). Au contraire les ovocytes isolés (Pl. XVII, fig. 1) incubés dans cet extrait de ganglions montrent un pourcentage de maturation très variable (Moyenne d'expériences réalisées chez 26 animaux:

- ovocytes incubés dans l'eau de mer: 2,8 % de maturation
- ovocytes incubés dans l'extrait de ganglions viscéraux: 27,3 % de maturation. Ce pourcentage pourrait représenter des maturations d'ovocytes qui n'ont pas été totalement débarrassés du tissu ovarien).

Il semble donc que la présence d'autres composants de l'ovotestis que les ovocytes favorise fortement la maturation.

2) Le pourcentage de maturation est augmenté quand ces ovocytes isolés sont incubés, dans l'extrait de ganglions viscéraux, en présence d'un fragment de gonade (Moyenne de trois expériences:

- ovocytes incubés sans fragments d'ovotestis: 25,9 % de maturation
- ovocytes incubés avec fragments d'ovotestis: 57,9 % de maturation).

3) Un extrait de 20 ganglions viscéraux a été passé sur une colonne de Sephadex G 25 Fine équilibrée à l'eau de mer; l'activité biologique des frac-



tions (déclenchement de l'ovulation et de la maturation à partir de fragments de gonades) apparaît dans les premières fractions de poids moléculaires élevés (Fig. 15).

Un extrait de 30 ganglions viscéraux dans lequel ont séjourné des fragments de gonades pendant 2 heures a été également passé sur cette colonne; l'activité biologique, testée à partir de fragments de gonades de 4 animaux, apparaît aussi dans les premières fractions (Fig. 16). Mais un second pic d'activité a également été détecté (1 expérience /4) qui correspond à une substance de poids moléculaire plus faible. Cette expérience demande à être répétée; si le résultat se confirme, elle indiquerait que l'incubation d'un fragment d'ovotestis dans un extrait de ganglions viscéraux a provoqué l'apparition d'une seconde substance, de poids moléculaire plus faible, capable de déclencher l'ovulation et la maturation in vitro.

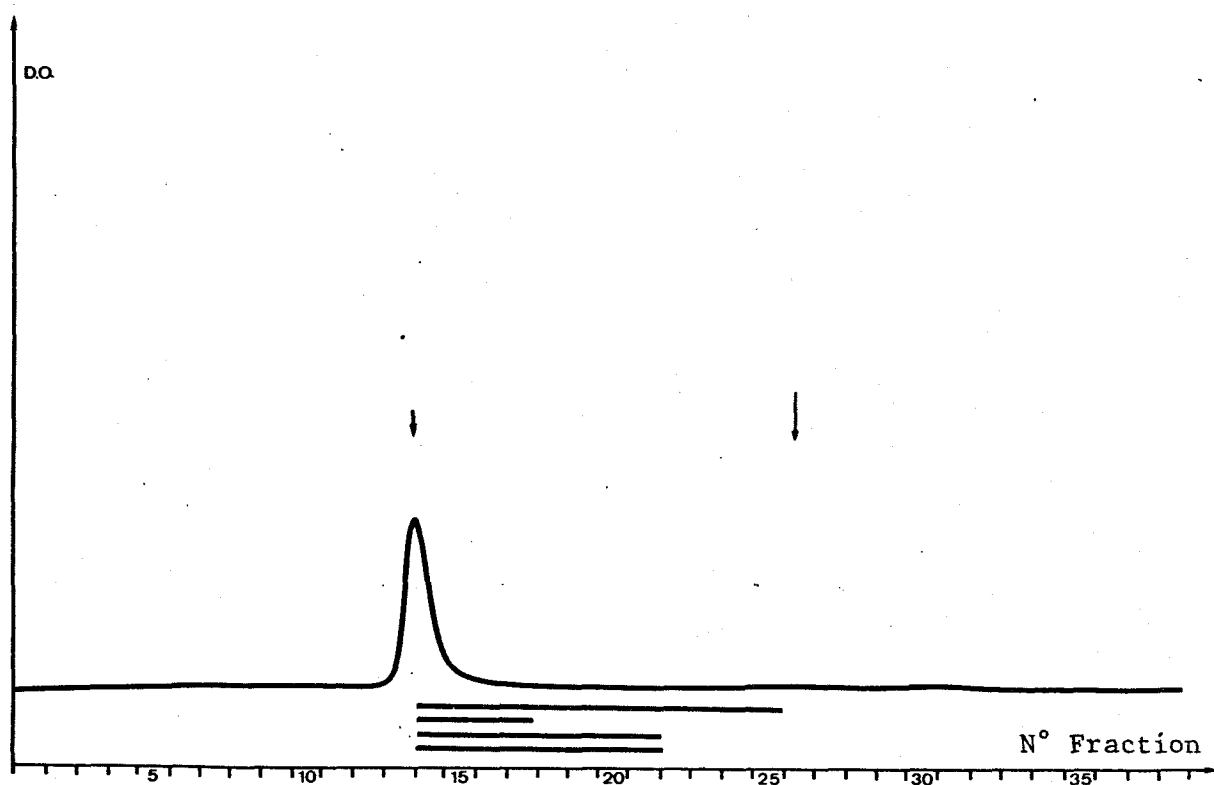


Figure 15 - Aplysia punctata : Profil d'absorption d'un extrait de 20 ganglions viscéraux passé sur colonne Sephadex G 25 Fine (vitesse d'élution par l'eau de mer filtrée sur Millipore: 1 fraction/15 minutes) Le volume d'élution du Bleu Dextran est indiqué par une flèche épaisse, celui de la vitamine B 12 par une flèche mince; l'activité biologique a été testée sur quatre animaux et est indiquée par un trait épais horizontal. D.O., Densité Optique.

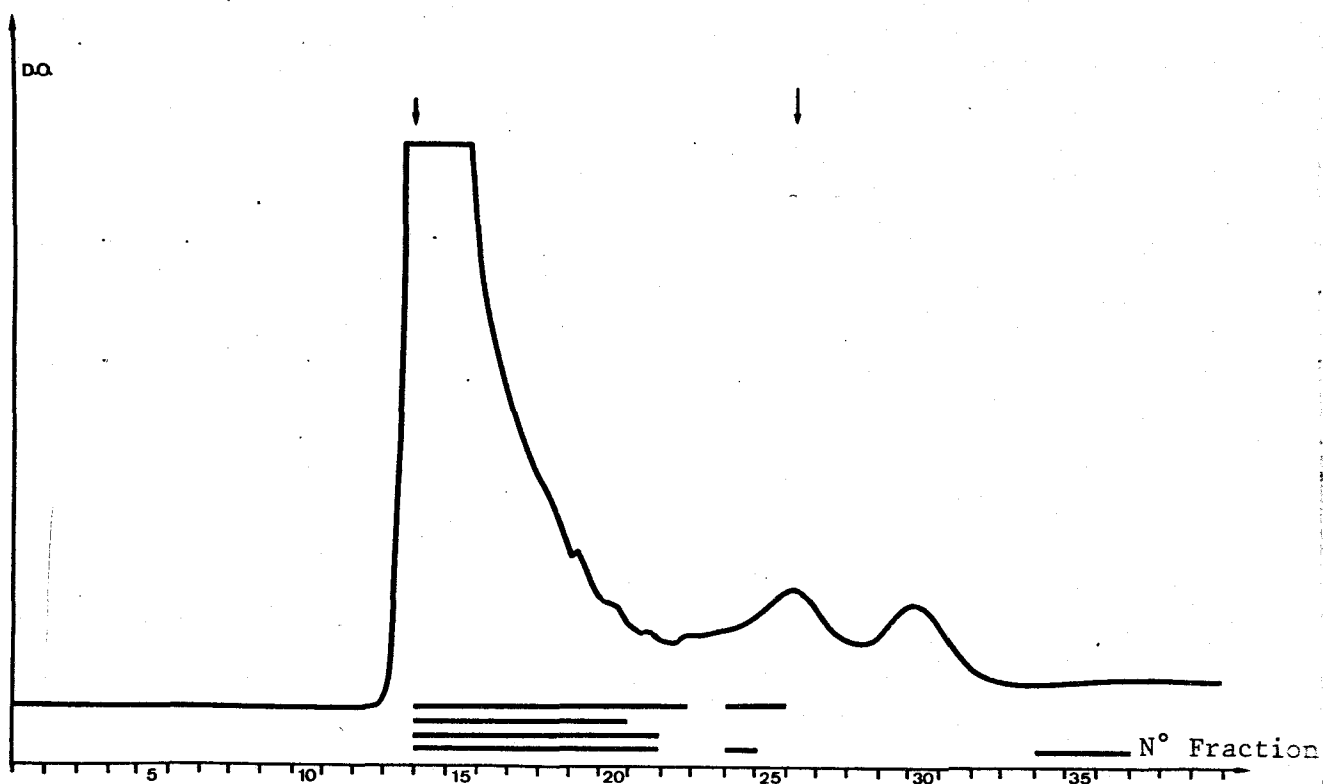


Figure 16 - Aplysia punctata : Profil d'absorption d'un extrait de 30 ganglions viscéraux, dans lequel ont séjournés des fragments de gonades pendant 2 heures, passé sur colonne de Sephadex G 25 Fine. Elution par de l'Eau de mer filtrée sur millipore. Le volume d'élution du Bleu Dextran est indiqué par une flèche épaisse; celui de la vitamine B 12 par une flèche mince; l'activité biologique a été testée sur quatre animaux et est indiquée par un trait épais horizontal. D.O., Densité Optique.



## V - DISCUSSION

Les ovocytes peuvent être classés en quatre grands groupes (Fig. 2) selon que la fécondation se fasse en prophase I ou que l'ovocyte doive subir une maturation préalable qui l'amène en métaphase I, métaphase II ou au stade d'ovule. Les ovocytes d'arénicole et d'aplysie subissent une maturation préalable à la fécondation. Ils appartiennent respectivement aux groupes II et IV de la figure 2.

Dans une première partie nous discuterons du système de contrôle hormonal de la maturation des ovocytes d'Arenicola et d'Aplysia en les comparant à celui d'autres animaux (Aspect endocrinologie de la maturation).

Dans une seconde partie nous envisagerons les aspects physiologiques, biochimiques et morphologiques de la réinitiation de la méiose au niveau de l'ovocyte (Aspect biologie du développement de la maturation).

### 5.1. Contrôle de la maturation des ovocytes

Les stimuli qui déclenchent la maturation des ovocytes sont assez mal définis. Ils peuvent se classer en cinq catégories:

- fécondation
- contact avec le milieu extérieur
- levée d'une inhibition interne
- stimulation par des protéases
- contrôle hormonal.

#### 5.1.1. Déclenchement par la fécondation

Le spermatozoïde fécondant déclenche la maturation chez beaucoup d'invertébrés et notamment beaucoup d'annélides polychètes. Cependant la difficulté d'analyser séparément les phénomènes propres à la maturation et ceux propres à la fécondation font que la maturation de ce type d'ovocyte a été peu étudiée. Aucune étude, à notre connaissance, n'a été faite pour déterminer quel est le facteur précis de la fécondation (contact spermatozoïde-ovocyte ; fusion des membranes ; libération de  $Ca^{++}$  intracellulaire lors de la fécondation ; présence du noyau mâle, etc....) qui déclenche la maturation.

La maturation de l'ovocyte d'arénicole ne peut être déclenchée par la présence de spermatozoïdes en plaquettes ou libres. La maturation de l'ovocyte d'aplysie ne semble pas être déclenchée par fécondation par l'auto-sperme présent dans l'ovotestis car les spermatozoïdes sont immobiles, groupés en faisceaux; ils doivent subir une activation; cette activation serait due aux sécrétions de la femelle réceptrice et non du mâle donneur (THOMPSON et BEBBINGTON (1969)).

### 5.1.2. Déclenchement par contact avec le milieu extérieur

Le contact avec le milieu extérieur a été souvent proposé, dans des travaux anciens, comme facteur inducteur de la méïose chez de nombreux invertébrés. En fait il semblerait que ce mode de contrôle ne soit absolument pas prouvé et qu'il provienne plutôt de conditions expérimentales peu rigoureuses; ainsi, par exemple, les ovocytes de Sabellaria alveolata (Annélide Polychète) subissent une maturation "spontanée" par contact avec le milieu extérieur. Les travaux de PEAUCELLIER (1977a) ont montré que cette maturation provenait, en fait, d'une stimulation par des protéases spécifiques qui contamineraient l'eau de mer et qui proviendraient du tube digestif de la femelle sortie de son tube ou disséquée. Il en est sans doute de même pour de nombreuses espèces d'annélides polychètes à maturation "spontanée" (Chaetopterus, Pomatoceros, Owenia (Observ. Pers.)). Une fausse maturation "spontanée" a également été observée chez l'étoile de mer et les amphibiens (SCHUETZ (1974b)). La maturation "spontanée" de l'ovocyte de mammifère n'est pas considérée par tous les auteurs comme très physiologique (HILLENSTJÖ (1976), LINDNER et al. (1977), TSAFRIRI et al. (1972)). Les ovocytes d'arénicole et d'aplysie ne subissent pas de maturation "spontanée" lorsqu'ils sont isolés dans l'eau de mer.

### 5.1.3. Déclenchement par levée d'une inhibition interne

Le contrôle de la maturation par levée d'une inhibition interne a été suggéré, mais non démontré, pour de nombreuses espèces et principalement pour les mammifères (FOOTE et THIBAUT (1969), PINCUS et ENZMANN (1935)). Ce type de contrôle semble exclus pour l'arénicole et l'aplysie mais il n'est pas impossible que des inhibiteurs de la méïose existent chez ces deux invertébrés. Dans ce cas l'inhibition serait levée par les hormones inductrices de la maturation comme c'est le cas pour l'étoile de mer dont les ovaires contiennent une substance inhibitrice de la maturation (KANATANI et OHGURI (1970)). Cet inhibiteur (astérosaponines) inhibe la production "spontanée" (induite par le calcium du milieu extérieur) de l-méthyladénine par les cellules folliculaires, empêchant donc, indirectement, la maturation (IKEGAMI et al. (1976a)). Cette inhibition est levée par la GSS (Gonad Stimulating Substance) qui déclenche la production de l-méthyladénine dans les cellules folliculaires.

### 5.1.4. Déclenchement par des protéases

La maturation "spontanée" des ovocytes de Sabellaria alveolata provient, en fait, de protéases du tube digestif contaminantes et qui sont actives à très faibles concentrations (PEAUCELLIER (1977a)). La maturation d'ovocytes d'étoiles de mer (CLARK et KANATANI (1975)) et d'amphibiens (GUERRIER et al. (1977)) (PAYS et al. (1977)) peut être inhibée par des anti-protéases. Selon PEAUCELLIER (Communication personnelle) la maturation de l'o-

vocyte d'arénicole ne peut être déclenchée par des protéases.

#### 5.1.5. Déclenchement par une hormone

Le contrôle hormonal de la maturation ovocytaire semble probable chez de nombreux invertébrés et vertébrés:

- coelentérés: l'ovaire de Spirocodon (Scyphozoaire) produit une substance inductrice de ponte ("Spawning Inducing Substance") capable de déclencher la maturation ovocytaire et la ponte (IKEGAMI et al. (1978)).
- certains lamellibranches (IWATA (1958)).
- scaphopodes: des observations personnelles ont montré que les ovocytes de Dentalium ne subissent pas la maturation lorsqu'ils sont isolés dans de l'eau de mer; les ovocytes pondus naturellement subissent la maturation avant la fécondation. Un facteur d'origine interne (hormonal?) semble donc nécessaire pour le déclenchement de la maturation.
- siponcles: des travaux préliminaires ont montré que la maturation pouvait être induite in vitro chez les siponcles par des extraits de divers organes (RICE (1966)).
- crustacés-insectes (WALLEY et al. (1971)-ANDERSON (1972)).
- Tuniciers, céphalocordés, reptiles, oiseaux.

Le contrôle hormonal de la maturation ovocytaire a été établi chez quatre groupes animaux (Fig. 17):

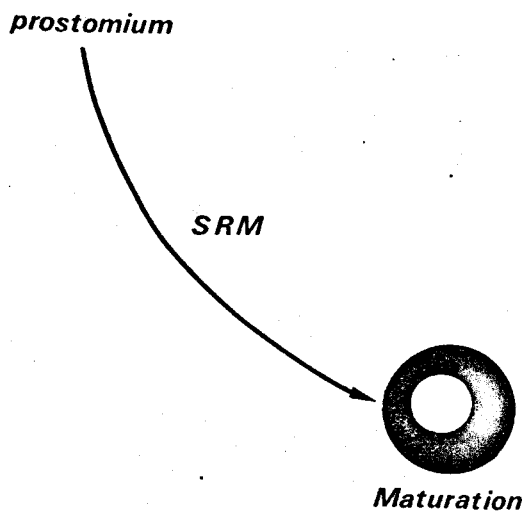
- échinodermes (KANATANI (1973, 1975)).
- poissons (SUNDARARAJ et GOSWAMI (1970), UNGAR et al. (1977), JALABERT (1975)).
- amphibiens (BRACHET (1974 b), OZON et al. (1976), SCHUETZ (1977)).
- mammifères (LINDNER et al. (1974, 1977)).

Chez les échinodermes et les vertébrés il peut se résumer de la façon suivante: Une neurohormone (GSS, Gonad Stimulating Substance - Hormone gonadotrope) d'origine nerveuse (nerf radial - hypophyse) agit sur des cellules relais (cellules folliculaires ou tissu interrénal chez certains poissons) qui produisent une seconde hormone (MIS, Maturation Inducing Substance (1-méthyladénine) - stéroïde (progestérone-corticostéroïde) - encore inconnu chez les mammifères) qui, elle, agit à la surface de l'ovocyte pour induire la maturation. Ce travail a montré l'existence d'un système de contrôle hormonal de la maturation ovocytaire chez Arenicola marina (Annélide polychète) et Aplysia punctata (Mollusque Gastéropode).

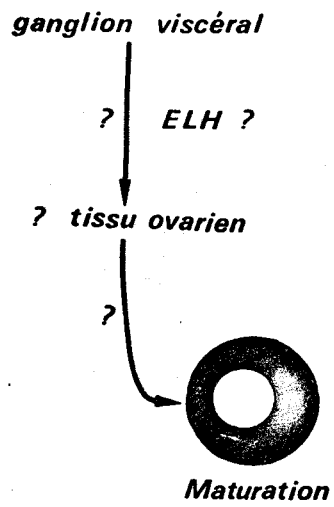
---

Figure 17 - Schéma illustrant les modèles connus de contrôle hormonal de la maturation ovocytaire. SRM, Substance Réinitiatrice de la Méiose; ELH, Egg-Laying Hormone; GSS, Gonad Stimulating Substance; MIS, Maturation Inducing Substance; 1-MeAde, 1-Méthyladénine.

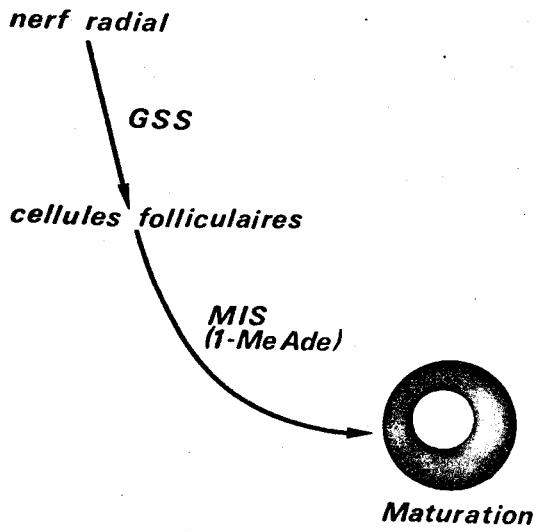
POLYCHETES (Arenicola)



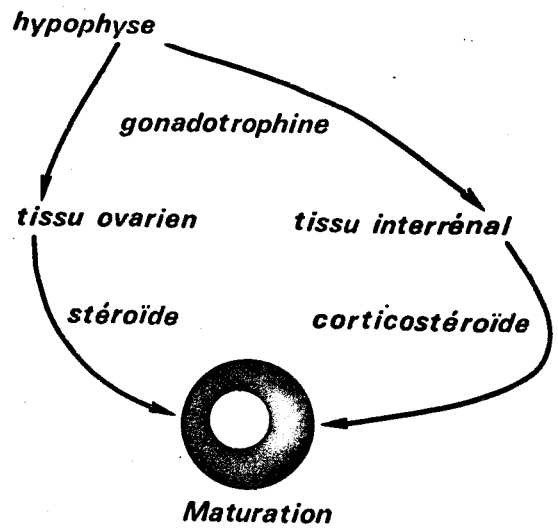
GASTEROPODES (Aplysia)



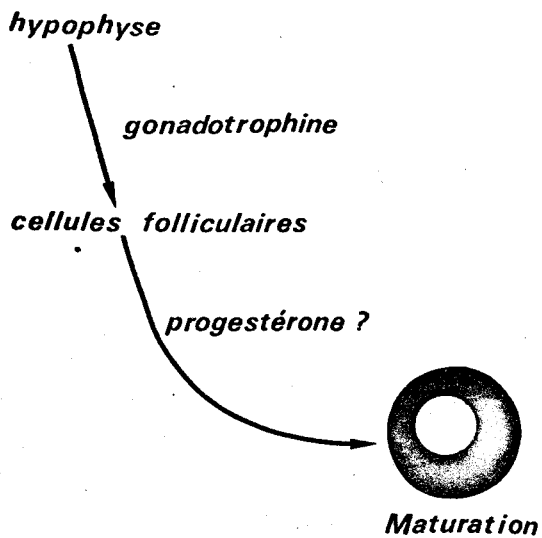
ECHINODERMES (Etoile de mer)



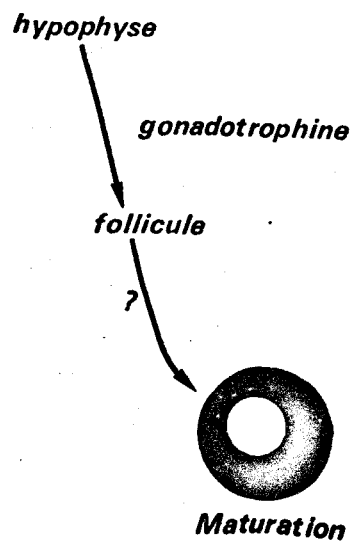
POISSONS (Téléostéens)



AMPHIBIENS



MAMMIFERES



#### 5.1.5.1. Annélides Polychètes

Le prostomium d'Arenicola marina renferme une substance réinitiatrice de la méiose (SRM) capable d'agir in vitro sur des ovocytes isolés (MEIJER (1976), MEIJER et DURCHON (1977)). Un extrait de prostomiums injectés dans la femelle mature déclenche la maturation et la ponte (HOWIE (1961 b, 1962 b, 1963)). La nature hormonale de cette SRM est très probable en raison de sa spécificité d'action (elle fait uniquement passer les ovocytes de taille maximale de prophase en métaphase), son origine précise (ganglions cérébroïdes), son action à très faible dose (0,005 prostomium/ml). Il s'agit probablement d'une neurohormone sécrétée dans la partie postérieure du cerveau (en effet, l'ablation de la partie antérieure du prostomium n'inhibe pas la maturation alors que l'ablation de la partie postérieure l'inhibe) ; d'autre part les homogénats de parties postérieures de prostomiums sont seuls capables de déclencher, par injection dans l'animal, la maturation et la ponte (HOWIE (1966)). L'existence de cellules neurosécrétrices a été mise en évidence chez l'arénicole (HOWIE (1977)) quoique HOWIE n'ait pas observé de sites précis d'accumulation et de relargage d'hormone dans le cerveau.

