

50376  
1981  
112-1  
Année 1981

50376  
N° d'ordre : 519 1981  
112-1

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

# THÈSE

présentée

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Marc BERTOUT



## L'ÉVOLUTION DU NOYAU AU COURS DE LA GAMÉTOGENÈSE ET SON CONTRÔLE PAR L'HORMONE CÉRÉBRALE CHEZ LES NEREIDAE

Soutenue le 12 Juin 1981 devant la Commission d'Examen

**JURY :** MM. M. DURCHON, *Président*  
A. DHAINAUT, *Rapporteur*  
E. PUVION, *Rapporteur*  
E. VIVIER, *Examineur*  
M<sup>me</sup> P. VAN GANSEN, *Membre invité*  
M. G. GOESSENS, *Membre invité*

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit  
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A.LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire

PROFESSEURS - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale

M.	BOUGHON Pierre	Algèbre
M.	BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M.	CELET Paul	Géologie Générale
M.	COEURE Gérard	Analyse
M.	CONSTANT Eugène	Electronique
M.	CORDONNIER Vincent	Informatique
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M.	DELATTRE Charles	Géologie Générale
M.	ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M.	FAURE Robert	Mécanique
M.	FOCT Jacques	Génie Mécanique
M.	FOURET René	Physique du Solide
M.	GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M.	GRUSON Laurent	Algèbre
M.	GUILLAUME Jean	Microbiologie
M.	HECTOR Joseph	Géométrie
M.	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M.	LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M.	LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LHOMME Jean	Chimie Organique Biologique
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	PAQUET Jacques	Géologie Générale
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

#### PROFESSEURS - 2ème Classe

M.	AL FAKIR Sabah	Algèbre
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
Mme	BATTIAU Yvonne	Géographie
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BOBE Bernard	Sciences Economiques
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M.	BOSCO Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CARREZ Christian	Informatique
M.	CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M.	CHAPOTON Alain	Electronique

M.	COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme	CORSIN Paule	Paléontologie
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M.	CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et Environnement
M.	CROSNIER Yves	Electronique
Mlle	DACHARRY Monique	Géographie
M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DEGAUQUE Pierre	Electronique
M.	DELORME Pierre	Physiologie Animale
M.	DEMUNTER Paul	Sociologie
M.	DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M.	DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M.	DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mlle	DESSAUX Odile	Spectroscopie de la Réactivité Chimique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	DHAINAUT André	Biologie Animale
Mme	DHAINAUT Nicole	Biologie Animale
M.	DORMARD Serge	Sciences Economiques
M.	DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M.	DUBOIS Henri	Spectroscopie Hertziennne
M.	DUBRULLE Alain	Spectroscopie Hertziennne
M.	DUEE Gérard	Géologie
M.	DYMENT Arthur	Mécanique
Mme	EVRAUD Micheline	Chimie Appliquée
M.	FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M.	FONTAINE Hubert	Dynamique des Cristaux
M.	FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M.	GERVAIS Michel	Gestion
M.	GLORIEUX Pierre	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques
M.	GOBLOT Rémi	Algèbre
M.	GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GREVET Patrick	Sciences Economiques
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	HENRY Jean-Pierre	Génie Mécanique
M.	HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M.	HOUDART René	Physique Atomique et Moléculaire
M.	JACOB Gérard	Informatique
M.	JACOB Pierre	Probabilités et Statistiques
M.	JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M.	JOURNEL Gérard	Spectroscopie Hertziennne
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
Mme	LECLERCQ Ginette	Catalyse
Mlle	LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle	LEGRAND Solange	Algèbre
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LEMAIRE Jean	Spectroscopie Hertziennne
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M.	LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M.	LHENAFF René	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M.	LOSFELD Joseph	Informatique
M.	LOUAGE Francis	Electronique
M.	MACKÉ Bruno	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques

M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M <sup>lle</sup> MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquées
M <sup>me</sup> N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M <sup>lle</sup> PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie Animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie Structurale
M. RICHARD Alain	Biologie Animale
M. RIETSCH François	Physique des Polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
M <sup>me</sup> SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie Moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
M <sup>lle</sup> SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie Alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VERBERT André	Biochimie
M. VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
M <sup>me</sup> ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

L'ÉVOLUTION DU NOYAU AU COURS DE LA GAMÉTOGÈSE

ET SON CONTRÔLE PAR L'HORMONE CÉRÉBRALE

CHEZ LES NEREIDAE

Marc BERTOUT

Laboratoire de Biologie Animale

Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 148

"Endocrinologie comparée des Invertébrés"

Université des Sciences et Techniques de Lille

Illustration de la couverture : cyste de spermatogonies ("amas mûriforme")  
de *Nereis diversicolor*. x 12 600.

## AVANT-PROPOS

Je remercie Monsieur le Professeur DURCHON de m'avoir accepté dans son équipe. Ses travaux sur l'endocrinologie des *Nereidae* sont à la base du sujet de cette Thèse. Les excellentes conditions matérielles dont j'ai bénéficié au sein du Laboratoire Associé au C.N.R.S. n° 148 sont le fruit de ses efforts constants. Je le prie de croire à ma profonde gratitude.

Dès mon entrée au Laboratoire, Monsieur le Professeur DHAINAUT m'a fait bénéficier de sa connaissance approfondie de la gamétogenèse des *Nereidae* et de sa maîtrise des techniques de la microscopie électronique. Pour l'intérêt qu'il n'a cessé de manifester à l'égard de mon travail et pour la disponibilité dont il a toujours fait preuve, je le prie de trouver dans ce mémoire l'expression particulière de ma gratitude et de croire à mon sincère attachement.

Je suis heureux d'exprimer ma vive reconnaissance à Monsieur E. PUVION qui a accepté d'être rapporteur de cette Thèse. Je le remercie, en même temps, de l'amabilité avec laquelle j'ai été reçu lors de mes différentes visites au Laboratoire de Villejuif.

Il m'est également très agréable d'adresser mes remerciements à Madame le Professeur VAN GANSEN et à Messieurs les Professeurs VIVIER et GOESSENS qui ont bien voulu me faire bénéficier de leurs compétences respectives en acceptant de juger mon travail.

Mes plus vifs remerciements vont à Monsieur F. CANER et à Monsieur le Professeur KREMBEL pour leur fructueuse collaboration dans le domaine de la biochimie des RNA ovocytaires.

La partie technique de ce travail a été effectuée avec le précieux concours de Madame F. BONET. Je lui suis particulièrement reconnaissant de l'efficacité et du dévouement dont elle a fait preuve dans l'accomplissement de tâches parfois fastidieuses. Je n'oublie pas l'aide que m'ont apportée Madame M.-C. SLOMIANNY et Monsieur G. MONTAGNE. A tous je tiens à exprimer mon amicale gratitude.

Qu'il me soit également permis de remercier Madame AUGER, Monsieur LAZARECKI, photographes, et Monsieur HIMPENS, dessinateur, pour le soin qu'ils ont apporté à la réalisation de l'illustration de ce mémoire.

## SOMMAIRE

	pages
INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	3
I - Matériel	3
II - Méthodes expérimentales	3
1 - Expérimentation <i>in vivo</i>	3
2 - Cultures organotypiques	3
3 - Emploi des inhibiteurs de la synthèse des RNA	4
III - Techniques microscopiques	4
1 - Microscopie photonique	4
2 - Microscopie électronique	5
A - Techniques d'étude morphologique	5
B - Réactions signalétiques et cytochimiques	5
IV - Techniques autoradiographiques	6
1 - Incorporation des précurseurs	6
2 - Autoradiographie en microscopie photonique	7
3 - Autoradiographie à haute résolution	8
V - Techniques biochimiques	8
1 - Extraction des RNA totaux	8
2 - Fractionnement des RNA	8
PREMIERE PARTIE : OVOGENESE	
Rappel des différentes étapes de l'ovogenèse des <i>Nereidae</i>	11
I - Ovogenèse naturelle	11
1 - Stade de prévitellogenèse	11
2 - Stade de vitellogenèse	11
3 - Stade d'élaboration des organites corticaux	11
4 - Stade de maturité	12