Le même système hormonal semble exister chez Arenicola cristata : l'extrait de système nerveux injecté dans l'animal déclenche la ponte de gamètes matures (D'ASARO et CHEN (1976)) et les extraits de systèmes nerveux d'A. cristata déclenchent la maturation in vitro d'ovocytes d'A. marina. Une comparaison avec d'autres systèmes hormonaux de contrôle de la maturation montre deux différences principales :

- 1) L'hormone gonadotrope des vertébrés ou d'échinodermes et sans doute des gastéropodes agit par l'intermédiaire d'un "relais cellulaire" (follicule) qui, lui, produit une seconde hormone ("second messenger hormonal"). Cette seconde substance agit directement sur la membrane de l'ovocyte et est donc le responsable réel de la réinitiation méiotique. Au contraire, l'ovocyte d'arénicole semble totalement dépourvu de cellules folliculaires (comme c'est généralement le cas chez les polychètes) et un lavage répété des ovocytes (pour éliminer le liquide coelomique et les quelques rares cellules coelomiques) n'empêche pas la maturation. Il semble donc que la SRM agisse directement sur l'ovocyte, sans intermédiaire cellulaire.
- 2) Les ovocytes d'arénicoles poursuivent leur maturation jusqu'en métaphase I alors que les ovocytes d'astéries et de vertébrés continuent leur méiose jusqu'à un stade plus avancé (ovule et Métaphase II, respectivement). L'origine de ce blocage en MI est inconnu. Il pourrait s'agir d'un blocage d'ordre métabolique ou d'un blocage provenant d'un facteur cytotatique analogue à celui qui existe chez l'amphibien (MASUI (1974); MEYERHOF et MASUI (1977)).

Le système hormonal de contrôle de la maturation ovocytaire de l'arénicole présente cependant de nombreux points communs avec celui des Echinodermes et des vertébrés :

- 1) Origine nerveuse de la SRM, GSS et Hormone gonadotrope. Les hormones qui déclenchent la maturation sont des neurosécrétions. Les facteurs externes qui agissent sur l'activité de ces cellules neurosécrétrices n'ont pas été déterminés.
- 2) Dans tous les groupes étudiés la maturation ovocytaire et l'ovulation sont deux phénomènes étroitement liés. Chez l'arénicole la ponte ne semble être qu'une conséquence de la maturation ovocytaire. Seuls les ovocytes en métaphase sont acceptés par les gonoductes, probablement à la suite du changement de surface associé à la maturation ou du changement de forme de l'ovocyte. Cette acceptation exclusive des ovocytes ayant subi leur maturation a été également notée chez les Siponcles.
- 3) La vitesse de réponse de l'ovocyte, isolé, à l'hormone est rapide : chez l'aplysie, la maturation est déclenchée au cours de la première heure d'incubation du fragment d'ovotestis dans l'extrait de ganglions viscéraux. Chez les étoiles de mer, la RVG commence 20 à 30 minutes après addition de l-Méthyladénine ; chez les amphibiens le délai de réponse varie selon l'espèce étudiée : 3-6 heures chez Xenopus, 6-10 heures chez Rana (BRACHET (1974) ; chez les mammifères il est également très variable.

Chez l'arénicole la RVG commence 30 à 35 minutes après le début de la stimulation hormonale.

Les cinétiques de maturation sont très semblables chez tous les animaux étudiés (déclenchement synchrone de la maturation dans toute la population ovocytaire après un certain délai après le début de la stimulation hormonale).

- 4) La courbe dose-réponse d'allure sigmoïde (Fig. 5) de la ARM est très analogue à celle que l'on observe chez l'étoile de mer (GUERRIER et DOREE (1975), les amphibiens (SCHUETZ (1972a) et les poissons (SUNDARARAJ et GOSWAMI (1970).

Le système hormonal de l'arénicole semble donc être un système hormonal classique quoique plus simple et très comparable à celui des autres systèmes connus de contrôle de la maturation ovocytaire.

D'autres espèces d'annélides pourraient présenter un système de contrôle hormonal de la maturation ovocytaire.

Des études préliminaires nous ont montré qu'un système hormonal analogue à celui de l'arénicole semble exister chez Sthenelais boa (Aphroditidae) ; en effet les ovocytes (bloqués en prophase dans le coelome) restent



en prophase lorsqu'ils sont incubés dans l'eau de mer mais subissent la maturation lorsqu'ils sont incubés dans un extrait de prostomium.

D'autre part, l'hormone déclenchant la ponte chez Nephtys hombergi (OLIVE (1976)) pourrait également stimuler la maturation ovocytaire de cette espèce. En effet, même si l'ovocyte ne subit la RVG que quelques minutes après son émission dans l'eau de mer, la maturation peut avoir été déclenchée plus tôt, dans l'animal (comme c'est le cas chez certaines espèces d'étoiles de mer où la ponte précède, de peu, la RVG induite par l'hormone inductrice de la méiose).

Dans ce cas l'hormone de réinitiation de la méiose de l'arénicole ne serait pas un cas unique chez les Annélides polychètes et ce type de contrôle de la maturation pourrait peut-être s'appliquer aux polychètes dont les ovocytes ne peuvent être fécondés en prophase et ne subissent pas de maturation "spontanée" dans l'eau de mer (par contact avec l'eau de mer ou par stimulation par des protéases).

#### 5.1.5.2. Mollusques Gastéropodes

L'existence d'un contrôle neurohormonal de la ponte a été mis en évidence chez divers gastéropodes :

- chez Aplysia le ganglion viscéral produit une hormone, l'ELH (Egg-laying Hormone) qui, par injection dans l'animal, déclenche la ponte (KUPFERMANN (1967), ARCH (1972 a, b, 1976); COGGESHALL (1970, 1972); COGGESHALL et al. (1966); PENG LOH et al. (1977); STRUMWASSER et al. (1968, 1969); TOEVS et al. (1966); SMOCK et al. (1977)).
- chez Busycon les extraits de système nerveux contiennent une substance, l'E.C.L.S. (Egg Capsule Laying Substance) qui, par injection, induit la formation des cordons de capsules d'oeufs (RAM (1977)).
- Chez Pleurobranchaea, une ELH a également été mise en évidence dans le ganglion pédieux et étudiée (DAVIS et al. (1974); RAM et al. (1977)).
- Une hormone similaire existerait chez Lymnaea (GERAERTS et al. (1976)).
- Chez Deroceras et Limax (TAKEDA (1977)), les homogénats de ganglions centraux déclenchent la ponte après injection dans l'animal.

Il semble donc que, de manière générale, chez les Gastéropodes, une hormone d'origine nerveuse provoque la ponte (et donc l'ovulation) à partir des gonades.

D'autre part la ponte peut être déclenchée chez Deroceras et Limax par divers stéroïdes (TAKEDA, sous presse). L'existence et la biosynthèse de stéroïdes dans la gonade d'Aplysia a été démontrée (LUPO di PRISCO

et FULGHERI (1975); LUPO di PRISCO et al. (1972, 1973); COLOMBO et BELBEDERE (1975)). L'analogie du système de contrôle chez la ponte des Gastéropodes (tentacule oculaire - ganglion central - gonade) avec le système hypothalamus - hypophyse - gonade des vertébrés a été soulignée par TAKEDA (sous presse).

Si le système endocrine de contrôle de la ponte a été bien étudié, les cellules cibles de ces hormones de ponte ont été très peu étudiées. Selon COGGESHALL (1970, 1972), l'ELH d'Aplysia agirait sur les cellules musculaires du follicule pour y déclencher les contractions nécessaires à l'ovulation.

Cette étude a montré que des extraits de système nerveux (ganglions viscéraux) sont capables d'induire la maturation d'ovocytes lorsque ceux-ci sont incubés en présence d'un élément ovarien. L'ovulation est également déclenchée in vitro à partir de fragments de gonades. D'autre part une expérience préliminaire, qu'il faudrait confirmer, semble montrer qu'une seconde substance capable de déclencher l'ovulation et la maturation apparaît après 2 heures d'incubation de fragments d'ovotestis dans un extrait de ganglions viscéraux.

La substance qui déclenche la maturation et l'ovulation d'ovocytes à partir de fragments d'ovotestis est très probablement l'E.L.H. (en raison de son origine précise et de son action). Dès lors l'E.L.H. pourrait agir directement sur l'ovocyte pour déclencher la maturation, ce qui nous semble peu probable ou bien elle induirait la formation et/ou la libération d'une seconde hormone par des cellules ovariennes (cellules folliculaires), qui, elle, agirait directement sur l'ovocyte pour déclencher la maturation (Fig. 17). Ce système serait, dès lors, analogue à celui des échinodermes et des vertébrés.

Signalons enfin que ARCH (1976) et COGGESHALL (1970) n'ont pas obtenu de déclenchement de ponte par la gonade d'Aplysia californica in vitro. Peut-être la ponte n'est-elle observable que sur les fragments d'ovotestis ou peut-être ces auteurs n'ont-ils pas attendu suffisamment longtemps (réponse au bout d'une heure seulement) ?

## 5.2. Maturation des ovocytes

Après avoir montré l'existence d'un système de contrôle hormonal de la maturation ovocytaire chez Arenicola et Aplysia et après les avoir comparés à ceux qui sont connus chez d'autres animaux, nous envisagerons les actions de ces hormones sur les cellules cibles, les ovocytes. Ces actions sont nombreuses et variées et montrent qu'une même hormone déclenche souvent, sur un même type cellulaire, un grand nombre de processus liés les uns aux autres ou indépendants. Le tableau suivant (Tabl. 13) résume les modifications que

peuvent subir les ovocytes au cours de la maturation déclenchée par une hormone (les modifications retrouvées chez l'arénicole sont soulignées par des tirets).

Tableau 13 - Modifications morphologiques, physiologiques et biochimiques que peuvent subir les ovocytes au cours de leur maturation induite par une hormone (les modifications trouvées chez l'arénicole sont soulignées par des tirets).

1) Mode d'action de l'hormone inductrice de la maturation.

- libération de  $Ca^{++}$  intracellulaire
- variation des taux de -SH/ -SS-
- variations des taux de nucléotides cycliques
- phosphorylations corticales
- apparition d'un facteur cytoplasmique de maturation (MPF, Maturation Promoting Factor)
- incorporation et métabolisme de l'hormone

2) Modifications morphologiques

- changement de forme de l'ovocyte
- rétraction des microvillosités
- modification de répartition et localisation d'organites cellulaires (polarité)
- formation du (des) globule(s) polaire(s)
- disparition de l'enveloppe nucléaire
- disparition du nucléole
- condensation des chromosomes
- formation du fuseau de maturation
- disparition des lamelles annelées

3) Modifications des propriétés de la membrane plasmique

- dépolarisation de la membrane plasmique
- stimulation de la pompe  $Na^+$ ,  $K^+$
- changements de perméabilités ioniques
- changements de perméabilité aux métabolites
- inhibition de la pinocytose (inhibition de l'incorporation de vitellogénine)

4) Modifications métaboliques et biochimiques

- modifications du métabolisme énergétique - respiration
- synthèse de DNA - apparition d'une DNA-polymérase
- synthèse de RNA
- synthèse de protéines
- synthèse d'histones
- phosphorylations d'histones
- activité protéolytique
- acquisition de la possibilité de polymérisation de la tubuline

5) Acquisition de la fertilisabilité

- limitation de la fixation des spermatozoïdes
- acquisition de la capacité de réaction corticale
- possibilité de blocage de la polyspermie
- formation du pronucleus femelle
- apparition d'un facteur de formation du pronucleus mâle (MPGF, Male Pronucleus Growth Factor)
- contractilité corticale

6) Second blocage de la méiose

- apparition d'un facteur cytotatique (CSF, Cytostatic Factor) de blocage en métaphase

Nous allons envisager les modifications observées chez l'arénicole et l'aplysie au cours de la maturation induite par l'hormone de réinitiation méïotique en les comparant avec celles observées chez d'autres animaux.

#### 5.2.1. Mode d'action intracellulaire de l'hormone inductrice de la maturation

La plupart des hormones peptidiques se lient à des récepteurs de la membrane plasmique et influencent des activités associées à la membrane plasmique, tels l'activité de l'adénylate cyclase ou le transport ionique (CATT et DUFAU (1977)). Il semble qu'il en soit de même pour les hormones inductrices de la maturation.

##### 5.2.1.1. Rôle de l'ion $Ca^{++}$ .....

Le rôle de l'ion calcium dans le déclenchement de la maturation ovocytaire par la SRM chez l'arénicole a été suggéré par deux types d'expériences:

1) Les modifications des perméabilités calciques ou le déséquilibre des concentrations en calcium par traitement par diverses drogues provoque la maturation de l'ovocyte. Ainsi: - la tétracaïne et la procaïne (inducteurs de maturation chez Chaetopterus (Annélide) (IKEGAMI et al. (1976)); inhibiteurs de maturation chez Sabellaria (PEAUCELLIER (1978)); procaïne, inhibitrice chez l'étoile de mer (MOREAU et al. (1978))) déclenchent la maturation de l'ovocyte d'arénicole.

- le D-600 et l'isoptine déclenchent la maturation de l'ovocyte de Sabellaria (PEAUCELLIER (1978)) et de Xenopus (SCHORDERET-SLATKINE et al. (1977)) mais le D-600 inhibe la maturation de l'ovocyte d'étoile de mer (MOREAU et al. (1978)). Ils déclenchent la maturation de l'ovocyte d'arénicole.

- le propranolol et l'oxprénolol induisent la maturation de l'ovocyte de Xenopus (SCHORDERET-SLATKINE et SCHORDERET (1976)); l'oxprénolol est également actif sur l'ovocyte de Sabellaria (PEAUCELLIER (1978)). Ces deux substances provoquent la maturation de l'ovocyte d'arénicole.

- le chlorure de lanthane déclenche la maturation des ovocytes de Sabellaria (PEAUCELLIER (1978)) et de Xenopus (SCHORDERET-SLATKINE et al. (1976)). Par contre, il inhibe la maturation de l'ovocyte d'étoile de mer induite par le  $CaCl_2$  mais non celle induite par la 1-Méthyladénine (MOREAU et al. (1978)). Il est actif sur l'ovocyte d'arénicole.

- L'absence de calcium dans l'eau de mer artificielle déclenche la maturation de l'ovocyte de Sabellaria (PEAUCELLIER (1977b)). Il en est de même pour l'ovocyte d'Arenicola. Peut-être cette absence de calcium se traduit-elle par un déséquilibre calcique qui provoque une augmentation passagère de la concentration intracellulaire de calcium, suffisante pour déclencher la maturation ?

- L'ionophore A 23187 ne déclenche pas la maturation des ovocytes d'étoile de mer, d'arénicole ou de Xénope (sauf, dans ce dernier cas, si le milieu extérieur est enrichi en ions divalents) mais il est efficace chez Urechis, Spisula, Nereis, Chaetopterus et Sabellaria (PEAUCELLIER (1977); BRACHET et DENIS-DONINI (1977); SCHUETZ (1974a)). Chez toutes ces espèces la fécondation est capable de déclencher la maturation, les facteurs qui déclenchent l'activation et la maturation sont confondus alors qu'ils sont distincts chez les espèces où maturation et fécondation sont séparées (dont l'arénicole).

2) Il semble que la fraction "membranaire" d'ovocytes d'arénicole puisse libérer du calcium sous l'action de l'extrait de prostomium, comme le montre l'expérience préliminaire réalisée avec l'aequorine. Ce résultat a également été obtenu avec le D-600, la tétracaïne et le DTT, trois drogues qui déclenchent la maturation chez l'arénicole.

Chez d'autres modèles (Annélides, Echinodermes, Poissons, Amphibiens, Mammifères) l'importance du calcium a été mise en évidence par quatre types d'expériences :

- modifications des concentrations extracellulaires de calcium ;
- emploi de substances agissant sur les sites calciques et la perméabilité au calcium ;
- injection de calcium dans l'ovocyte ;
- mesure directe des variations de concentrations intracellulaires en calcium.

Il paraît donc probable que le modèle de l'arénicole se rapproche des autres systèmes de contrôle de la maturation. La SRM pourrait donc agir sur l'ovocyte en y déclenchant une augmentation passagère de la concentration en calcium ionique libre dans le cortex de l'ovocyte. Cette brève variation de concentration serait suffisante pour déclencher tous les phénomènes liés à la maturation.

#### 5.2.1.2. Rôle des groupements -SH/-SS-

L'importance des groupements -SH/-SS- au cours de la maturation a été mise en évidence chez l'arénicole par l'emploi de deux substances réductrices de ponts disulfures, le D.T.T. et le B.A.L. Le D.T.T. provoque, en outre, une libération de calcium à partir de la fraction membranaire d'ovocytes, tout comme les extraits de prostomiums.

L'importance des groupes -SH/-SS- a été suggérée chez les étoiles de mer et les amphibiens par deux types d'expériences :

- emploi de substances agissant sur les groupements -SH et -SS-.

- mesure directe des variations de taux de -SH/-SS- dans l'ovocyte au cours de la maturation.

Il semble donc que le rapport -SH/-SS- soit important dans le contrôle hormonal de la maturation ovocytaire. On peut cependant se demander si les agents agissant sur les groupements -SH/-SS- ont une action physiologique spécifique ou s'ils agissent simplement par modification de perméabilités ioniques (ainsi les agents sulfhydriles peuvent provoquer un rapide relargage de  $Ca^{++}$  à partir du reticulum sarcoplasmique (ENDO (1977))). Il semblerait que les variations des taux -SH/-SS- soient directement liées avec l'ion  $Ca^{++}$ .

Le cas de l'arénicole semble s'intégrer avec les modèles déjà connus.

#### 5.2.2. Modifications morphologiques au cours de la maturation

Au cours de la maturation l'ovocyte subit des changements morphologiques importants qui peuvent être classés en modifications cytoplasmiques et modifications nucléaires.

Pendant la maturation, l'ovocyte d'arénicole subit un changement de forme important ; de même sa surface change d'aspect (rétraction des microvillosités du chorion). Il est possible que ces modifications morphologiques "externes" jouent un rôle important dans la ponte ; en effet seuls les ovocytes ayant subi leur maturation sont captés par les néphridies et pondus ; un mécanisme de "reconnaissance" de l'ovocyte en métaphase doit donc exister. Des modifications de surface ont été également observées au cours de la maturation de l'ovocyte d'étoile de mer (elles joueraient un rôle dans le blocage de la polyspermie (ROSENBERG et al. (1977))).

La rétraction des microvillosités du chorion de l'ovocyte d'Arénicole au cours de la maturation a été également observée chez les étoiles de mer, les poissons et les amphibiens. L'aplatissement de la membrane plasmique observé chez l'arénicole pourrait être lié à un arrêt de la pinocytose. Chez le xénope, en effet, l'aplatissement de la membrane plasmique est lié à une diminution de l'endocytose (HOLLAND et DUMONT (1975)) et la progestérone inhibe l'endocytose de vitellogénine. La rétraction des microvillosités est probablement importante pour le blocage de la

pinocytose, pour la modification de la surface du chorion et pour la séparation du chorion de la membrane plasmique (ce qui rend le soulèvement de la membrane de fécondation possible, comme chez les Amphibiens (SCHUETZ (1972 b))).

La vésicule germinative de l'ovocyte d'arénicole est percée de nombreux pores nucléaires, comme c'est le cas pour la vésicule germinative des ovocytes en fin de vitellogenèse. La RVG commence par une disparition progressive des pores nucléaires, comme chez Chaetopterus (MERRIAM (1961)) et les vertébrés. L'enveloppe nucléaire est entourée de microtubules en formation comme chez les amphibiens et les mammifères. Celle-ci se brise en divers endroits et c'est à ce moment qu'apparaît la basophilie de la région nucléaire (également observée dans l'ovocyte en maturation de Chaetopterus (MERRIAM (1961)) et de divers amphibiens (BRACHET (1974))). Le nucléole ne disparaît pas à un moment bien précis ; il semble qu'il puisse parfois rester intact jusqu'après la RVG.

La chromatine de l'ovocyte est extrêmement diffuse et décondensée ; en très peu de temps elle se condense fortement en petits chromosomes qui vont se disposer dans le fuseau de division méiotique. Les centrioles du fuseau sont petits et peu visibles (ils sont présents, contrairement à ce que l'on observe chez les Mammifères (SZOLLOSI et al. (1972))).

Au cours de la maturation, la chromatine passe en quelques dizaines de minutes, d'un stade très diffus à un stade très condensé. Le rôle des histones dans la structure de la chromatine (et, plus particulièrement, le rôle des histones H<sub>1</sub> dans la condensation des chromosomes) a été démontré. Une phosphorylation de l'histone H<sub>1</sub> semble liée à la condensation des chromosomes. L'extraction d'histones d'ovocytes d'arénicole a été réalisée par la méthode employée par VANHOUTTE-DURAND et al. (1977) ; malheureusement la fraction histones totales est souvent contaminée par des protéines basiques d'origine cytoplasmique. Ce problème a également été retrouvé chez l'arénicole lors de colorations histologiques spécifiques des histones par le vert solide, qui colore également le cytoplasme ovocytaire (COWDEN (1976)).

Chez l'aplysie l'ovocyte subit la maturation complète ; il émet 3 globules polaires (le 1er globule polaire se divise). Les caractéristiques morphologiques de la maturation de l'ovocyte in vitro sont identiques à celles décrites par JANSSENS et ELRINGTON (1904) sur les ovocytes ayant subi la maturation in vivo.

Deux caractéristiques nous semblent intéressantes : tout d'abord la présence de chromosomes très visibles dans la vésicule germinative,

qui semblent être des chromosomes lampbrush. D'autre part, au cours de la maturation, on observe une réorganisation de la répartition des organites cellulaires. L'ovocyte acquiert une polarité marquée qui jouera sans doute un rôle important dans l'embryogenèse.

### 5.2.3. Acquisition de la fertilisabilité

Les ovocytes appartenant au groupe B (Fig. 2) doivent subir une maturation avant la fécondation pour que celle-ci soit fructueuse et aboutisse à un développement embryonnaire normal. La maturation doit être commencée sinon terminée pour que l'ovocyte soit fécondable. Associée à la "maturation nucléaire" (reprise de la méiose) existe donc une "maturation cytoplasmique" (acquisition de la fertilisabilité). Celle-ci a fait l'objet de nombreuses études mais le terme de "fertilisabilité" est resté ambigu. En effet l'"acquisition de la fertilisabilité" peut se situer à plusieurs niveaux (fixation des spermatozoïdes, pénétration des spermatozoïdes, réaction corticale, formation normale du pronucleus mâle, segmentation normale du zygote).

L'ovocyte d'arénicole fait partie du groupe B : l'ovocyte prélevé dans le coelome (et donc en prophase) ne peut être fécondé avec succès ; par contre les ovocytes ayant subi la maturation (et donc en métaphase I) sont fécondables et se développent normalement (HOWIE (1961b); PIRLOT, (1933))

La fécondation de l'oeuf d'arénicole est assez classique ; elle correspond aux descriptions faites chez Arenicola cristata par OKADA (1941). L'absence de rupture des granules corticaux est assez particulière ; néanmoins elle s'observe également chez certains invertébrés (Urechis, Mytilus). L'acquisition de la fertilisabilité semble donc étroitement liée à la maturation.

1) L'ovocyte en prophase semble capable de fixer les spermatozoïdes comme l'ovocyte ayant subi la maturation. La possibilité de pénétration n'a pas été étudiée. Cinq minutes après l'addition de l-Méthyladénine, les ovocytes de Pisaster (Etoile de mer) fixent moins de spermatozoïdes que les ovocytes non traités par la l-Méthyladénine ; ceci n'a pas été confirmé chez Patiria (ROSENBERG et al. (1977))

2) Le soulèvement de la membrane de fécondation de l'ovocyte d'arénicole peut être déclenché par fécondation, ou par activation parthénogénétique par le glycérol 1 M ou par l'ionophore A 23187, activateur universel d'ovocytes (STEINHARDT et al. (1974)). Cependant ce soulèvement de la membrane de fécondation ainsi que l'émission des globules polaires ne devient possible



que 15-20 minutes après la RVG, comme le montrent les études de cinétiques simultanées de maturation et d'activation. Il semble que ce moment correspond à celui où la rétraction des microvillosités est achevée (et donc où le détachement de la membrane de fécondation de la membrane plasmique semble réalisable).

Ces résultats correspondent à ce qui est connu chez l'étoile de mer (PARPART (1961); HIRAI et al. (1971); STEVENS (1969)), les Poissons (IWAMATSU (1965a, b)), les amphibiens (HANOCQ et al. (1974)) et les Mammifères (USUI et YANAGIMACHI (1976)) où la rupture des alvéoles corticaux et le soulèvement de la membrane de fécondation ne deviennent possibles qu'au cours de la maturation. La possibilité d'activation semble coïncider avec le moment de séparation de l'enveloppe vitelline de la membrane plasmique (BELANGER et SCHUETZ (1975); HOLLINGER et SCHUETZ (1976)). Cette possibilité de séparation s'acquiert au cours de la maturation, probablement par rétraction des microvillosités (SCHUETZ (1972)).

L'acquisition de la possibilité d'être activé, qui est indépendante de la vésicule germinative, (réaction corticale et sa conséquence physiologique, blocage de la polyspermie) pourrait provenir :

- d'une augmentation de la disponibilité des ions divalents.
- d'une augmentation de la sensibilité des alvéoles corticaux et/ou de la surface ovocytaire à ces ions.
- d'une séparation mécanique du chorion de la membrane plasmique (par rétraction des microvillosités).
- de la propagation d'une "onde" de rupture des alvéoles corticaux (et de soulèvement de la membrane de fécondation) (BELANGER et SCHUETZ (1975))

Il est possible que l'acquisition de la possibilité d'activation chez l'arénicole s'accompagne de la possibilité de blocage de la polyspermie.

VI - RESUME

Chez Arenicola marina (Annélide Polychète) les ovocytes sont bloqués au stade de la première prophase de méiose jusqu'à la ponte. Les ovocytes isolés dans de l'eau de mer restent à ce stade de la vésicule germinative. Au contraire, les ovocytes incubés dans un extrait de prostomiums (surnageant d'homogénat de prostomiums centrifugé) subissent la maturation: la vésicule germinative se rompt et un fuseau de division méiotique apparaît. Les ovocytes restent bloqués à ce stade de la première métaphase de méiose jusqu'à la fécondation. Il semble donc que les ganglions cérébroïdes contiennent une substance capable de réinitier la méiose in vitro. Cette substance n'a été trouvée que dans les cerveaux d'animaux matures, à des concentrations identiques chez les mâles et les femelles; elle agit à de très faibles doses (0,005 prostomium/ml) et les ovocytes répondent de façon très synchrone (100 % de rupture de la vésicule germinative 35 minutes après addition de l'extrait de prostomium; la maturation a lieu dans les 5 minutes pour toute la population ovocytaire).

La substance réinitiatrice de la méiose induit de nombreux changements morphologiques au niveau de l'ovocyte: changements généraux (forme), corticaux (rétraction des microvillosités, membrane plasmique), cytoplasmiques (répartition d'organites cellulaires) et nucléaires (rupture de la vésicule germinative, condensation des chromosomes, formation d'un fuseau de division méiotique). Une étude cinétique de ces changements morphologiques a été réalisée.

L'importance du calcium dans la maturation de l'ovocyte a été étudiée en utilisant différentes drogues agissant sur la perméabilité membranaire au  $Ca^{++}$  et modifiant la concentration intracellulaire de  $Ca^{++}$ . La tétracaïne, la procaine, le D-600, l'Isoptine, le propranolol, l'oxprénolol et le chlorure de lanthane sont tous capables d'induire la maturation ovocytaire, de même qu'un traitement par l'eau de mer artificielle sans calcium. L'ionophore A 23187 est sans effets. Ces résultats laissent à penser que l'hormone cérébrale pourrait agir sur l'ovocyte en régulant, probablement augmentant, la concentration intracellulaire en calcium ionique libre, comme cela a été suggéré pour les ovocytes d'autres animaux.

L'importance des groupes -SH/-SS- dans la réinitiation de la méiose est suggéré par le fait que le Dithiothréitol et le 2,3-dimercaptopropanol, deux agents réducteurs de ponts disulfures, induisent la maturation ovocytaire.

L'ovocyte en prophase n'est ni fécondable ni activable parthénogénétiquement (par l'ionophore A 23187 ou le Glycérol 1 M). Au contraire, l'ovocyte en métaphase est fécondable et activable parthénogénétiquement. L'ovocyte acquiert sa fertilisabilité au cours de la maturation; elle semble liée à la rétraction des microvillosités. Le contact et la pénétration des spermatozoïdes ont été étudiés d'un point de vue morphologique.

Chez Aplysia punctata (Mollusque Gastéropode) les ovocytes sont bloqués au stade de la première prophase de méiose jusqu'à l'ovulation. Les fragments d'ovotestis isolés dans l'eau de mer ne subissent pas de modifications. Au contraire, s'ils sont incubés dans un extrait de ganglions viscéraux (surnageant d'homogénat de ganglions viscéraux centrifugé) on observe l'ovulation d'ovocytes qui subissent la maturation jusqu'au stade d'ovules. Le ganglion viscéral produit donc une hormone (Egg-Laying Hormone ?) capable d'induire in vitro l'ovulation et la maturation d'ovocytes à partir de fragments d'ovotestis. Divers arguments laissent à penser que cette hormone pourrait déclencher la maturation par l'intermédiaire d'une seconde substance d'origine ovarienne, qui serait le véritable inducteur de la maturation ovocytaire.

## SUMMARY

In Arenicola marina (Annelida, Polychaeta) the oocytes are arrested in the first prophase stage of meiosis until spawning occurs. When isolated oocytes are incubated in vitro in sea-water they remain at that stage (germinal vesicle). At the contrary, when they are incubated in a brain extract (supernatant of the centrifuged brain homogenate), the germinal vesicle breaks down and the first meiotic spindle is formed; the oocytes remain arrested in the first metaphase until fertilization. This suggests that the brain contains a substance able to induce oocyte maturation in vitro. This substance has only been found in the brain of mature animals, at similar concentrations in males and females. It acts at very low doses (0.005 brain/ml) and the oocytes seem to respond in a very synchronous way (100 % of germinal vesicle breakdown 35 minutes after addition of the brain extract; oocyte maturation occurs within 5 minutes in the whole oocyte population).

The meiosis reinitiating substance induces numerous morphological changes in the oocytes: general (shape), cortical (microvilli retraction, plasma membrane changes), cytoplasmic (repartition of oocyte constituents) and nuclear modifications (germinal vesicle breakdown, chromosome condensation, formation of a meiotic spindle). A kinetic study of these morphological modifications has been performed.

The importance of calcium in oocyte maturation has been investigated by using different drugs known to act on membrane calcium permeability and to modify intracellular free calcium concentration. Tetracaine, procaine, D-600, Verapamil (Isoptin), propranolol, oxprenolol and lanthanum chloride are all able to induce oocyte maturation, as well as a short treatment with calcium free sea-water. Ionophore A23187 does not induce oocyte maturation. This suggests that the brain hormone may act on the oocyte by regulating, probably increasing, the intracellular free calcium concentration, as it has been proposed for oocytes of other animals.

The importance of -SH/-SS- in meiosis reinitiation is suggested by the fact that dithiothreitol and 2,3-dimercaptopropanol, two disulfide bond reducing agents, both induce oocyte maturation.

The prophase arrested oocytes can neither be fertilized nor parthenogenetically activated (ionophore A 23187 or glycerol 1 M). At the contrary the metaphase oocytes can be fertilized and parthenogenetically activated. Fertilisability thus appears during oocyte maturation; it seems to be linked to microvilli retraction. The early contact and penetration of spermatozoans have been studied by scanning electron microscope.

In Aplysia punctata (Mollusca, Gasteropoda) the oocytes are arrested in the first prophase stage of meiosis until ovulation occurs. Pieces of ovotestis incubated in vitro in sea-water don't undergo any modification. On the other hand, when they are incubated in a visceral ganglion extract (supernatant of the the centrifuged visceral ganglion homogenate), ovulation occurs and oocytes undergo maturation until the ovum stage (3 polar bodies). The visceral ganglion thus produces a hormone (Egg-Laying Hormone ?) which is able to induce ovulation and oocyte maturation in vitro from isolated ovotestis fragments. Several experiments suggest that this hormone might induce oocyte maturation through a second substance, produced in the ovotestis, which would be the true maturation inducing substance.

VII - BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON, D.T., 1972a : The development of Hemimetabolous insects. In "Developmental Systems : insects". S.J. COUNCE et C.H. WADDINGTON, eds, vol. I : 95-163.
- ANDERSON, D.T., 1972b : The development of Holometabolous insects. In "Developmental Systems : insects". S.J. COUNCE et C.H. WADDINGTON, eds, vol. I : 165-242.
- ARCH, S., 1972a : Polypeptide secretion from the isolated parietovisceral ganglion of Aplysia californica. J. Gen. Physiol. 59 : 47-59.
- ARCH, S., 1972b : Biosynthesis of the egg-laying hormone (ELH) in the bag cell neurons of Aplysia californica. J. Gen. Physiol. 60 : 102-119.
- ARCH, S., 1976 : Neuroendocrine regulation of egg laying in Aplysia californica. Amer. Zoologist 16 : 167-175.
- BELANGER, A.M. et A.W. SCHUETZ, 1975 : Precocious induction of activation responses in amphibian oocytes by divalent ionophore A 23187. Dev. Biol. 45 : 378-381.
- BERLIND, A., 1977 : Cellular dynamics in invertebrate neurosecretory systems. Int. Rev. Cytol. 49 : 171-251.
- BERN, H.A., 1977 : Some possible contributions of comparative endocrinology to mammalian and human endocrinology. Zool. Mag. (Tokyo) 86 : 1 - 9.
- BRACHET, J., 1974 : Le contrôle de la maturation chez les ovocytes d'Amphibiens. Ann. Biol. 13 : 403-434.
- BRACHET, J. et S. DENIS-DONINI, 1977 : Effets de divers agents (ionophore du  $Ca^{++}$  et du  $K^+$ , organomercuriels, dithiols, colchicine et cytochalasine B) sur la maturation et la différenciation sans clivage chez l'oeuf de Chétopète. C. R. Acad. Sci. Paris 284 : 1091-1096.
- BRENNING, U., 1965 : Beiträge zum Gonadenzyklus von Arenicola marina (L.) (Annelida, Polychaeta) im Raum der Wismar-Bucht. Wissenschaftl. Zeitschr. Univ. Rostock 14 : 633-643.
- CATT, K.J. et M.L. DUFAU, 1977 : Peptide hormone receptors. Ann. Rev. Physiol. 39 : 529-557.
- CLARK, T.G. et H. KANATANI, 1975 : Effect of some inhibitors of proteolytic enzymes on maturation of starfish oocytes. Biol. Bull. 149 : 423.
- COGGESHALL, R.E., 1970 : A cytologic analysis of the bag cell control of egg laying in Aplysia. J. Morph. 132 : 461-486.
- COGGESHALL, R.E., 1972 : The muscle cells of the follicle of the ovotestis in Aplysia as the probable target organ for bag cell extract. Amer.

- Zoologist 12 : 521-523.
- COGGESHALL, R.E., E.R. KANDEL, I. KUPFERMANN et R. WAZIRI, 1966 : A morphological and functional study on a cluster of identifiable neurosecretory cells in the abdominal ganglion of Aplysia californica. J. Cell Biol. 31 : 363-368.
- COLOMBO, L. et P. COLOMBO-BELVEDERE, 1975 : Gonadal location of the enzymes steroid 11 $\beta$  and 21- hydroxylases. Boll. Zool. 42 : 263-269.
- COWDEN, R.R., 1976 : Cytochemistry of oogenesis and early embryonic development. Amer. Zoologist 16 : 363-374.
- D'ASARO, C.N. et H.C.K. CHEN, 1976 : Lugworm aquaculture. Florida Sea Grant Program, Report n° 16 : 1-114.
- DAVIS, W.J., G.P. MPITSOS et J.M. PINNEO, 1974 : The behavioral hierarchy of the mollusk Pleurobranchaea. II. Hormonal suppression of feeding associated with egg laying. J. Comp. Physiol. 90 : 225-243.
- DOREE, M. et P. GUERRIER, 1975 : Site of action of 1-methyladenine in inducing oocyte maturation in starfish. Kinetic evidence of receptors localized on the cell membrane. Exp. Cell Res. 96 : 296-300.
- DOREE, M., M. MOREAU et P. GUERRIER : Hormonal control of meiosis ; in vitro induced release of calcium ions from the plasma membrane in starfish oocytes. Sous presse.
- DUNCAN, A., 1959 : Local races in lugworms (Arenicola marina (L.)). Nature 184 : 71-72.
- DUNCAN, A., 1960 : The spawning of Arenicola marina (L.) in the British isles. Proc. Zool. Soc. Lond. 134 : 137-156.
- DURCHON, M., 1972 : Actions hormonales au cours de la maturation sexuelle chez les Annélides Polychètes. In "Hormones et Différenciation Sexuelle chez les Invertébrés", Cours et Documents de Biologie, Vol. 3, GORDON et BREACH, (E. WOLF, ed.).
- ENDO, M., 1977 : Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol. Rev. 57 : 71-108.
- FRONTALI, N. et H. GAINER, 1977 : Peptides in invertebrate nervous systems. In "Peptides in neurobiology" (H. GAINER, ed.), Plenum Press, Ch. 10 : 259-294.
- GALL, J.G., 1966 : Techniques for the study of lampbrush chromosomes. In "Methods in cell physiology", vol. II, P.M. PRESCOTT, ed., Academic Press : 37-60.
- GALLIEN, L., 1958 : Problèmes et concepts de l'embryologie expérimentale, GALLIMARD, 586 pp.
- GERAERTS, W.P.M. et S. BOHLKEN, 1976 : The control of ovulation in the hermaphroditic freshwater snail Lymnaea stagnalis by the neurohormone of the caudodorsal cells. Gen. Comp. Endocrinol. 28 : 350-357.
- GIESE, A.C. et J.S. PEARSE, 1974 : Introduction : general principles. In "Reproduction of Marine Invertebrates", vol. I : 1-49.

- GOLDING, D.W., 1974 : A survey of neuroendocrine phenomena in non-arthropod invertebrates. Biol. Rev. 49 : 161-224.
- GUERRIER, P. et M. DOREE, 1975 : Hormonal control of reinitiation of meiosis in starfish. The requirement of 1-methyladenine during nuclear maturation. Dev. Biol. 47 : 341-348.
- GUERRIER, P., M. MOREAU et M. DOREE, 1977 : Inhibition de la réinitiation de la méiose des ovocytes de Xenopus laevis par trois antiprotéases naturelles, l'antipaine, la chymostatine et la leupeptine. C. R. Acad. Sci. Paris 284 : 317-319.
- GUERRIER, P., M. MOREAU et M. DOREE, 1978 : Control of meiosis reinitiation in starfish : calcium ion as the primary effective trigger. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 18, sous presse.
- HALES, C.N., A.K. CAMPBELL, J.P. LUZIO et K. SIDDLER, 1977 : Calcium as a mediator of hormone action. Bioch. Soc. Trans., 569th Meeting, vol. 5 : 866-872.
- HANOCQ, J., E. BALTUS et G. STEINERT, 1974 : Effets de deux ionophores du calcium sur les oeufs de Xenopus laevis. C.R. Acad. Sci. Paris 279 : 2111-2114.
- HILLENSJÖ, T., 1976 : Oocyte maturation and glycolysis in isolated preovulatory follicles of PMS-injected immature rats. Acta Endocr. (KBH) 82 : 809-830.
- HIRAI, S., J. KUBOTA et H. KANATANI, 1971 : Induction of cytoplasmic maturation by 1-methyladenine in starfish oocytes after removal of the germinal vesicle. Exp. Cell Res. 68 : 137-143.
- HOLLAND, C.A. et J.N. DUMONT, 1975 : Oogenesis in Xenopus laevis (DAUDIN). IV. Effects of gonadotropin, estrogen and starvation on endocytosis in developing oocytes. Cell Tiss. Res. 162 : 177-184.
- HOLLINGER, T.G. et A.W. SCHUETZ, 1976 : "Cleavage" and cortical granule breakdown in Rana pipiens oocytes induced by direct microinjection of calcium. J. Cell Biol. 71 : 395-401.
- HOWIE, D.I.D., 1961a : The spawning of Arenicola marina (L.). II. Spawning under experimental conditions. J. mar. biol. Ass. U.K. 41 : 127-144.
- HOWIE, D.I.D., 1961b : The spawning of Arenicola marina (L.). III. Maturation and shedding of the ova. J. mar. biol. Ass. U.K. 41 : 771-783.
- HOWIE, D.I.D., 1961c : Spawning mechanisms in the male lugworm. Nature 192 : 1100-1101.
- HOWIE, D.I.D., 1962a : An analysis of the spawning mechanism in Arenicola marina L. Rep. Challenger Soc. 3.
- HOWIE, D.I.D., 1962b : Neurosecretion in relation to spawning and maturation of the gametes in Arenicola marina L. Gen. Comp. Endocrinol. 2 : 624.
- HOWIE, D.I.D., 1963 : Experimental evidence for the humoral stimulation of ripening of the gametes and spawning in the polychaete Arenicola marina (L.). Gen. Comp. Endocrinol. 3 : 660-668.