	pages
II - Ovogenèse expérimentale	12
1 - <i>Nereis diversicolor</i>	12
2 - <i>Perinereis cultrifera</i>	14
CHAPITRE I - EVOLUTION DES FORMATIONS NUCLEOPLASMIQUES AU COURS DE L'OVOGENESE	17
I - Etude ultrastructurale des constituants nucléoplasmiques	17
1 - Décondensation des chromosomes	18
2 - Structure des constituants nucléoplasmiques pen- dans la phase de grand accroissement ovocytaire	19
A - Structure du matériel d'origine chromosomique	19
B - Structure du matériel d'origine nucléolaire	20
II - Etude ultrastructurale des transferts nucléo- cytoplasmiques	20
1 - Extrusion du matériel nucléaire	20
2 - Evolution des extrusions dans le cytoplasme	21
III - Discussion	22
1 - Structure des chromosomes décondensés	22
2 - Nature des agrégats cytoplasmiques	24
CHAPITRE II - EVOLUTION DU NUCLEOLE AU COURS DE L'OVOGENESE NATURELLE	27
I - Etude morphologique	27
1 - <i>Nereis diversicolor</i>	27
A - Stade de prévitellogenèse	27
B - Stade de vitellogenèse	28
C - Stade d'élaboration des organites corticaux	29
D - Stade de maturité	29

	pages
2 - <i>Perinereis cultrifera</i>	31
A - Stade de prévitellogénèse	31
B - Stade de vitellogénèse	31
C - Stade d'élaboration des alvéoles corticaux	32
D - Stade de maturité	32
II - Etude cytochimique	33
1 - Réactions de mise en évidence du RNA et des protéines	33
A - Stade de vitellogénèse	33
B - Stade d'élaboration des organites corticaux	34
C - Stade de maturité	34
2 - Réactions à l'argent	35
A - Technique de RISUENO <i>et al.</i>	35
B - Technique de BLOOM et GOODPASTURE	36
III - Discussion	36
1 - Organisation ultrastructurale du nucléole	36
A - Variantes de l'organisation nucléolaire chez les <i>Nereidae</i>	36
B - Signification de la dualité du constituant fibrillaire	36
2 - Relations entre l'évolution de la morphologie nucléolaire et les variations de l'activité endocrine du cerveau	39
A - Signification de l'évolution morphologique du nucléole	39
B - Relations entre l'évolution nucléolaire et l'activité endocrine cérébrale	40
CHAPITRE III - EVOLUTION DU NUCLEOLE AU COURS DE L'OVOGENESE EXPERIMENTALE	43
I - <i>Nereis diversicolor</i>	43
1 - Effets de la suppression du facteur hormonal	43
A - Stade du nucléole vacuolisé	44
B - Stade du nucléole ségrégué	46

	pages
2 - Effets de la réintroduction de l'action hormonale au cours de l'évolution expérimentale	48
II - <i>Perinereis cultrifera</i>	49
1 - Période estivale	49
2 - Période hivernale	50
III - Discussion	51
1 - Signification de l'évolution nucléolaire caractéristique de l'ovogenèse expérimentale	51
A - Vacuolisation	51
B - Ségrégation	53
2 - Importance de l'étape nucléolaire dans les moda- lités du contrôle hormonal de l'ovogenèse	54
CHAPITRE IV - ETUDE DE LA SYNTHÈSE DES RNA AU COURS DE L'OVOGENÈSE	57
I - Ovogenèse naturelle	57
1 - Etude autoradiographique <i>in vivo</i>	57
2 - Etude autoradiographique <i>in vitro</i>	59
A - Stades de prévitellogenèse et de vitellogenèse	59
B - Stade d'élaboration des organites corticaux	60
3 - Etude biochimique	60
II - Ovogenèse expérimentale	62
1 - Etude autoradiographique	62
2 - Etude biochimique	64
III - Discussion	66
1 - Evolution de la synthèse des RNA pendant l'ovogenèse naturelle	66
A - RNA d'origine extranucléolaire	66
B - RNA d'origine nucléolaire	68
2 - Régulation hormonale de la synthèse des RNA ovocytaires	70