- HOWIE, D.I.D., 1965 : Problems relating to the site of secretion of the maturation hormone in the lugworm, Arenicola marina, L. Gen. Comp. Endocrinol. 5 : 686-687.
- HOWIE, D.I.D., 1966 : Further data relating to the maturation hormone and its site of secretion in Arenicola marina LINNAEUS. Gen. Comp. Endocrinol. 6 : 347-361.
- HOWIE, D.I.D., 1977 : On the fine structure and distribution of secretory cells in the supraoesophageal ganglion of the lugworm (Arenicola marina L.). Gen. Comp. Endocrinol. 31 : 350-363.
- IKEGAMI, S., N. HONJI et M. YOSHIDA, 1978 : Light-controlled production of spawning-inducing substance in jelly fish ovary. Nature 272 : 611-612.
- IKEGAMI, S., Y. KAMIYA et H. SHIRAI, 1976 : Characterization and action of meiotic inhibitors in starfish ovary. Exp. Cell Res. 103 : 233-239.
- IKEGAMI, S., T.S. IKADA et S.S. KOIDE, 1976 : On the role of calcium ions in oocyte maturation in the Polychaete Chaetopterus pergamentaceus. Dev., Growth and Differentiation 18 : 33-43.
- IWAMATSU, T., 1965a : On fertilizability of pre-ovulation eggs in the medaka, Oryzias latipes. Embryologia 8 : 327-336.
- IWAMATSU, T., 1965b : A further study on fertilizability of fish oocytes. Annotn. Zool. Jap. 38 : 190-197.
- IWATA, K.S., 1958 : Mechanism of egg maturation in Mytilus edulis. Biol. J. Okayama Univ. 1 : 1-11.
- JALABERT, B., 1975 : Modulation par différents stéroïdes non maturants de l'efficacité de la 17 $\alpha$ hydroxy-20 $\beta$ dihydroprogestérone ou d'un extrait gonadotrope sur la maturation intrafolliculaire in vitro des ovocytes de la truite arc-en-ciel Salmo gairdnerii. C. R. Acad. Sci. Paris 281 : 811-814.
- JANSSENS, F.A. et G.A. ELRINGTON, 1964 : L'élément nucléinien pendant les divisions de maturation dans l'oeuf de l'Aplysia punctata. La Cellule 21 : 317-326.
- KANATANI, H., 1973 : Maturation-inducing substance in starfishes. Int. Rev. Cytol. 35 : 253-298.
- KANATANI, H., 1975 : Maturation-inducing substances in Asteroid and Echinoid oocytes. Amer. Zool. 15 : 493-505.
- KANATANI, H. et M. OHGURI, 1970 : Effect of gonad extract on oocyte maturation in the starfish, Asterias amurensis. Zool. Mag. 79 : 58-59.
- KIRSCHNER, et CHAMBERS, 1970 : J. Cell Physiol. 76 : 23-36.

- KUPFERMANN, I., 1967 : Stimulation of egg laying : possible neuroendocrine function of bag cells of abdominal ganglion of Aplysia californica. Nature 216 : 814-815.
- LINDNER, H.R., A. AMSTERDAM, Y. SALOMON, A. TSAFRIRI, A. NIMROD, S.A. LAMPRECHT, U. ZOR et Y. KOCH, 1977 : Intraovarian factors in ovulation : determinants of follicular response to gonadotrophins. J. Reprod. Fert. 51 : 215-235.
- LINDNER, H.R., A. TSAFRIRI, M.E. LIEBERMAN, U. ZOR, Y. KOCH, S. BAUMINGER et A. BARNEA, 1974 : Gonadotropin action on cultured Graafian follicles : induction of maturation division of the Mammalian oocyte and differentiation of the luteal cell. Rec. Progr. Hormone Res. 30 : 79-138.
- LUPO DI PRISCO, C. et F. DESSI'FULGHERI, 1975 : Alternative pathways of steroid biosynthesis in gonads and hepatopancreas of Aplysia depilans. Comp. Biochem. Physiol. 50 B : 191-195.
- LUPO DI PRISCO, C., F. DESSI'FULGHERI et M. TOMASUCCI, 1973 : Identification and biosynthesis of steroids in the marine mollusc Aplysia depilans. Comp. Biochem. Physiol. 45 B : 303-310.
- LUPO DI PRISCO, C., F. DESSI, M. TOMASUCCI et C. BASILE, 1972 : Biosynthesis of cholesterol and steroid hormones in gonads and hepatopancreas of Aplysia depilans. Gen. Comp. Endocrinol. 18 : 605.
- LUYKX, P., 1974 : The organization of meiotic chromosomes. In "The Cell Nucleus" vol. II, H. BUSCH, ed., Academic Press : 163-207.
- MASUI, Y., 1974 : A cytostatic factor in amphibian oocytes : its extraction and partial characterization. J. Exp. Zool. 187: 141-147.
- MEIJER, L., 1976 : Contrôle de la "maturation" des gamètes chez Arenicola marina LINNE (Annélide Polychète). D.E.A., juin 1976, 43 pp.
- MEIJER, L. et M. DURCHON, 1977 : Contrôle neurohormonal de la maturation oocytaire chez Arenicola marina (Annélide Polychète). C. R. Acad. Sci. Paris 285 : 377-380.
- MERRIAM, R.W., 1961 : Nuclear envelope structure during cell division in Chaetopterus egg. Exp. Cell Res. 22 : 93-107.
- MEYERHOF, P.G. et Y. MASUI, 1977 : Calcium and magnesium control of cytostatic factors from Rana pipiens oocytes which cause metaphase and cleavage arrest. Dev. Biol. 61 : 214-229.
- MOREAU, M., P. GUERRIER, M. DOREE et C.C. ASHLEY, 1978 : 1-Methyladenine induced release of intracellular calcium triggers meiosis in starfish oocytes. Nature 5650: 251-253.
- NAKAMURA, M. et I. YASUMASU, 1974 : Mechanism for increase in intracellular concentration of free calcium in fertilized sea urchin egg. A method for estimating intracellular concentration of free calcium. J. Gen. Physiol. 63 : 374-388.



- OKADA, K., 1941 : The gametogenesis, the breeding habits and the early development of Arenicola cristata STIMPSON, a tubicolous polychaete. Sci. Rep. Tôhoku Imp. Univ., ser. IV, 16 : 99-145.
- OZON, R., R. BELLE, A. CARTAUD, J. MAROT, O. MULNER et C. THIBIER-FOUCHET, 1976 : Mechanism of action of progesterone in amphibian oocyte. Excerpta Med. Int. Congr. Ser. 402, Proc. V Int. Congress Endocrinol. 1 : 346-350.
- PARPART, A.K., 1961 : Cortical granule extrusion during maturation of the egg of Asterias forbesi. Biol. Bull. 121 : 376.
- PAYS, A., E. HUBERT et J. BRACHET, 1977 : A comparison between organomercurial- and progesterone-induced maturation in Amphibian oocytes. Different. 8 : 79-95.
- PEAUCELLIER, G., 1977a : Initiation of meiotic maturation by specific proteases in oocytes of the polychaete Annelid Sabellaria alveolata. Exp. Cell Res. 106 : 1-14.
- PEAUCELLIER, G., 1977b : Mise en évidence du rôle du calcium dans la réinitiation de la méiose des ovocytes de Sabellaria alveolata (L.) (Annélide Polychète). C. R. Acad. Sci. 285 : 913-915.
- PEAUCELLIER, G., 1978 : Membrane acting drugs and meiosis reinitiation in Sabellaria alveolata (Polychaet Annelid). Sous presse.
- PENG LOH, Y., Y. SARNE et H. GAINER, 1975 : Heterogeneity of proteins synthesized, stored, and released by the bag cells of Aplysia californica. J. Comp. Physiol. 100 : 283-295.
- PINCUS, et ENZMANN, 1935 : The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. J. exp. Med. 62 : 665-675.
- PIRLOT, J.M., 1933 : La ponte de l'Arenicola marina LINNE à la côte belge. Bull. Mus. Hist. Nat. Belgique 9 : 1-7.
- RAM, J.L., 1977 : Hormonal control of reproduction in Busycon : laying of egg capsules caused by nervous system extracts. Biol. Bull. 152 : 221-232.
- RAM, J.L., S.R. SALPETER et W.J. DAVIS, 1977 : Pleurobranchaea egg-laying hormone : localization and partial purification. J. Comp. Physiol. 119 : 171-194.
- RASMUSSEN, H., 1977 : Calcium and cyclic nucleotides as universal second messengers. Cell Tissue Interact. 32 : 243.
- RASMUSSEN, H. et D.B.P. GOODMAN, 1977 : Relationship between calcium and cyclic nucleotides in cell activation. Physiol. Rev 57 : 421-509.
- RHOADES, M.M., 1961 : Meiosis. In "The cell, biochemistry, physiology, morphology", vol. III, "Meiosis and Mitosis", Academic Press : 1-75.

- RICE, M.E., 1966 : Thesis, Univ. Washington, Seattle. Cited in "Reproduction of Marine Invertebrates", vol. II, A.C. GIESE et J.S. PEARSE, eds, Academic Press : 67-127.
- ROSENBERG, M.P., R. HOESCH et H.H. LEE, 1977 : The relationship between 1-methyladenine induced surface changes and fertilization in starfish oocytes. *Exp. Cell Res.* 107 : 239-245.
- SCHORDERET-SLATKINE, S. et M. SCHORDERET, 1976 : Maturation in vitro de l'ovocyte de Xenopus laevis sous l'effet d'agents pharmacologiques du type propranolol. *C. R. Acad. Sci. Paris* 282 : 1733-1736.
- SCHORDERET-SLATKINE, S., M. SCHORDERET et E.-E. BAULIEU, 1976 : Initiation of meiotic maturation in Xenopus laevis oocytes by lanthanum. *Nature* 262 : 289-290.
- SCHORDERET-SLATKINE, S., M. SCHORDERET et E.-E. BAULIEU, 1977 : Progesterone-induced meiotic reinitiation in vitro in Xenopus laevis oocytes. A role for the displacement of membrane-bound calcium. *Differentiation* 9 : 67-76.
- SCHUETZ, A.W., 1969 : Oogenesis : processes and their regulation. *Adv. Reprod. Physiol.* 4 : 99-148.
- SCHUETZ, A.W., 1972a : Hormones and follicular functions. In "Oogenesis" (J.D. BIGGERS et A.W. SCHUETZ, eds) ; University Park Press, Baltimore : 479-511.
- SCHUETZ, A.W., 1972b : Induction of structural alterations in the preovulatory amphibian ovarian follicle by hormones. *Biol. Reprod.* 6 : 67-77.
- SCHUETZ, A.W., 1974a : Induction of nuclear breakdown and meiosis in Spisula solidissima oocytes by calcium ionophore. *J. Exp. Zool.* 191 : 433-440.
- SCHUETZ, A.W., 1974b : Role of hormones in oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 10 : 150-178.
- SCHUETZ, A.W., 1977 : Induction of oocytic maturation and differentiation : mode of progesterone action. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 286 : 408-420.
- SMOCK, T. et S. ARCH, 1977 : A cytochemical study of the bag cell organs of Aplysia californica. *J. Histochem. Cytochem.* 25 : 1345-1350.
- STEINHARDT, R.A., D. EPEL, E.J. CARROLL et R. YANAGIMACHI, 1974 : Is calcium ionophore a universal activator for unfertilized eggs ? *Nature* 252 : 41-43.
- STEVENS, M., 1970 : Procedures for induction of spawning and meiotic maturation of starfish oocytes by treatment with 1-methyladenine. *Exp. Cell Res.* 59 : 482-484.
- STRUMWASSER, F., J.W. JACKLET et R.B. ALVAREZ, 1968 : Behavioral egg-laying induced by extracts of the parieto-visceral ganglion in Aplysia. *Proc. 24th Int. Congr. Physiol. Sci.* : 240.

- STRUMWASSER, F., J.W. JACKLET et R.B. ALVAREZ, 1969 : A seasonal rhythm in the neural extract induction of behavioral egg-laying in Aplysia. Comp. Biochem. Physiol. 29 : 197-206.
- SUNDARARAJ, B.I. et S.V. GOSWAMI, 1970 : In vivo and in vitro induction of maturation and ovulation in oocytes of the catfish, Heteropneustes fossilis (BLOCH), with protein and steroid hormones. Excerpta Med. Int. Congr. Ser. N° 219, Hormonal steroids, 3rd Int. Congress, Hamburg : 966-975.
- SZOLLOSI, D., P. CALARCO et R.P. DONAHUE, 1972 : Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. J. Cell Sci. 11 : 521-541.
- TAKEDA, N., 1977 : Stimulation of egg-laying by nerve extracts in slugs. Nature 267 : 513-514.
- TAKEDA, N., 197 : Induction of egg-laying by steroid hormones in slugs. Gen. Comp. Endocrinol., sous presse
- THALER, M.M., M.C.L. COX et C.A. VILLEE, 1969 : Isolation of nuclei from sea urchin eggs and embryos. J. Cell Biol. 42 : 846-850.
- THIERY, J.-P., 1967 : Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines au microscope électronique. J. Microscopie 6 : 987-1018.
- THOMPSON, T.E. et A. BEBBINGTON, 1969 : Structure and function of the reproductive organs of three species of Aplysia (Gastropoda : Opisthobranchia). Malacologia 7 : 347-380.
- TOEVS, L.A. et R.W. BRACKENBURY, 1969 : Bag cell - specific proteins and the humoral control of egg laying in Aplysia californica. Comp. Biochem. Physiol. 29 : 207-216.
- UNGAR, F., R. GUNVILLE, B.I. SUNDARARAJ et S.V. GOSWAMI, 1977 : Formation of 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-one in the ovaries of catfish, Heteropneustes fossilis (BLOCH). Gen. Comp. Endocrinol. 31 : 53-59.
- VANHOUTTE-DURAND, G., J. MIZON, P. SAUTIERE et G. BISERTE, 1977 : Histones from gonads of the star-fish Asterias rubens. Comp. Biochem. Physiol. 57 B : 121-126.
- WALLEY, L.J., F. WHITE et K.M. BRANDER, 1971 : Sperm activation and fertilization in Balanus balanoides. J. mar. biol. Ass. U.K. 51 : 489-494.
- WELLS, G.P., 1957 : Variation in Arenicola marina (L.) and the status of Arenicola glacialis MURDOCH (Polychaeta). Proc. Zool. Soc. Lond. 129 : 397-419.
- WELLS, G.P., 1963 : Barriers and speciation in lugworms (Arenicolidae, Polychaeta). In "Speciation in the sea", Systematics Association Publication n° 5 : 79-98.

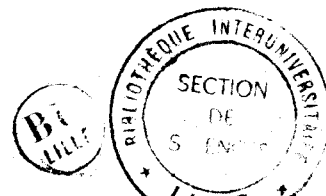


PLANCHE I

Arenicola marina: Maturation de l'ovocyte in vitro.

- Fig. 1 - Ovocytes incubés en présence d'eau de mer (M.P., entre lame et lamelle).
- Fig. 2 - Ovocytes incubés en présence d'extrait de prostomium (M.P., entre lame et lamelle).
- Fig. 3 - Ovocyte incubé en présence d'eau de mer (M.P., entre lame et lamelle).
- Fig. 4 - Ovocyte incubé en présence d'extrait de prostomium (M.P., entre lame et lamelle).
- Fig. 5 - Ovocyte en prophase: coupe semi-fine au niveau de la vésicule germinative (M.P.).
- Fig. 6 - Ovocyte en métaphase: coupe semi-fine au niveau du fuseau de maturation (M.P.).

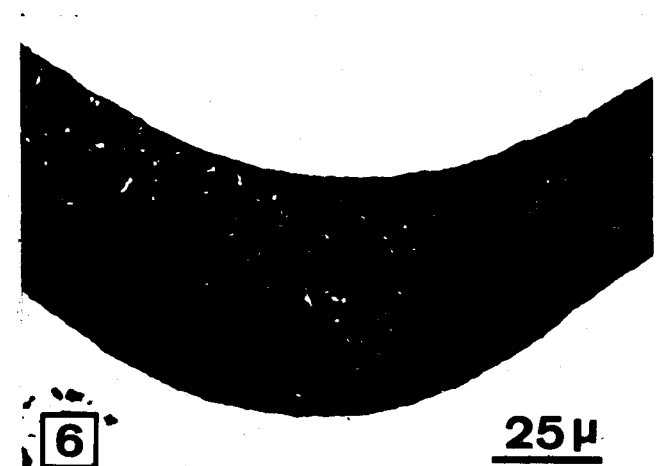
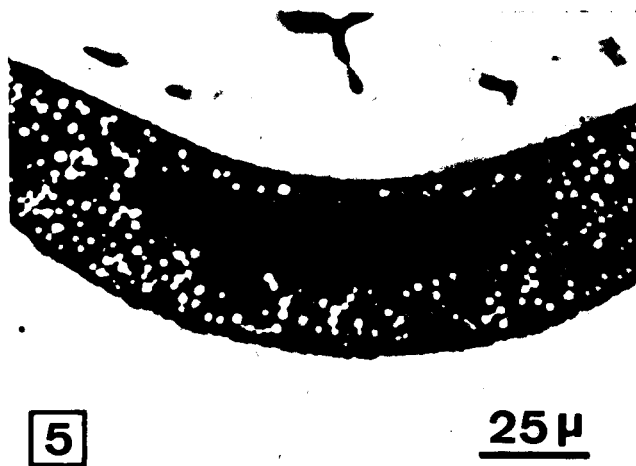
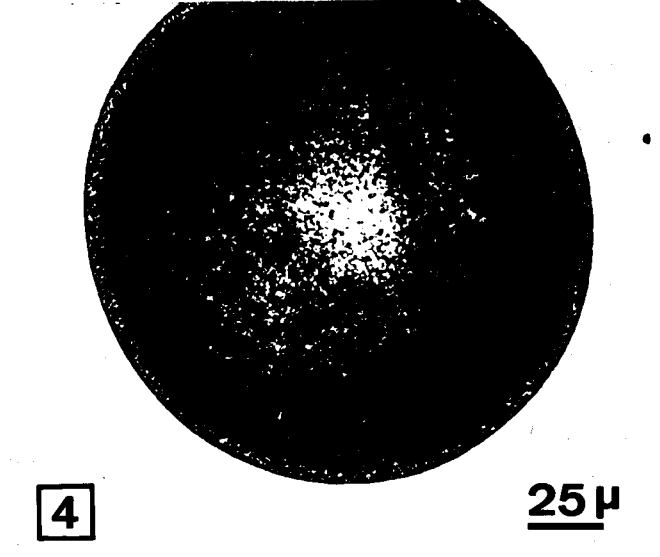
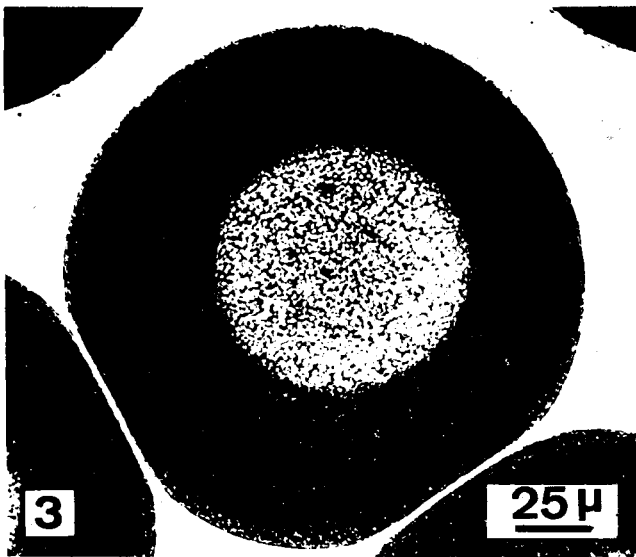
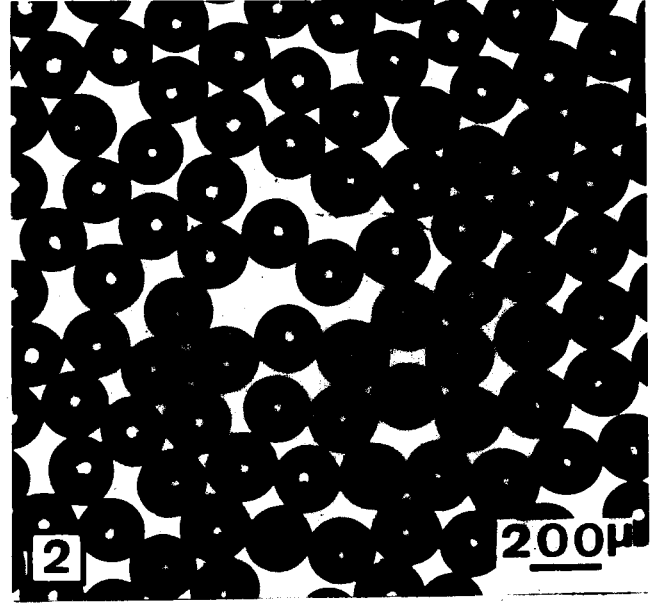
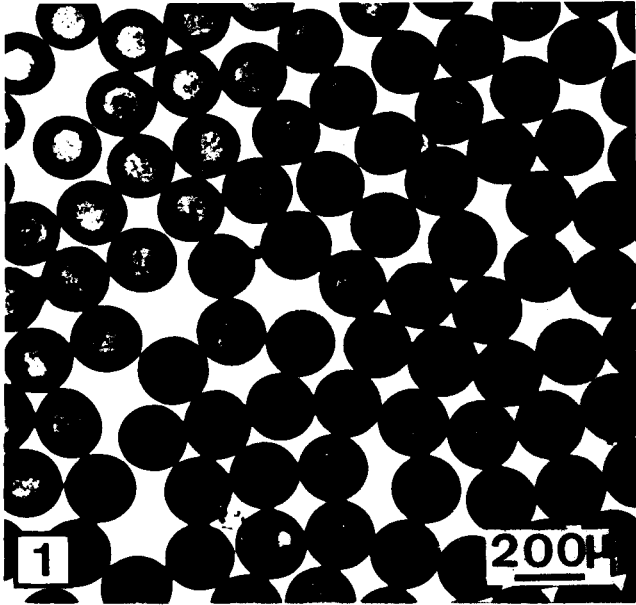


PLANCHE II

Arenicola marina: Cinétique de la maturation.

Les figures impaires représentent la population ovocytaire observée entre lame et lamelle (M.P.). Echelle à la Fig. 1.

Les figures paires représentent une coupe semi-fine d'un ovocyte correspondant (M.P.). Echelle à la Fig. 2.

Fig. 1 et 2 - 0 minutes d'incubation en présence d'un extrait de prostomium (0,05 Prostomium/ml).

Fig. 3 et 4 - 5 minutes d'incubation.

Fig. 5 et 6 - 10 minutes d'incubation.

Fig. 7 et 8 - 15 minutes d'incubation.

Fig. 9 et 10 - 20 minutes d'incubation.

Fig. 11 et 12 - 25 minutes d'incubation.

Fig. 13 et 14 - 30 minutes d'incubation.

Fig. 15 et 16 - 35 minutes d'incubation.

Fig. 17 et 18 - 40 minutes d'incubation.

Fig. 19 et 20 - 45 minutes d'incubation.

Fig. 21 et 22 - 50 minutes d'incubation.

Fig. 23 et 24 - 55 minutes d'incubation.

Fig. 25 et 26 - 60 minutes d'incubation.

Fig. 27 et 28 - 60 minutes d'incubation en présence d'eau de mer (EDM).

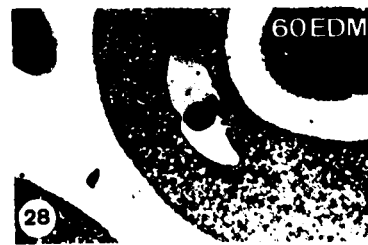
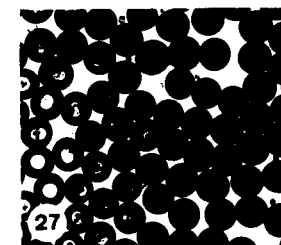
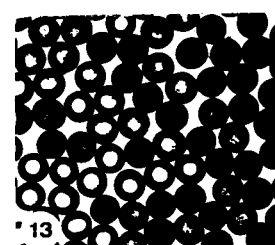
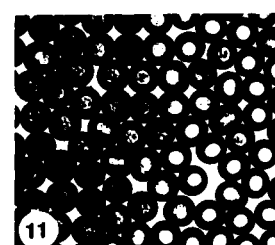
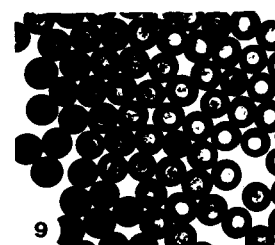
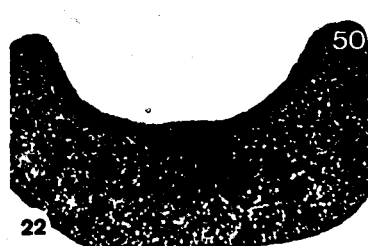
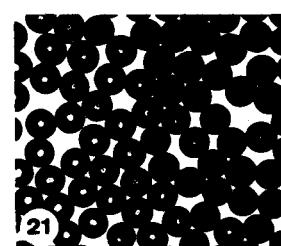
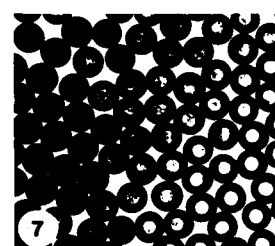
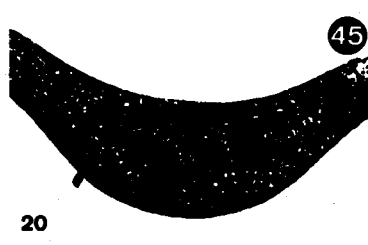
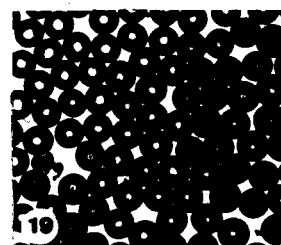
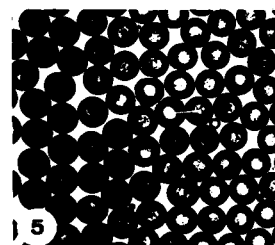
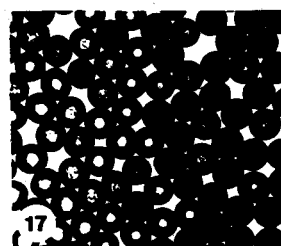
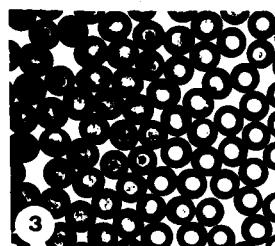
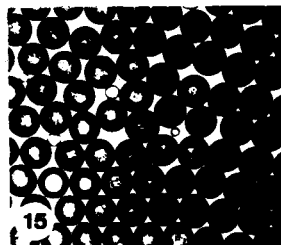
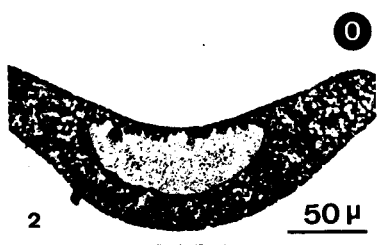
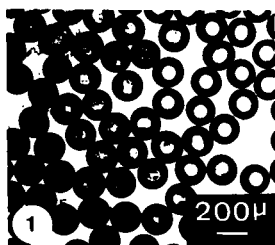


PLANCHE III

Arenicola marina: Forme et surface de l'ovocyte.

Fig. 1 - Ovocyte en prophase (M.E.B.).

Fig. 2 - Ovocyte en métaphase (M.E.B.).

Fig. 3 - Ovocyte en prophase (M.E.B.).

Fig. 4 - Ovocyte en métaphase (M.E.B.).

Fig. 5 - Surface d'ovocyte en prophase. Mv, microvillosités  
(M.E.B.).

Fig. 6 - Surface d'ovocyte en métaphase. Ch, chorion (M.E.B.).

Les flèches indiquent les orifices par lesquels débouchent les microvillosités.



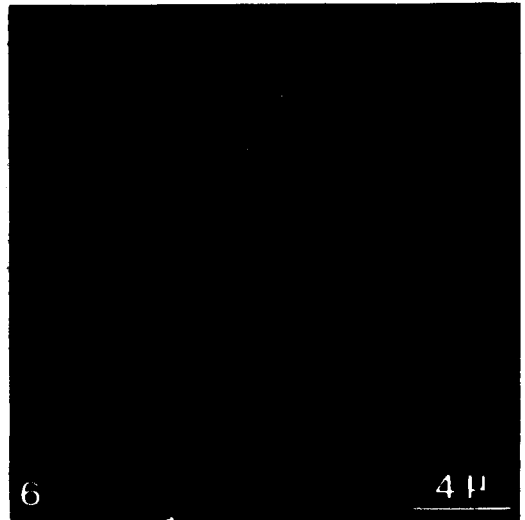
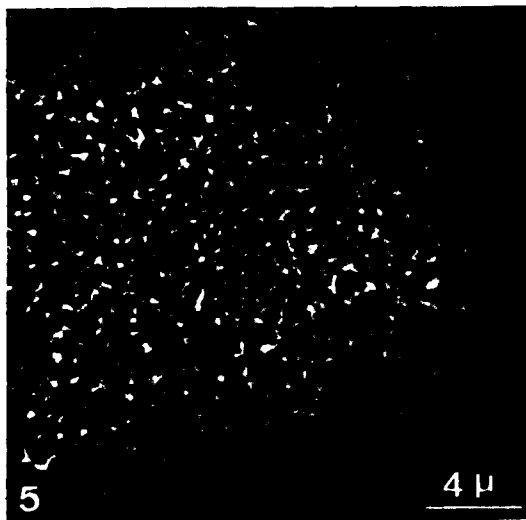
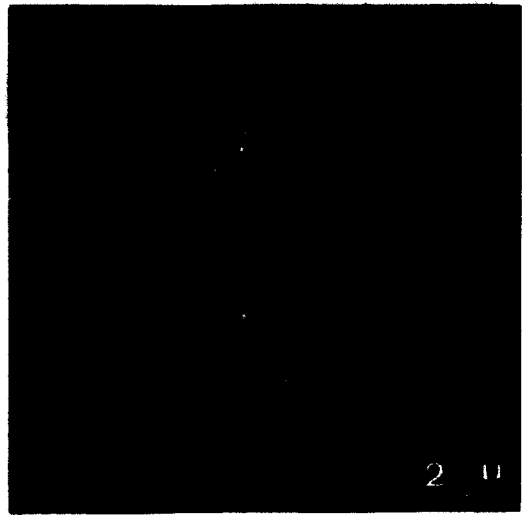
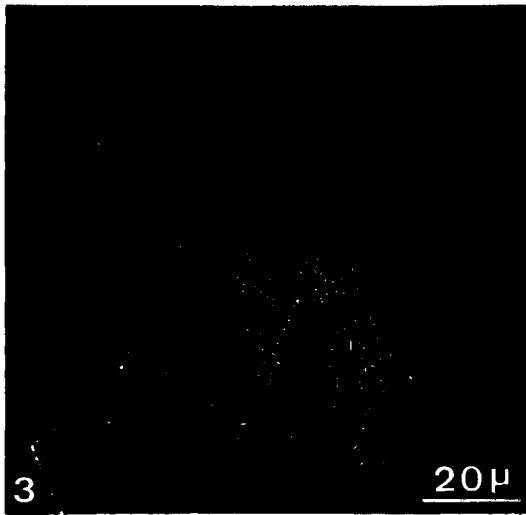
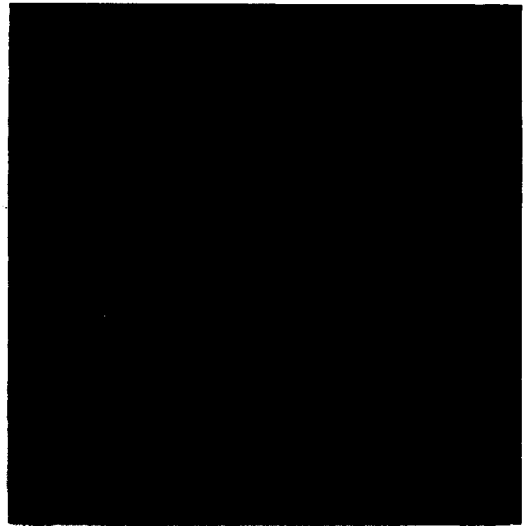


PLANCHE IV

Arenicola marina: Cortex ovocytaire.

- Fig. 1 - Coupe tangentielle du chorion. Ch, chorion; Mv, microvillosités. (M.E.T.).
- Fig. 2 - Cortex d'un ovocyte en prophase. AC, alvéole cortical; Ch, chorion; Mp, membrane plasmique; Mv, microvillosités. (M.E.T.).
- Fig. 3 - Cortex d'un ovocyte en cours de maturation (50 minutes d'incubation en présence d'extrait de prostomium). AC, alvéole cortical; Ch, chorion; Mp, membrane plasmique; Mv, microvillosités. (M.E.T.).
- Fig. 4 - Cortex d'un ovocyte en métaphase. AC, alvéole cortical; Ch, chorion; Mp, membrane plasmique; Mv, microvillosités. (M.E.T.).
- Fig. 5 - Chorions isolés. (M.P., Contraste de phase).
- Fig. 6 - Coupe transversale de chorions isolés. La flèche épaisse indique les restes de membranes plasmiques; la flèche mince indique l'emplacement des microvillosités dans le chorion. (M.E.T.).

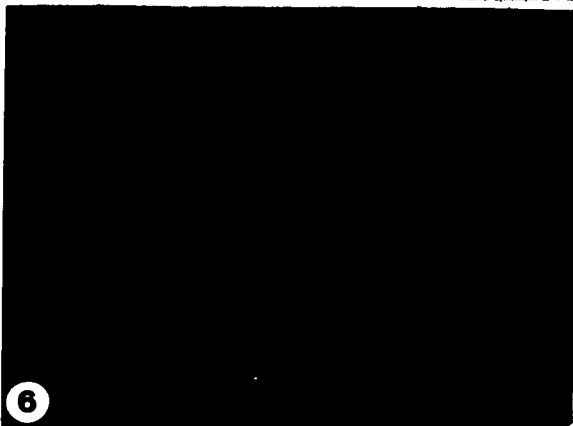
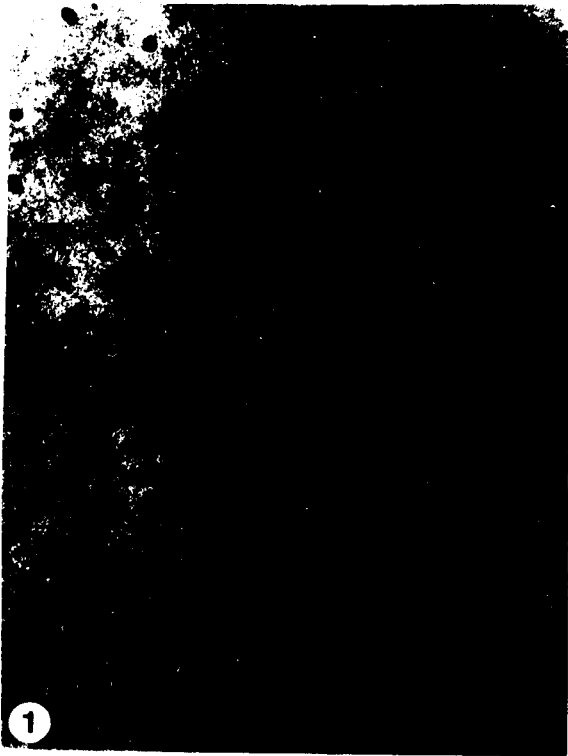


PLANCHE V

Arenicola marina: Inclusions cytoplasmiques.

- Fig. 1 - Zone corticale d'un ovocyte en prophase. AC, alvéole cortical; Ch, chorion; Cy, cytoplasme; L, lipides; V, vitellus. (M.E.T.).
- Fig. 2 - Appareils de Golgi d'ovocyte en prophase. G, appareil de Golgi; Gl, glycogène; L, lipides; Mi, mitochondries. (M.E.T.).
- Fig. 3 - Amas de mitochondries dans un ovocyte en prophase. Cy, cytoplasme; L, lipides; Mi, mitochondries; RE, reticulum endoplasmique; V, vitellus. (M.E.T.).
- Fig. 4 - Reticulum endoplasmique en amas dans un ovocyte en prophase. L, lipides; RE, reticulum endoplasmique; V, vitellus. (M.E.T.).
- Fig. 5 - Amas d'appareils de Golgi dans la zone corticale d'un ovocyte en prophase. AC, alvéole cortical; Ch, chorion; G, appareil de Golgi; L, lipides; Mp, membrane plasmique. (M.E.T.).

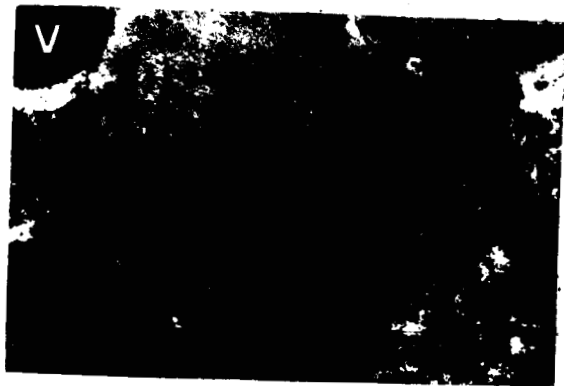
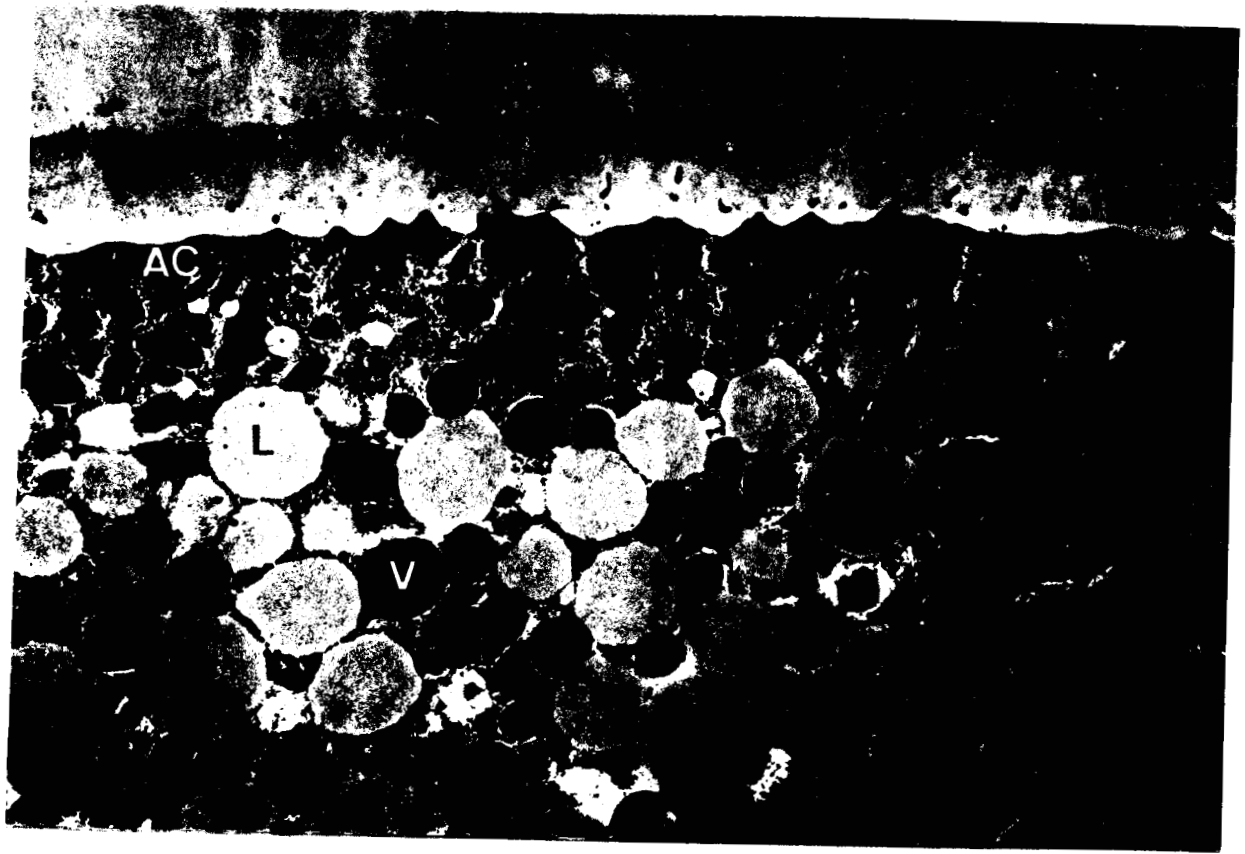


PLANCHE VI

Arenicola marina: Inclusions cytoplasmiques au cours de la maturation.

- Fig. 1 - Reticulum endoplasmique dans un ovocyte après 35 minutes d'incubation dans un extrait de prostomium (0,05 p./ml). Cy, cytoplasme; RE, reticulum endoplasmique. (M.E.T.).
- Fig. 2 - Reticulum endoplasmique dans un ovocyte après 50 minutes d'incubation dans un extrait de prostomium. Cy, cytoplasme; RE, reticulum endoplasmique. (M.E.T.).
- Fig. 3 - Apparition de microtubules dans le cytoplasme d'un ovocyte après 25 minutes d'incubation dans un extrait de prostomium. Cy, cytoplasme; G, appareil de Golgi; Mt, microtubules. (M.E.T.).
- Fig. 4 - Chromosome en cours de condensation dans un ovocyte après 55 minutes d'incubation dans un extrait de prostomium. Chr, chromosome; Cy, cytoplasme; Mi, mitochondries. (M.E.T.).

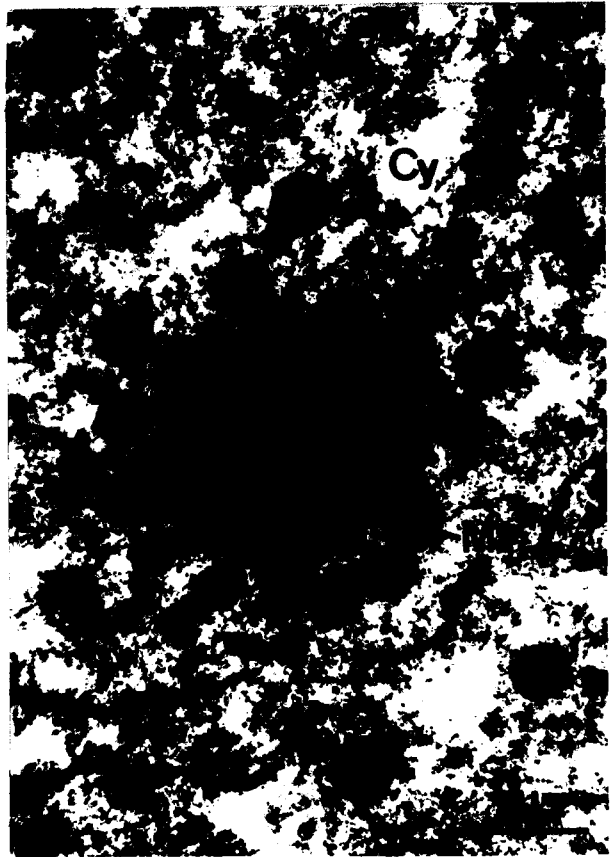


PLANCHE VII

Arenicola marina: Vésicule germinative de l'ovocyte.

- Fig. 1 - Vue générale de la vésicule germinative. Cy, cytoplasme; L, lipides; V, vitellus; VG, vésicule germinative. (M.E.T.).  
L'encart représente une coupe semi-fine de l'ovocyte en prophase au niveau de la vésicule germinative (M.P.).
- Fig. 2 - Coupe tangentielle de l'enveloppe nucléaire. EN, enveloppe nucléaire; Np, nucléoplasme. (M.E.T.).
- Fig. 3 - Coupe tangentielle de l'enveloppe nucléaire. EN, enveloppe nucléaire. La flèche indique l'épaississement au niveau des pores nucléaires. (M.E.T.).
- Fig. 4 - Coupe au niveau du nucléoplasme. Chr, chromatine; EN, enveloppe nucléaire; Np, nucléoplasme; Nu, nucléole. (M.E.T.).