## DEUXIEME PARTIE : SPERMATOGENESE

Rappel des différentes étapes de la spermatogènèse des <i>Nereidae</i>	73
I - Stade de la prolifération spermatogoniale	73
II - Stade spermatocyte	74
1 - Passage du stade spermatogonie au stade spermatocyte I	74
2 - Prophase méiotique	74
3 - Divisions de maturation	75
III - Stade spermatide	75
IV - Stade spermatozoïde	76
 CHAPITRE V - EVOLUTION MORPHOLOGIQUE DU NOYAU AU COURS DE LA SPERMATOGENESE	 77
I - Stade de la prolifération spermatogoniale	77
1 - Structure du noyau interphasique	77
2 - Mitoses spermatogoniales	78
II - Stade de l'interphase préméiotique	78
1 - Phase G <sub>1</sub>	79
2 - Phases S et G <sub>2</sub>	79
III - Stade spermatocyte	80
1 - Prophase méiotique	80
2 - Divisions de maturation	80
IV - Stades spermatide et spermatozoïde	81
V - Discussion	81
1 - Morphologie ultrastructurale des RNP nucléaires	81
A - Stades préméiotiques	81
B - Stades méiotiques	82
2 - Contrôle hormonal de la différenciation méiotique	83

CHAPITRE VI - EVOLUTION DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES NUCLEIQUES AU COURS DE LA SPERMATOGENÈSE	85
I - Etude autoradiographique des synthèses de DNA	85
1 - Méthode de détermination du taux de réplication	85
2 - Etude de l'incorporation de la thymidine- <sup>3</sup> H	86
II - Etude autoradiographique des synthèses de RNA	87
1 - Etude de l'indice de marquage	87
2 - Etude de l'intensité de marquage	87
3 - Localisation ultrastructurale du marquage nucléaire	90
III - Etude autoradiographique du devenir des RNA synthétisés avant les divisions de maturation	92
1 - Devenir des RNA pendant la méiose	93
A - Cellules fixées pendant la prophase méiotique	93
B - Cellules fixées pendant les divisions de maturation	93
2 - Devenir des RNA pendant la spermiogenèse	93
3 - Contrôles	94
IV - Discussion	94
1 - Evolution des synthèses de RNA au cours de la spermatogenèse	94
A - Variations du taux de synthèse des RNA	94
B - Synthèse des différentes classes de RNA	95
C - Conservation des RNA synthétisés	95
2 - Synthèses préméiotiques de RNA et contrôle hormonal de la différenciation méiotique	96
CHAPITRE VII - EFFETS DE LA REINTRODUCTION DE L'ACTION HORMONALE	99
I - Protocole expérimental	99

	pages
II - Réintroduction de l'action hormonale pendant l'interphase préméiotique	99
1 - Avant la phase S préméiotique	100
A - Avant l'augmentation de la synthèse des RNA	100
B - Pendant l'augmentation de la synthèse des RNA	100
2 - Pendant la phase S préméiotique	102
III - Réintroduction de l'action hormonale pendant la méiose et la spermiogénèse	104
IV - Discussion	104
1 - Réversibilité de la suppression expérimentale de l'action hormonale	104
2 - Contrôle hormonal des différentes étapes de la différenciation méiotique	106
 CHAPITRE VIII - EFFETS D'INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE DES RNA	 109
I - Protocole expérimental	109
II - Taux d'inhibition des synthèses de RNA	109
III - Effets des inhibiteurs sur la morphologie ultrastructurale du noyau	110
1 - Actinomycine D	110
2 - $\alpha$ -Amanitine	112
3 - Cordycepine	112
IV - Effets des inhibiteurs sur la chronologie de la spermatogénèse	113
1 - Actinomycine D	113
2 - $\alpha$ -Amanitine	114
3 - Cordycepine	114

	pages
V - Discussion	118
1 - Effets des inhibiteurs de la synthèse des RNA	118
2 - Convergence entre les effets de l'inhibition des synthèses de RNA et ceux de l'action endo- crine cérébrale	119
 DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS	 123
I - Evolution du noyau au cours de la gamétogenèse	123
1 - Ovogenèse	123
2 - Spermatogenèse	124
II - Mécanisme de la régulation hormonale	125
 RESUME	 129
 BIBLIOGRAPHIE	