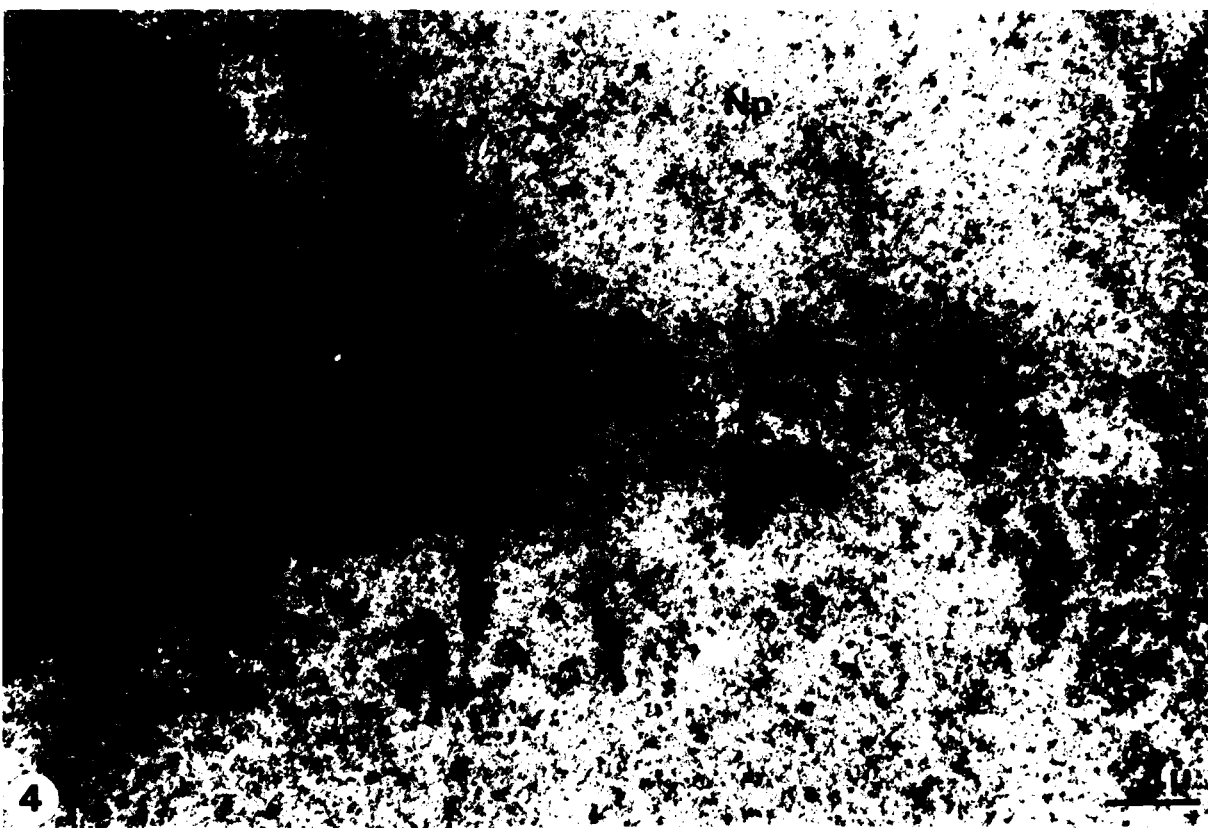
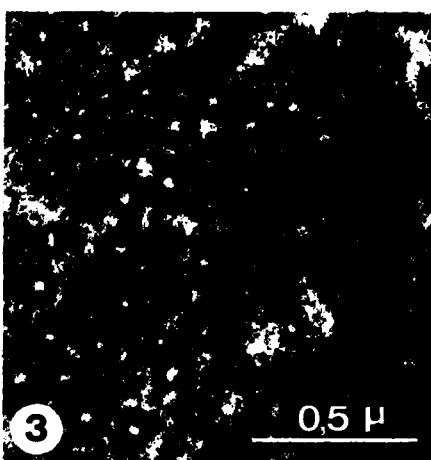
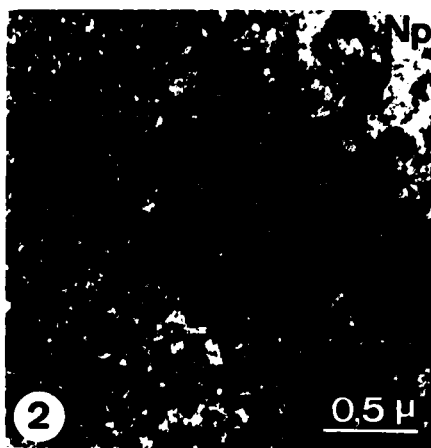
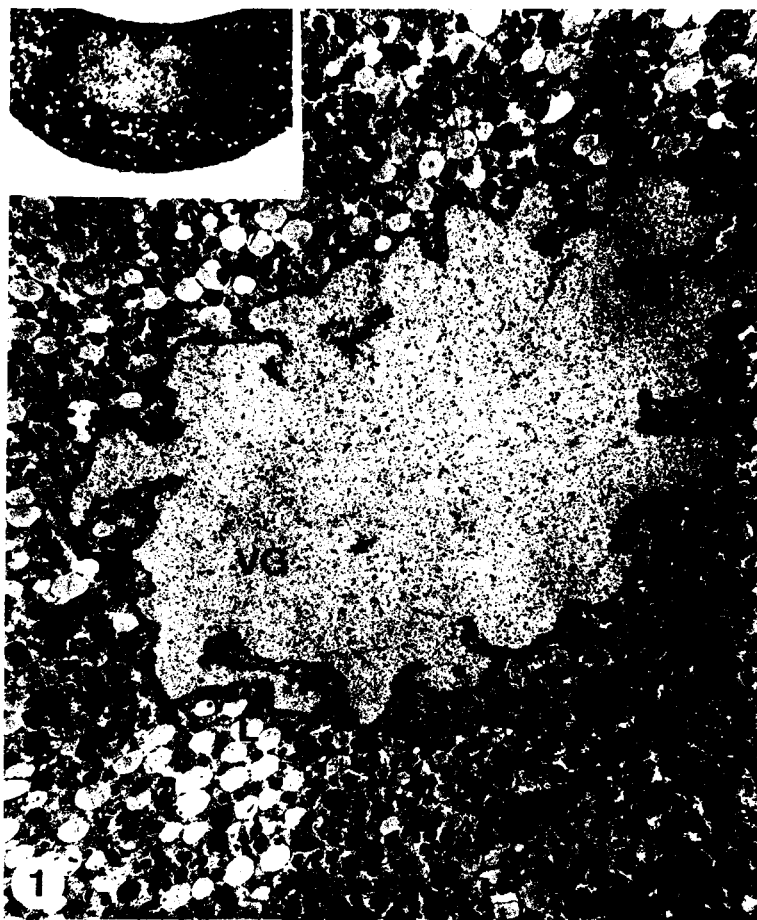


PLANCHE VIII

Arenicola marina: Rupture de la vésicule germinative.

- Fig. 1 - Enveloppe nucléaire de l'ovocyte après 0 minutes d'incubation dans un extrait de prostomium (0,05 prostomium/ml). Cy, cytoplasme; EN, enveloppe nucléaire; Np, nucléoplasme. Les flèches indiquent les pores nucléaires. (M.E.T.).
- Fig. 2 - Enveloppe nucléaire après 5 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium. (M.E.T.).
- Fig. 3 - Enveloppe nucléaire après 10 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium. (M.E.T.).
- Fig. 4 - Enveloppe nucléaire après 15 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium. (M.E.T.).
- Fig. 5 - Enveloppe nucléaire après 20 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium. (M.E.T.).
- Fig. 6 - Enveloppe nucléaire après 25 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium. (M.E.T.).
- Fig. 7 - Enveloppe nucléaire après 30 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium. (M.E.T.).
- Fig. 8 - Enveloppe nucléaire après 35 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium. (M.E.T.).
- Fig. 9 - Enveloppe nucléaire après 35 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium. (M.E.T.).

Fig. 1,2,3,4,5,6,8: Echelle à la Fig. 1.

Fig. 7, 9: Echelle à la Fig. 7.

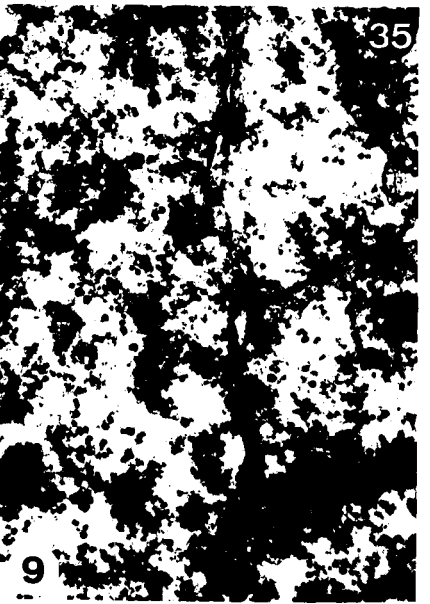
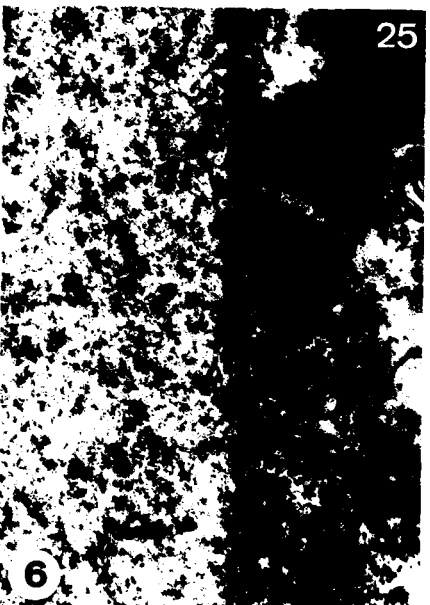
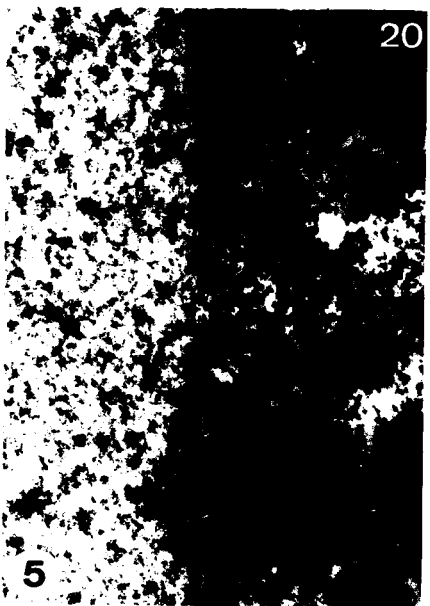
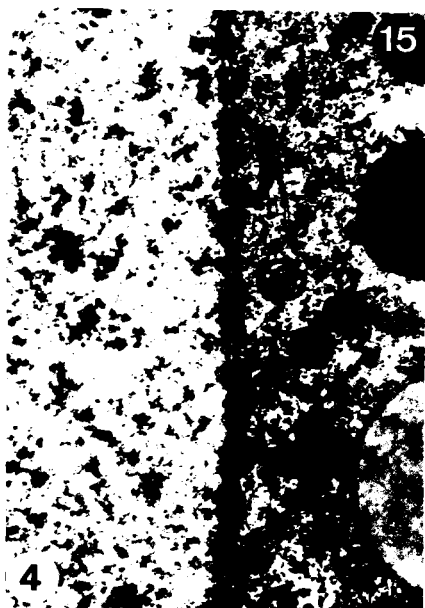


PLANCHE IX

Arenicola marina: Nucléole.

- Fig. 1 - Nucléole d'un ovocyte en prophase. Np, nucléoplasme. (M.E.T.).
- Fig. 2 - Nucléole d'un ovocyte en prophase. (M.E.T.).
- Fig. 3 - Nucléole d'un ovocyte après 40 minutes d'incubation en présence d'un extrait de prostomium (0,05 prostomium/ml). (M.E.T.).
- Fig. 4 - Nucléole d'un ovocyte après 20 minutes d'incubation en présence d'un extrait de prostomium (0,05 prostomium/ml). (M.E.T.).
- Fig. 5 - Nucléole d'un ovocyte après 25 minutes d'incubation en présence d'un extrait de prostomium (0,05 prostomium/ml). (M.E.T.).
- Fig. 6 - Nucléole d'un ovocyte après 30 minutes d'incubation en présence d'un extrait de prostomium (0,05 prostomium/ml). (M.E.T.).

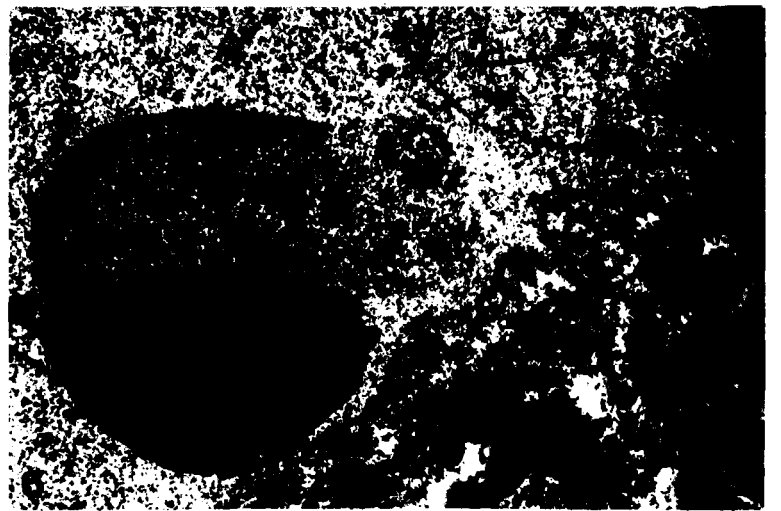
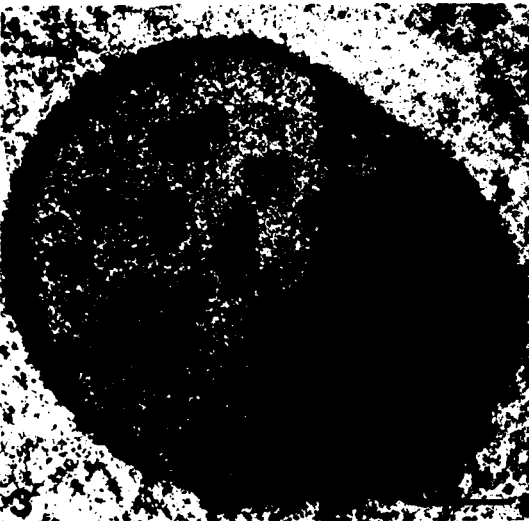
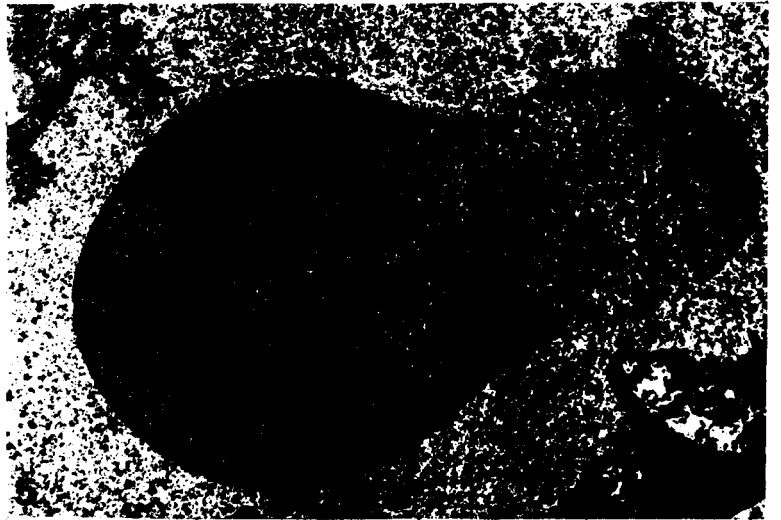
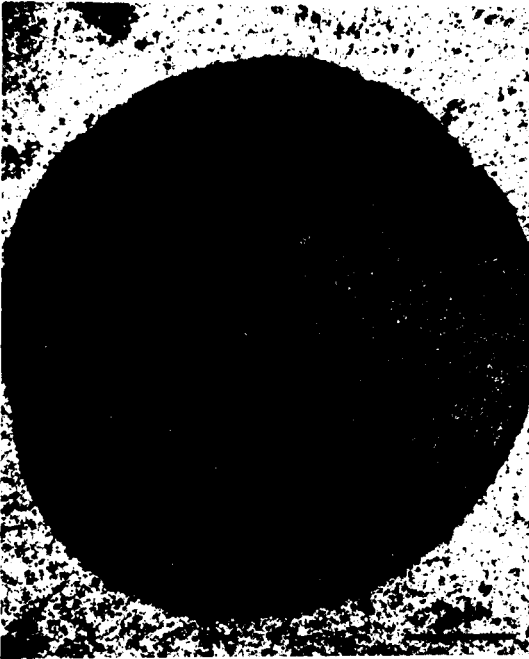
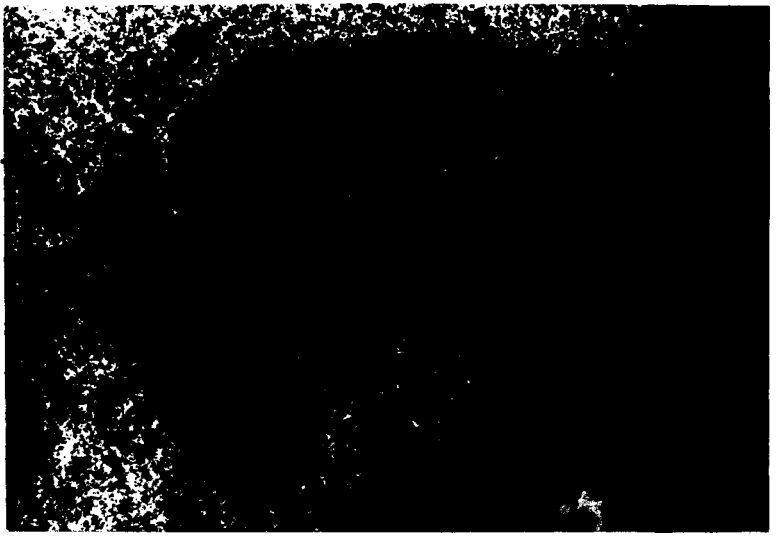


PLANCHE X

Arenicola marina: Fuseau de division méiotique.

- Fig. 1 - Fuseau de division méiotique en cours de formation (ovocyte après 55 minutes d'incubation dans un extrait de prostomium). Ch, chorion; F, fuseau de division méiotique; L, lipides. (M.E.T.).
- Fig. 2 - Vue apicale du fuseau de division méiotique. Cy, cytoplasme; Mt, microtubules. (M.E.T.).
- Fig. 3 - Coupe longitudinale du fuseau de division méiotique. Ch, chorion; Chr, chromosome; F, fuseau; L, lipides. L'encart représente une coupe semi-fine de l'ovocyte en métaphase au niveau du fuseau de maturation. (M.E.T.).
- Fig. 4 - Vue apicale du fuseau de division méiotique. Ce, centrioles; Mt, microtubules. (M.E.T.).

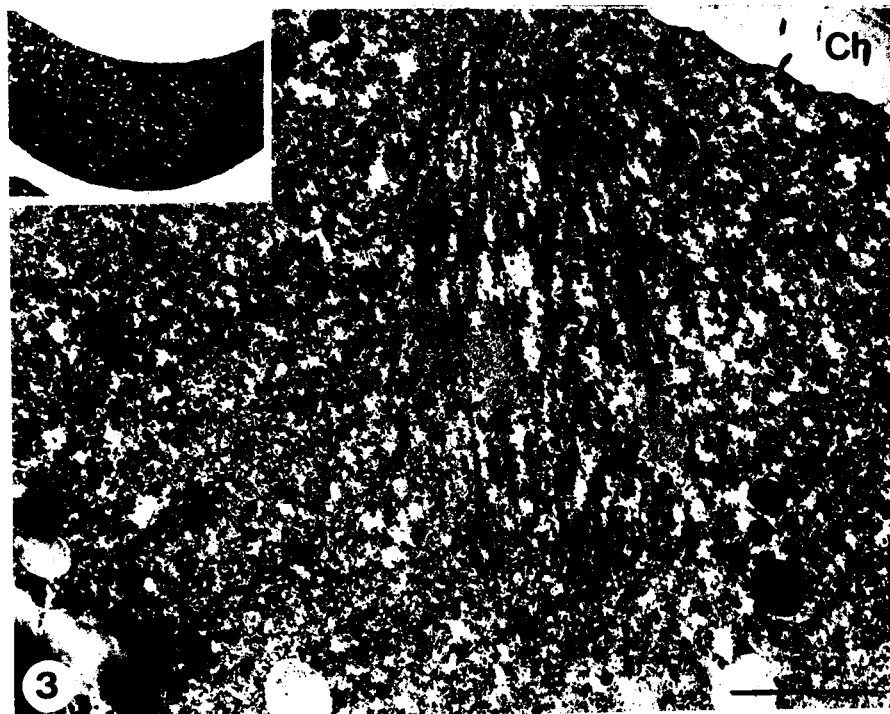
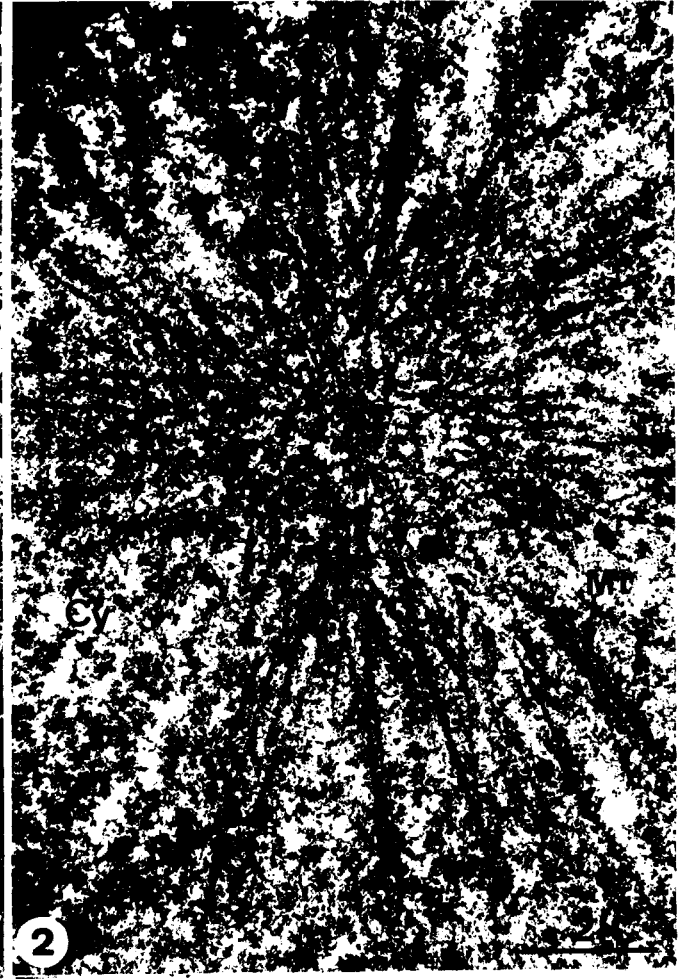
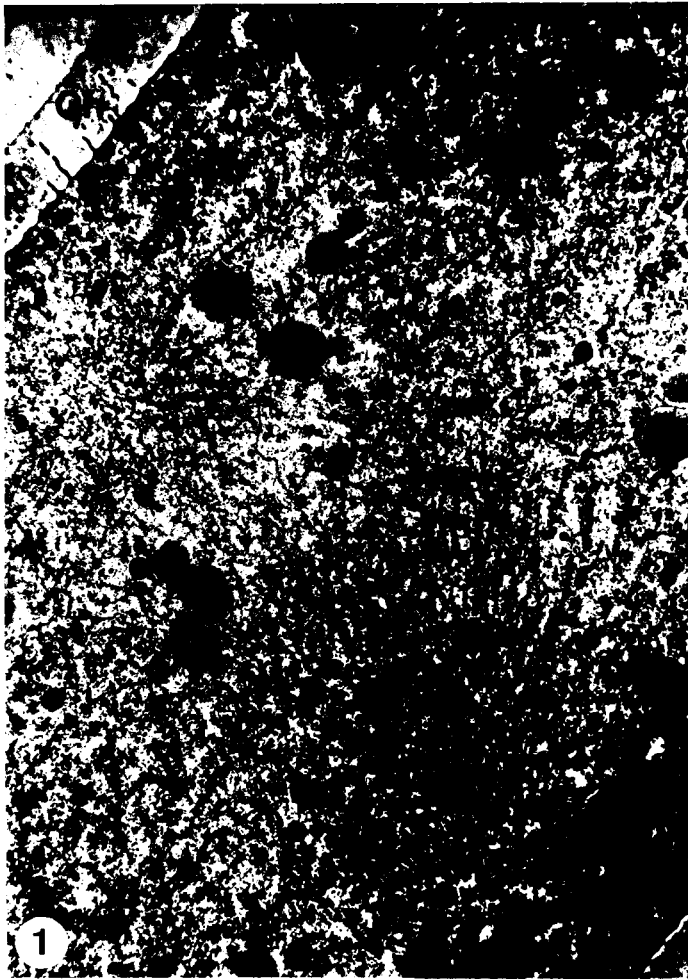




PLANCHE XI

Arenicola marina: Spermatozoïdes.

- Fig. 1 - Plaquette de spermatozoïdes. Fl, flagelle; Spz, spermatozoïde.  
(M.P., contraste de phase).
- Fig. 2 - Plaquette de spermatozoïdes en cours de désagrégation (30 minutes en présence d'extrait de prostomium). Spz, spermatozoïde.  
(M.P., contraste de phase).
- Fig. 3 - Spermatozoïdes libres et mobiles après incubation en présence d'extrait de prostomium. Fl, flagelle; Spz, spermatozoïde.  
(M.P., contraste de phase).
- Fig. 4 - Coupe transversale de plaquette de spermatozoïdes. Cp, cytophore; Fl, flagelle; Spz, spermatozoïde. Les flèches indiquent les ponts cytoplasmiques. (M.E.T.).
- Fig. 5 - Coupe longitudinale de spermatozoïde. Ac, acrosome; Fl, flagelle; Mi, mitochondrie; N, noyau. La flèche indique le centriole et la base du flagelle. (M.E.T.).
- Fig. 6 - Plaquette de spermatozoïdes. Fl, flagelle; Spz, spermatozoïde.  
(M.E.B.).
- Fig. 7 - Plaquette de spermatozoïdes. Fl, flagelle; Mi, mitochondrie.  
(M.E.B.).
- Fig. 8 - Plaquette de spermatozoïdes. Ac, acrosome; Fl, flagelle; Mi, mitochondrie. (M.E.B.).



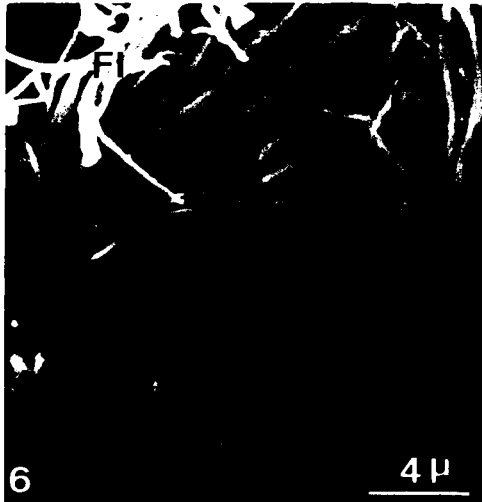
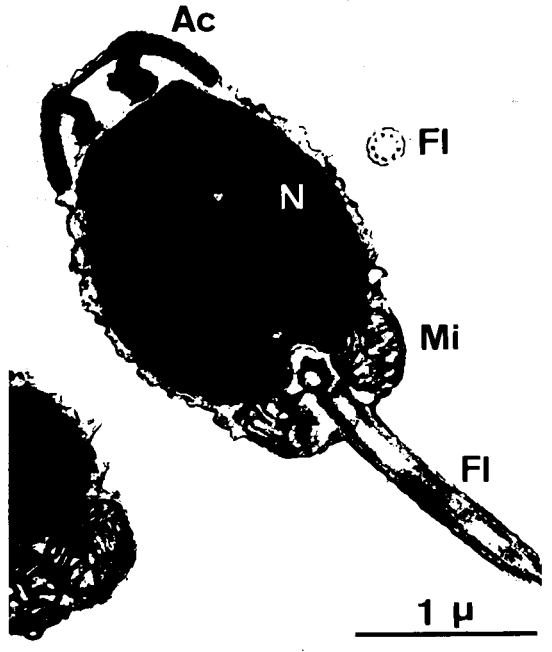
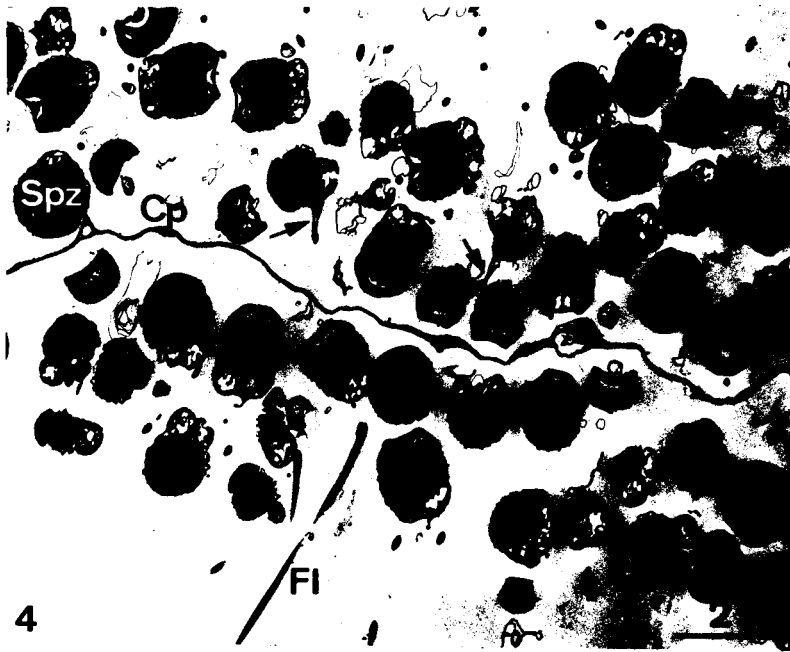
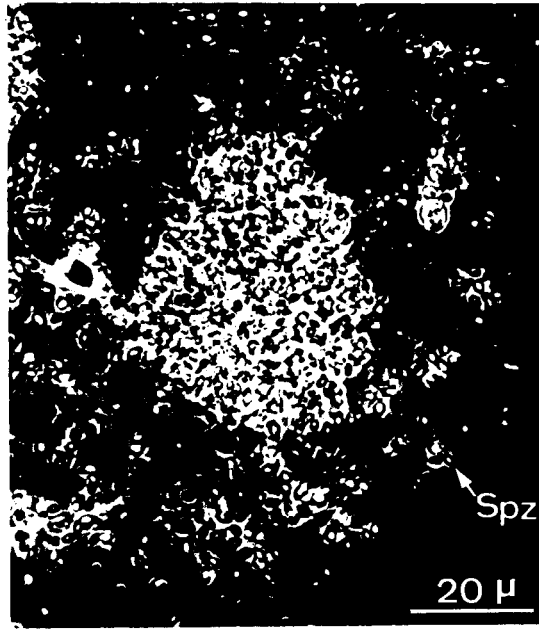
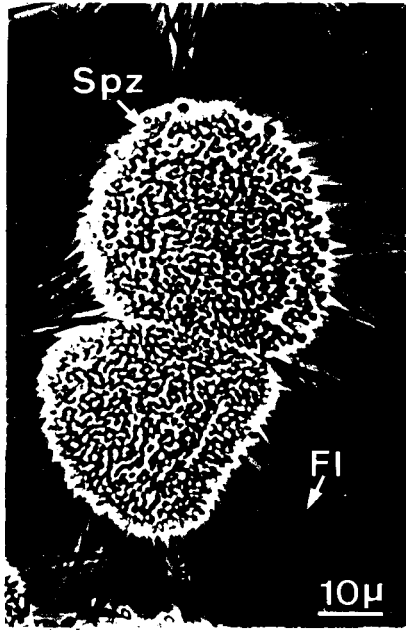


PLANCHE XII

Arenicola marina: Fécondation et activation parthénogénétique.

(Observation sans lamelle, sauf Fig. 6)

- Fig. 1 - Ovocyte en prophase incubé en présence de spermatozoïdes.  
Ch, chorion; Spz, spermatozoïdes. (M.P.).
- Fig. 2 - Ovocytes en métaphase incubés en présence de spermatozoïdes.  
Ch, chorion. (M.P.).
- Fig. 3 - Ovocyte en métaphase incubé en présence de spermatozoïdes.  
Ch, chorion. (M.P.).
- Fig. 4 - Émission du premier globule polaire par un ovocyte fécondé.  
GP, globule polaire. (M.P.).
- Fig. 5 - Ovocytes fécondés. Ch, chorion; Mv, microvillosités. (M.P.).
- Fig. 6 - Larve trochophore obtenue par fécondation in vitro. TA,  
touffe apicale. Les flèches indiquent la ceinture ciliée. (M.P.).
- Fig. 7 - Ovocytes en prophase incubés en présence d'éthanol (5  $\mu$ l/ml  
d'eau de mer). (M.P.).
- Fig. 8 - Ovocytes en prophase incubés en présence d'ionophore A 23187  
(5  $\mu$ l d'ionophore  $10^{-3}$  M dans l'éthanol/ ml d'eau de mer). (M.P.).
- Fig. 9 - Ovocytes en métaphase incubés en présence d'éthanol (5  $\mu$ l/ml  
d'eau de mer). (M.P.).
- Fig. 10 - Ovocytes en métaphase incubés en présence d'ionophore A 23187  
(5  $\mu$ l d'ionophore  $10^{-3}$  M dans l'éthanol/ ml d'eau de mer). (M.P.).
- Fig. 11 - Ovocytes en métaphase incubés en présence de Glycérol 1 M. (M.P.).
- Fig. 12 - Ovocyte activé par l'ionophore A 23187. Ch, chorion;  
Mv, microvillosités. (M.P.).
- Fig. 13 - Ovocyte activé par l'ionophore A 23187: émission du premier  
globule polaire (flèche). Ch, chorion. (M.P.).
- Fig. 14 - Ovocyte activé par l'ionophore A 23187: émission du second  
globule polaire (double flèche). Ch, chorion; Mv, microvil-  
losités. (M.P.).

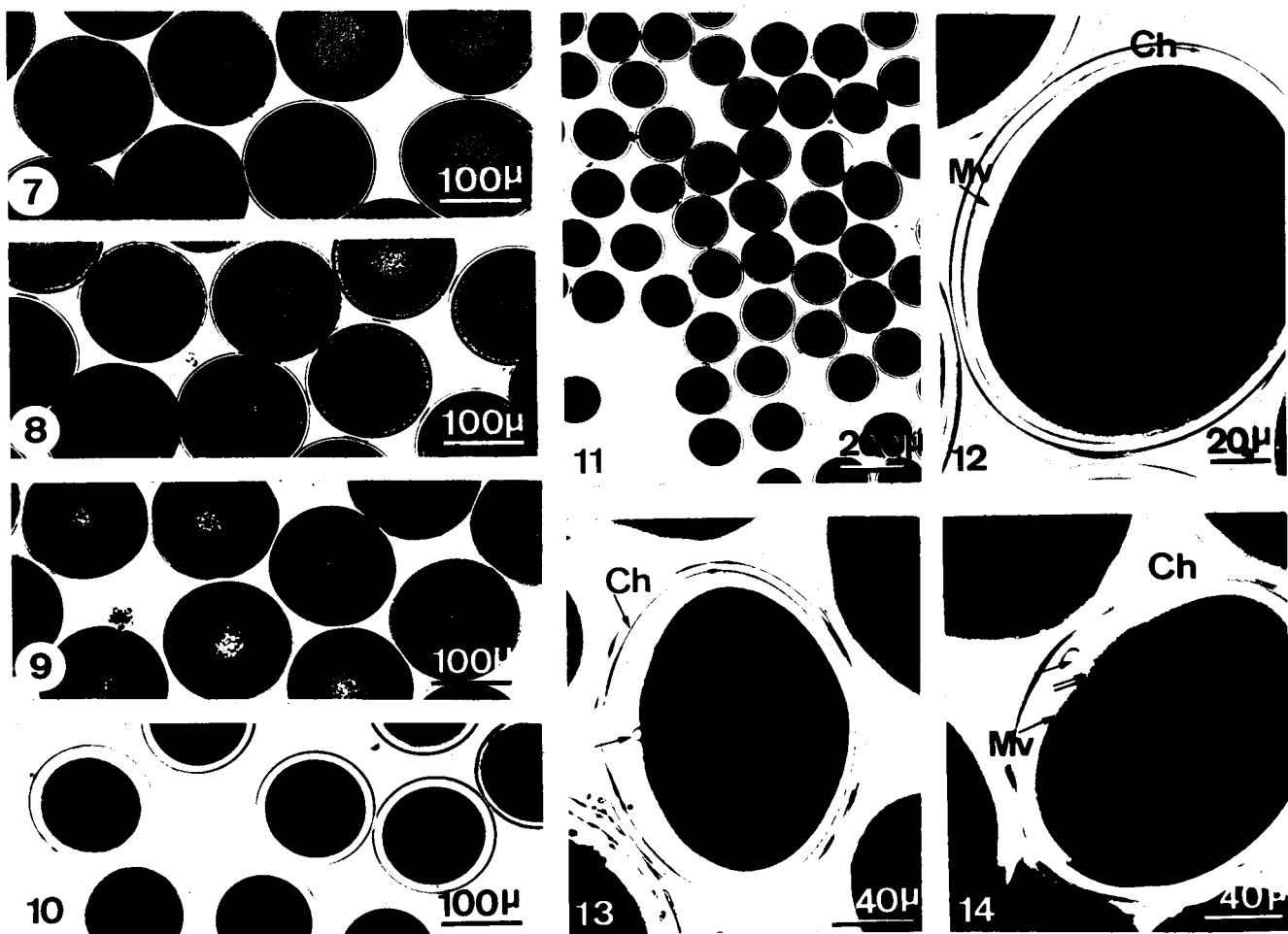
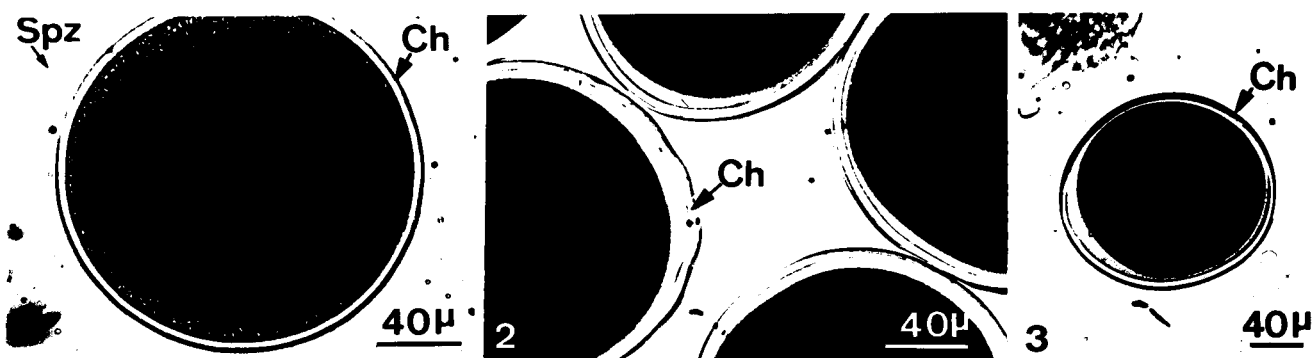


PLANCHE XIII

Arenicola marina: Fécondation et activation parthénogénétique.

- Fig. 1 - Ovocyte fécondé (1 minute). (M.E.B.).
- Fig. 2 - Ovocyte activé par l'ionophore A 23187. (M.E.B.).
- Fig. 3 - Ovocyte activé par l'ionophore A 23187. (M.E.B.).
- Fig. 4 - Ovocyte fécondé (20 minutes). GP, globule polaire, recouvert par le chorion. La flèche indique l'endroit de pénétration du spermatozoïde. (M.E.B.).
- Fig. 5 - Ovocyte fécondé (10 minutes). La flèche indique l'endroit de pénétration du spermatozoïde. (M.E.B.).
- Fig. 6 - Surface de la membrane plasmique et du chorion d'un ovocyte en métaphase non fécondé. Ch, chorion; Mp, membrane plasmique. (M.E.B.).
- Fig. 7 - Surface de la membrane plasmique et du chorion d'un ovocyte en métaphase fécondé. Ch, chorion; Mv, microvillosités. (M.E.B.).
- Fig. 8 - Ovocyte fécondé (5 minutes). Fl, flagelle; GP, globule polaire (sous le chorion). La flèche indique l'emplacement du spermatozoïde sous le chorion. (M.E.B.).
- Fig. 9 - Spermatozoïde fixé à un ovocyte en prophase. Fl, flagelle; Mv, microvillosités. (M.E.B.).