## INTRODUCTION

L'hormone cérébrale des *Nereidae* contrôle plusieurs processus liés à la croissance et à la maturation génitale tels que l'épitoquie (DURCHON, 1948), la gamétogenèse (DURCHON, 1952 ; CLARK et RUSTON, 1963 a ; DHAINAUT et PORCHET, 1967), la régénération (DURCHON, 1956 ; CLARK et RUSTON, 1963 b). L'activité endocrine du cerveau n'est pas constante mais diminue tout au long de la vie de l'animal, pour s'annuler à l'approche de la maturité génitale (DURCHON et PORCHET, 1970, 1971). Le développement harmonieux de chaque individu est ainsi lié à la décroissance progressive du taux hormonal pendant toute la durée du cycle biologique qui est de 1 à 3 ans selon les espèces. L'hormone cérébrale exerce par conséquent une action à long terme, en modulant la différenciation cellulaire et peut donc être rangée, selon la classification généralement admise (CSABA, 1977 ; TATA, 1980), dans la catégorie des hormones morphogénétiques.

Les modalités du contrôle hormonal de la différenciation cellulaire chez les *Nereidae* ont surtout été étudiées au niveau du cytoplasme, notamment au cours de l'ovogenèse. Le début de la croissance ovocytaire se déroule en présence d'une activité endocrine élevée. L'appareil de Golgi participe alors à la synthèse des protéines du vitellus (DHAINAUT, 1967, 1970 a ; DHAINAUT et PORCHET, 1977 a). La diminution du taux hormonal provoque une réorganisation de l'activité fonctionnelle des dictyosomes qui s'orientent vers l'élaboration des organites corticaux riches en glycoconjugués (DHAINAUT, 1968, 1970 a ; DHAINAUT et PORCHET, 1977 b ; PORCHET *et al.*, 1977). L'ensemble de ces résultats suggère que l'hormone cérébrale contrôle les synthèses cytoplasmiques par l'intermédiaire d'une modulation des activités enzymatiques de l'appareil de Golgi (DHAINAUT et PORCHET, 1977 b).

En revanche, les effets de l'hormone sur les synthèses d'origine nucléaire sont beaucoup moins bien connus. Nous avons donc entrepris l'étude de la régulation hormonale de la différenciation des constituants nucléaires dans les cellules germinales mâles et femelles. La gamétogenèse constitue en effet un modèle très intéressant car les modalités de l'action hormonale sont très différentes dans chacun des deux sexes.

Dans la lignée femelle, la diminution graduelle de l'activité endocrine détermine la croissance ovocytaire (PORCHET, 1974) qui se déroule, rappelons-le, pendant le stade diplotène de la prophase méiotique. Du point de vue des synthèses nucléaires, cette phase de l'ovogenèse se caractérise dans la plupart des espèces étudiées (RAVEN, 1961 ; DAVIDSON, 1968 ; GURDON, 1974), par un stockage considérable de RNA "stables" (rRNA, tRNA) qui seront utilisés au cours des premiers stades du développement embryonnaire. L'ovogenèse offre donc un modèle bien adapté à l'étude du contrôle hormonal de la synthèse de certaines classes de RNA.

Dans la lignée mâle, la prolifération spermatogoniale s'effectue en présence d'une activité endocrine élevée. La diminution brutale du taux hormonal déclenche l'entrée en méiose (DURCHON, 1952 ; DHAINAUT, 1964 a ; DURCHON *et al.*, 1965). La spermatogenèse présente par conséquent des conditions très favorables à l'étude de la régulation hormonale du type particulier de différenciation que constitue la méiose.

Nous envisagerons donc successivement la gamétogenèse dans chacun des deux sexes. Tout d'abord, les divers aspects de la différenciation des constituants nucléaires ont été étudiés dans les conditions endocrines naturelles. Dans un second temps, les modalités de la régulation hormonale ont été explorées en faisant appel aux techniques expérimentales (ablation du prostomium, cultures organotypiques) permettant de soustraire les cellules à l'influence du cerveau.

MATERIEL ET METHODES

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### I - MATERIEL

Les *Nereis diversicolor* ont été récoltées dans le port de Boulogne-sur-Mer (Pas-de-Calais). Les *Perinereis cultrifera* proviennent de la station biologique de Luc-sur-Mer (Calvados).

Au laboratoire, les animaux sont isolés, à une température de 10 à 15°C, dans des récipients d'élevage contenant de l'eau de mer filtrée, renouvelée tous les 3 jours. L'état génital de chaque ver est déterminé par l'observation au microscope d'une ponction coelomique, toutes les cellules germinales d'un même animal se trouvant sensiblement au même stade. Pour les mâles, le stade de la spermatogenèse est défini par simple observation de la morphologie des cellules germinales. Pour les femelles, l'état génital est apprécié en calculant le diamètre ovocytaire moyen à partir de mesures effectuées, à l'oculaire micrométrique, sur une trentaine d'ovocytes.

### II - METHODES EXPERIMENTALES

#### 1 - Expérimentation *in vivo*

Les cellules germinales ont été soustraites, *in vivo*, à l'action hormonale, par 2 techniques : décérébration et section en 2 tronçons, toutes deux mises au point par DURCHON (1952).

Dans le premier cas, les animaux sont séparés en deux lots. Les uns sont décérébrés par ablation du prostomium. Les autres constituent les témoins et sont maintenus dans des conditions d'élevage strictement identiques à celles des animaux décérébrés.

Dans le second cas, les animaux sont coupés en deux tronçons par une section transversale dans la région médiane du corps. La partie postérieure se trouve ainsi soustraite à l'action de l'hormone cérébrale tandis que la région antérieure continue à subir l'influence endocrine du cerveau et sert de témoin.

#### 2 - Cultures organotypiques

La levée de l'inhibition cérébrale a été également étudiée *in vitro*, par la méthode des cultures organotypiques. Ce type d'expérimentation a été réalisé chez *N. diversicolor*, seule espèce de *Nereidae* chez laquelle la technique a été appliquée avec succès (DURCHON et SCHALLER, 1963).

Les vers sont isolés pendant quatre jours en eau de mer aseptisée additionnée d'antibiotiques. Après dissection, les parapodes sont cultivés sur le milieu mis au point par DURCHON et SCHALLER (1963). Le milieu est soit semi-solide, selon la technique de WOLFF et HAFFEN (1952), soit liquide, selon la technique de CHEN (1954). Dans les parapodes isolés, les cellules germinales évoluent en absence d'hormone cérébrale ; les cellules témoins sont obtenues en associant un parapode à un prostomium d'individu jeune.

### 3 - Emploi des inhibiteurs de la synthèse des RNA

Trois inhibiteurs du métabolisme des RNA ont été utilisés : actinomycine D (Calbiochem),  $\alpha$ -amanitine (Boehringer), cordycepine (Sigma). Les expériences ont été réalisées en culture organotypique, en ajoutant ces substances au milieu nutritif. Nous avons employé la technique de CHEN (1954) qui, utilisant un milieu liquide, assure une meilleure répartition des inhibiteurs et donne les résultats les plus reproductibles. Après des essais préliminaires, les doses suivantes ont été retenues : actinomycine D : 10  $\mu$ g/ml,  $\alpha$ -amanitine : 100  $\mu$ g/ml, cordycepine : 100  $\mu$ g/ml.

## III - TECHNIQUES MICROSCOPIQUES

### 1 - Microscopie photonique

Des fragments de vers sont fixés par les liquides de Bouin, de Carnoy, ou le formol à 1 % dans l'eau de mer. Les pièces sont ensuite incluses dans la paraffine et débitées en coupes de 5  $\mu$  d'épaisseur. Les réactions cytochimiques citées dans les chapitres qui vont suivre ont été conduites selon les recommandations de GABE (1968). Elles sont récapitulées dans le tableau 1.