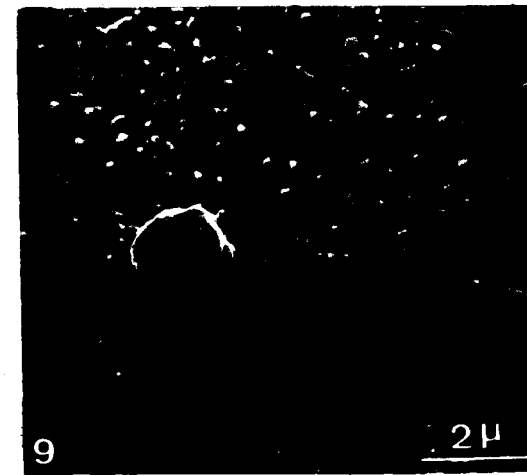
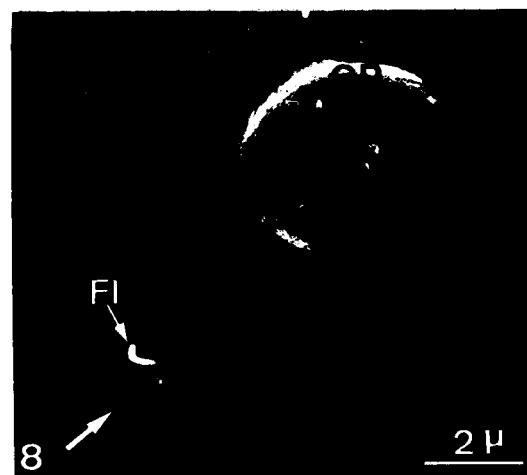
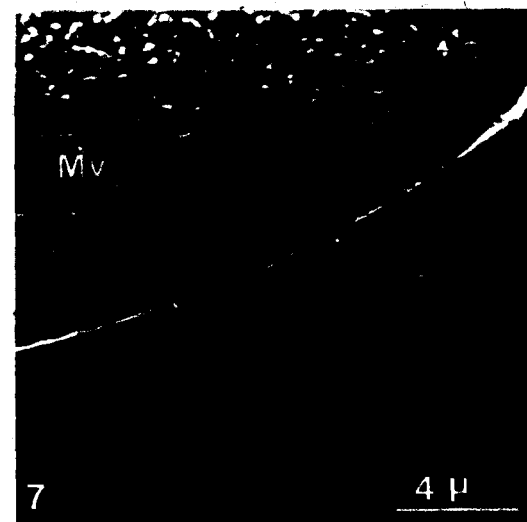
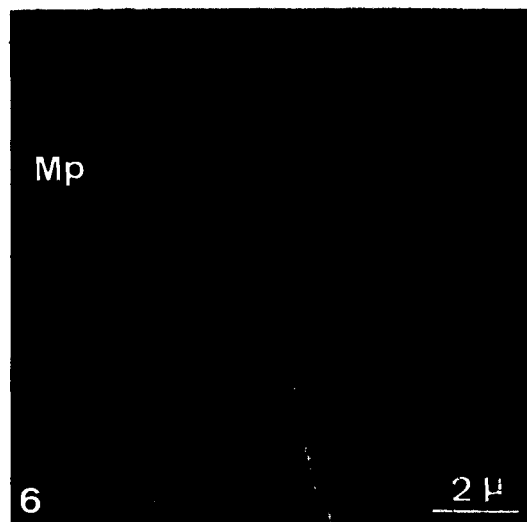
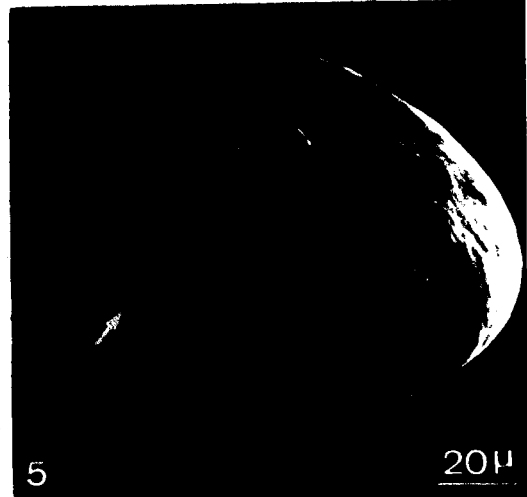
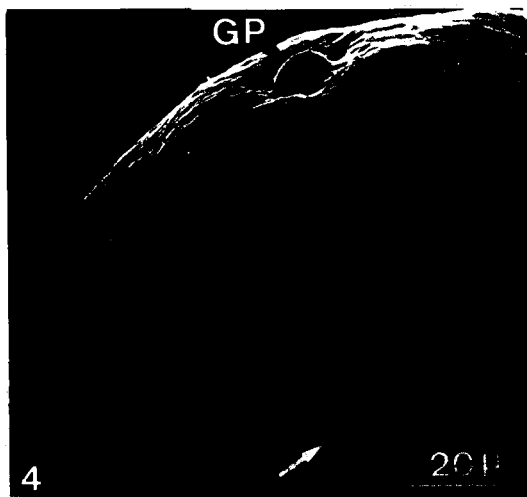
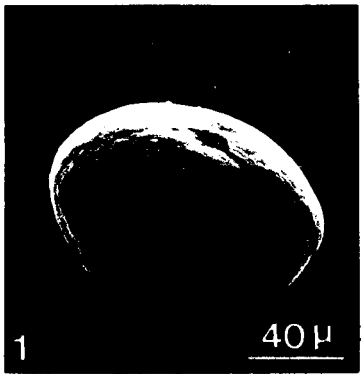


PLANCHE XIV

Arenicola marina: Fécondation.

- Fig. 1 - Fixation du spermatozoïde. Ch, chorion. (M.E.B.).
- Fig. 2 - Fixation du spermatozoïde: réaction acrosomiale (flèche).  
(M.E.B.).
- Fig. 3 - Fixation du spermatozoïde: réaction acrosomiale (flèche).  
(M.E.B.).
- Fig. 4 - Début de pénétration du spermatozoïde: rupture du chorion  
(flèche). (M.E.B.).
- Fig. 5 - Pénétration du spermatozoïde. (M.E.B.).
- Fig. 6 - Pénétration du spermatozoïde. (M.E.B.).
- Fig. 7 - Pénétration du spermatozoïde. (M.E.B.).
- Fig. 8 - Pénétration du spermatozoïde. (M.E.B.).
- Fig. 9 - Pénétration du spermatozoïde. (M.E.B.).
- Fig. 10 - Pénétration du spermatozoïde: la grande flèche indique  
l'orifice percé dans le chorion; la petite flèche indique l'ori-  
fice percé dans la membrane plasmique. (M.E.B.).
- Fig. 11 - Pénétration du spermatozoïde. (M.E.B.).
- Fig. 12 - Pénétration du spermatozoïde: trace de la tête du sperma-  
tozoïde (flèche). ( M.E.B.).

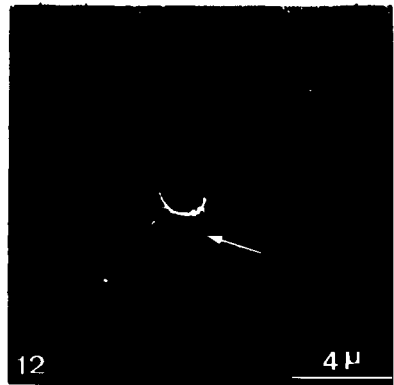
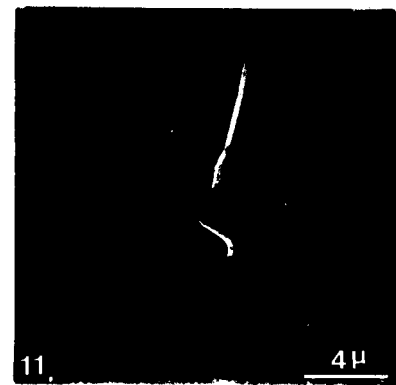
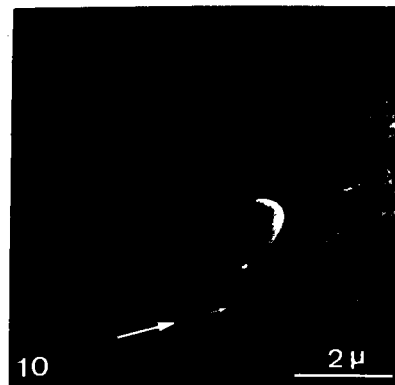
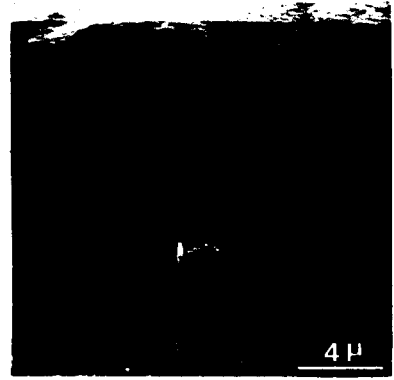
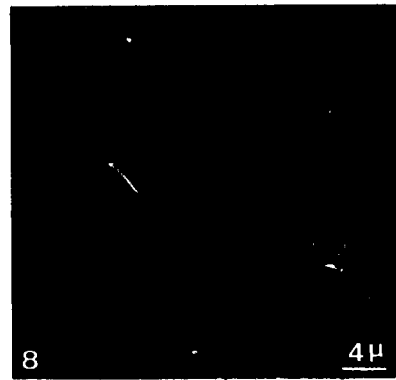
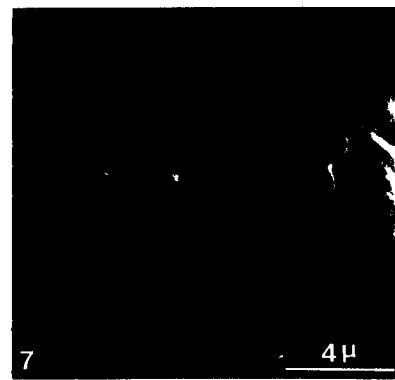
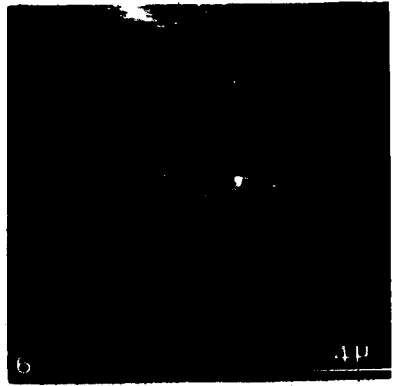
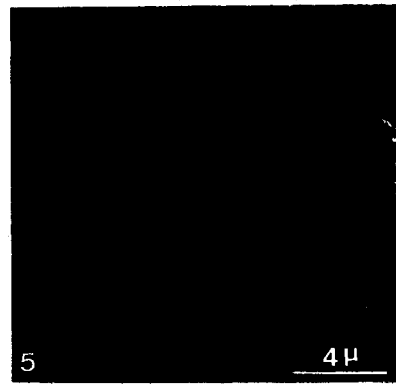
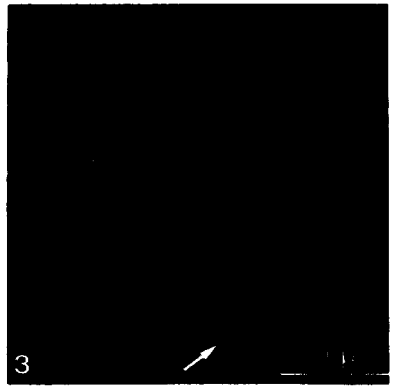
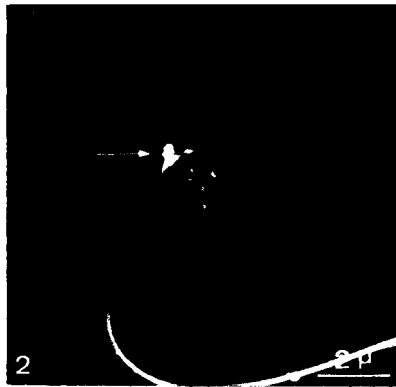
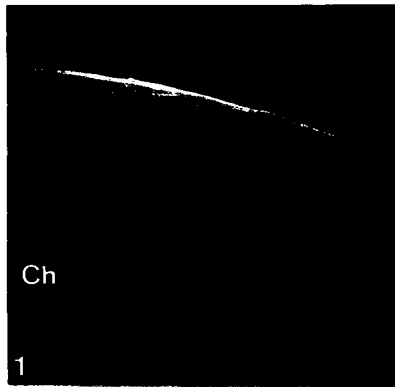
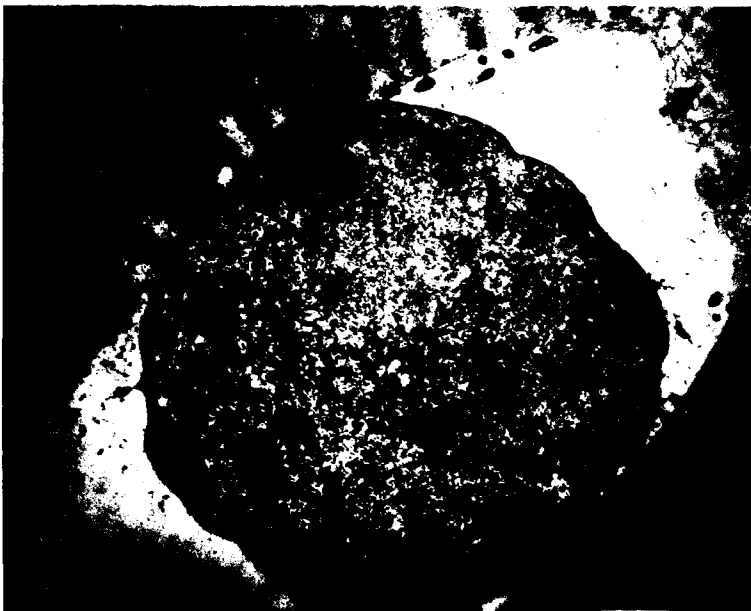
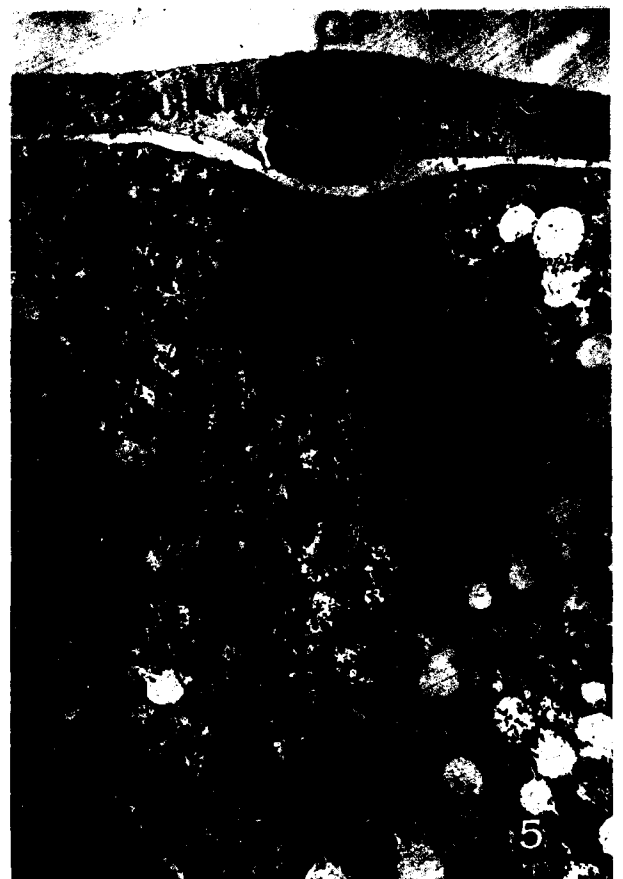
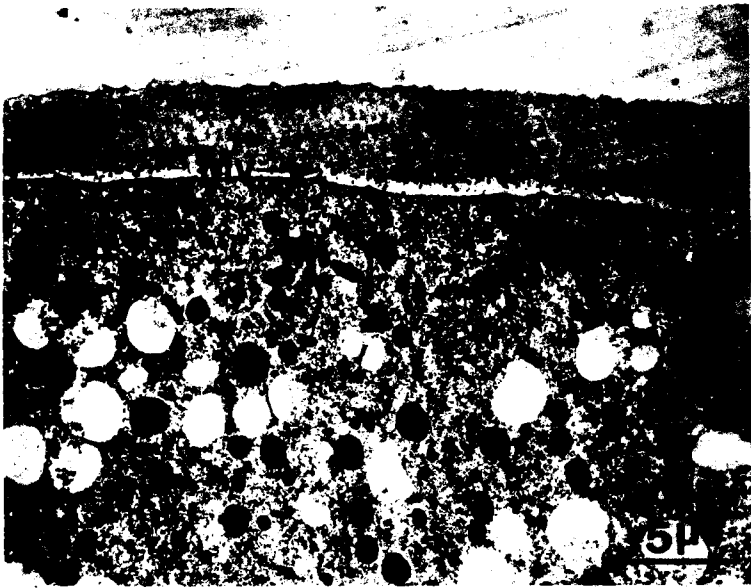


PLANCHE XV

Arenicola marina: Fécondation et activation parthénogénétique.

- Fig. 1 - Zone corticale d'un ovocyte activé par l'ionophore A 23187. Ch, chorion; Cy, cytoplasme; Mv, microvillosités. (M.E.T.).
- Fig. 2 - Zone corticale d'un ovocyte activé par l'ionophore A 23187. Ch, chorion; Cy, cytoplasme. La flèche indique le matériel dense apparu dans l'espace périvitellin. (M.E.T.).
- Fig. 3 - Globule polaire d'un ovocyte activé par l'ionophore A 23187. Ch, chorion; Chr, chromosomes; GP, globule polaire. La longue flèche indique un centriole du premier fuseau de division méiotique; la courte flèche indique le matériel apparu dans l'espace périvitellin. (M.E.T.).
- Fig. 4 - Microvillosités apparues dans l'espace périvitellin d'un ovocyte fécondé. Ch, chorion; Mv, microvillosités.
- Fig. 5 - Emission du premier globule polaire par un ovocyte activé par l'ionophore A 23187. Ch, chorion; Cy, cytoplasme; F, fuseau de seconde division méiotique; GP, globule polaire. (M.E.T.).





## PLANCHE XVI

Arenicola marina: Acquisition de la fertilisabilité au cours de la maturation.

Les figures impaires représentent la population ovocytaire observée entre lame et lamelle (M.P.). Echelle à la fig. 1.

Les figures paires représentent la population ovocytaire 3 minutes après fécondation (observation sans lamelle) (M.P.). Echelle à la fig. 1.

Les temps d'incubation dans l'extrait de prostomium (0,05 prostomium/ml) sont indiqués en chiffres blancs sur fond noir. 60 EDM, témoins incubés pendant 60 minutes dans l'eau de mer.

Fig. 1 et 2 - 0 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium.

Fig. 3 et 4 - 10 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium.

Fig. 5 et 6 - 20 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium.

Fig. 7 et 8 - 25 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium.

Fig. 9 et 10 - 30 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium.

Fig. 11 et 12 - 35 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium.

Fig. 13 et 14 - 40 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium.

Fig. 15 et 16 - 45 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium.

Fig. 17 et 18 - 50 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium.

Fig. 19 et 20 - 55 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium.

Fig. 21 et 22 - 60 minutes d'incubation dans l'extrait de prostomium.

Fig. 23 et 24 - 60 minutes d'incubation dans l'eau de mer.

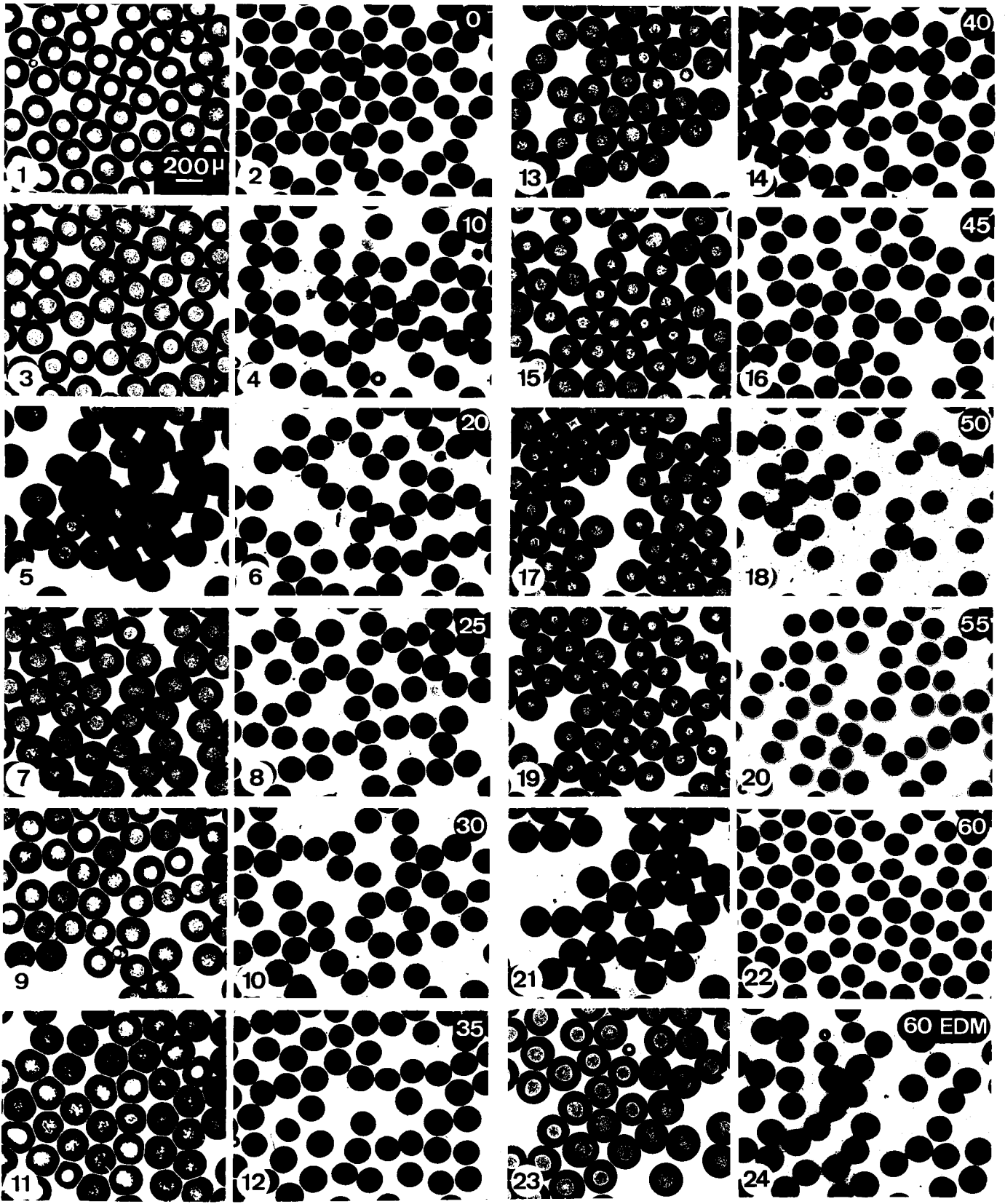


PLANCHE XVII

Aplysia punctata: Maturation de l'ovocyte in vitro.

(Observation entre lame et lamelle, M.P., contraste de phase)

Fig. 1 - Ovocyte en prophase isolé de l'ovotestis.

Fig. 2 - Vésicule germinative de l'ovocyte en prophase (les flèches indiquent les chromosomes)

Fig. 3 - Rupture de la vésicule germinative (flèche).

Fig. 4 - Emission du premier globule polaire (flèche) - apparition de la polarité.

Fig. 5 - Émission du premier globule polaire.

Fig. 6 - Émission du second globule polaire.

Fig. 7 - Émission du second globule polaire.

Fig. 8 - Ovule après émission des 3 globules polaires.

Fig. 9 - Globules polaires. Flèches: Premier globule polaire divisé; pointe de flèche: Second globule polaire. La flèche noire indique le pronucleus femelle.

Fig. 1,3,4,5,6,7,8: échelle à la fig. 1.

Fig. 2,9: échelle à la fig. 2.