Tableau 1 - Réactions cytochimiques utilisées en microscopie photonique

Réaction	Contrôle	Composés mis en évidence
Bleu de toluidine pH 4,2	RNase	RNA
Fast green pH 8,1 (ALFERT et GESCHWIND, 1953)	Pas d'hydrolyse des acides nucléiques	Protéines basiques
Fast green pH 2,2		Acidophilie totale (fonctions NH <sub>2</sub> libres)
Bleu de toluidine pH 9 (SMETANA et BUSCH, 1966)		Protéines acides
Réaction au D.D.D. (BARNETT et SELIGMAN, 1952)	Blocage par : -Bichlorure de Mercure -N-éthyl-maléinide	Protéines sulfhydrylées

En ce qui concerne la mise en évidence des organisateurs nucléolaires par l'argent, nous avons utilisé les variantes Ag I et Ag AS de la technique de BLOOM et GOODPASTURE (1976), adaptées aux nucléoles des cellules interphasiques par HERNANDEZ-VERDUN *et al.* (1978) et GOESSENS (1979). Contrairement à ces auteurs qui étudient des cellules cultivées en monocouche, de taille beaucoup plus réduite que les ovocytes de *Nereis*, nous n'avons pu appliquer ces techniques à des cellules entières. Elles ont été pratiquées sur des coupes de 5 à 7  $\mu$  d'épaisseur. Ces dernières sont confectionnées à partir de fragments de vers fixés par le liquide de Carnoy et inclus dans la paraffine. Elles sont ensuite déparaffinées et réhydratées selon les méthodes classiques de l'histologie.

## 2 - Microscopie électronique

### A - Techniques d'étude morphologique

Les parapodes contenant les cellules germinales sont fixés pendant 3 heures à 4°C par une solution de glutaraldéhyde à 3 % dans le tampon phosphate de Sørensen 0,2 M à pH 7,2. Après lavage dans la solution tampon additionnée de sucrose, une postfixation est effectuée par le tétroxyde d'osmium à 1 % pendant 1 heure à la température du laboratoire.

Dans le cas des ovocytes, les solutions tampons sont additionnées de NaCl (fixateur) ou de sucrose (liquide de lavage), dans les proportions indiquées par DHAINAUT (1970a) pour le même matériel. En ce qui concerne les cellules de la lignée mâle, nous avons été amené à augmenter les concentrations en sucrose dans les différentes solutions de fixation et de lavage, pour obtenir une osmolarité compatible avec une conservation acceptable des structures cellulaires, notamment des systèmes membranaires (BERTOUT, 1976).

Après les opérations de fixation, les pièces sont incluses dans l'araldite. Les coupes sont contrastées par l'acétate d'uranyle en solution alcoolique pendant 1 minute, puis par le citrate de plomb selon REYNOLDS (1963) pendant 8 minutes. Les observations ont été effectuées aux microscopes Siemens Elmiskop 1 et Hitachi HU 11 ESF à des tensions respectives de 80 et 75 Kvols.

### B - Réactions signalétiques et cytochimiques

. Technique d'imprégnation argentique des nucléoles selon RISUENO *et al.* (1973). Cette méthode met en évidence non une fonction chimique précise mais un constituant morphologique : la zone fibrillaire du nucléole.

Les pièces sont fixées par un mélange formol-hydroquinone pendant une nuit à 4°C. L'imprégnation argentique se fait par immersion des pièces fixées dans une solution de nitrate d'argent à 2 % pendant 4 heures à 70°C. Après lavage dans l'eau distillée, elles sont transférées dans le mélange formol-hydroquinone pendant 1 heure à la température du laboratoire. On procède ensuite à la déshydratation et à l'inclusion dans l'araldite puis à la confection de coupes relativement épaisses, de couleur d'interférence jaune ou jaune-brun.

. Technique de contraste préférentiel des RNP selon BERNHARD (1969). Utilisant les propriétés chélatrices de l'EDTA, cette méthode permet de différencier les RNP et les DNP du noyau cellulaire.

La technique a été appliquée sur des coupes obtenues à partir de pièces fixées par la glutaraldéhyde et incluse dans l'araldite. Les réactifs ont été préparés et la "coloration" conduite suivant les indications de BURGLIN (1974). Après flottage sur une solution aqueuse d'acétate d'uranyle à 5 % pendant une minute, les coupes sont transférées sur une solution d'EDTA 0,2 M pendant 10 à 40 minutes selon les types cellulaires, puis sur le citrate de plomb pendant 1 minute.

. Mise en évidence du DNA par la technique de COGLIATI et GAUTIER (1973). Comme la réaction de Feulgen sur le principe de laquelle elle est basée, la méthode de COGLIATI et GAUTIER (1973) met en évidence le DNA de façon spécifique.

Cette technique a été pratiquée sur du matériel fixé par la glutaraldéhyde, sans postfixation osmique. Après une hydrolyse par l'HCl 5 N pendant 25 minutes à la température du laboratoire, les coupes sont mises à flotter pendant 1 heure à 37°C, sur une solution d'ammine d'osmium à 1 % dans laquelle on a, au préalable, fait barboter de l'anhydride sulfureux.

L'ammine d'osmium a été préparée au laboratoire de Monsieur le Professeur GAUTIER et nous a été fournie par l'intermédiaire de Monsieur le Professeur VIVIER. Nous les en remercions tous deux.

#### IV - TECHNIQUES AUTORADIOGRAPHIQUES

##### 1 - Incorporation des précurseurs

L'incorporation des précurseurs tritiés : Thymidine-<sup>3</sup>H 6 (24 Ci/mMole), Thymidine methyl-<sup>3</sup>H (25 Ci/mMole), Uridine-<sup>3</sup>H 5 (24 Ci/mMole), Uridine-<sup>3</sup>H 5-6 (40 Ci/mMole), a été réalisée soit *in vivo*, soit *in vitro*.

Incorporation *in vivo* : Elle se fait par injection du précurseur, en solution aqueuse, dans la cavité coelomique après anesthésie des animaux par le MS 222. Les doses injectées sont, selon les expériences, de 10 à 25 µCi/g de poids frais.

Incorporation in vitro : Cette méthode présente l'avantage de permettre l'étude de cellules provenant d'un même individu et de contrôler avec exactitude la dose de précurseur incorporée, ce qui n'est pas possible dans le cas de l'injection coelomique. En ce qui concerne la lignée femelle, les ovocytes obtenus par ponction coelomique sont immergés dans de l'eau de mer contenant le précurseur tritié à raison de 10  $\mu\text{ci/ml}$  (microscopie photonique) ou de 100  $\mu\text{ci/ml}$  (autoradiographie à haute résolution). Dans le cas de la spermatogenèse, les parapodes renfermant les cellules germinales ont été maintenus dans 1 ml d'eau de mer contenant 50  $\mu\text{ci}$  du précurseur radioactif.

L'incorporation *in vitro* permet les expériences de chasse du précurseur. Après marquage par l'uridine- $^3\text{H}$ , les ovocytes ou les explants sont lavés plusieurs fois dans une solution d'uridine froide (0,5 mM) dans l'eau de mer, puis laissés dans cette solution pendant des durées de 3 à 24 heures avant de procéder à la fixation.

## 2 - Autoradiographie en microscopie photonique

Cette technique a été pratiquée soit sur des coupes provenant de matériel fixé par le liquide de Carnoy et inclus dans la paraffine, soit sur des coupes semi-fines (1  $\mu$  d'épaisseur) obtenues à partir de pièces traitées pour la microscopie électronique.

Les coupes sont recouvertes d'une pellicule sensible (Emulsion K 5 diluée de moitié), par trempage selon la méthode de KOPRIWA et LEBLOND (1962). Au préalable, le précurseur non incorporé est éliminé, dans le cas du matériel inclus dans la paraffine, par traitement des coupes à l'acide perchlorique 1 % à 4°C. Après une période d'exposition de 8 à 15 jours, les autoradiogrammes sont développés par le révélateur Kodak D 19 b. Les coupes sont alors colorées par le rouge nucléaire - picro-indigo-carmin (histologie classique) ou le bleu azur B (coupes semi-fines).

La spécificité des précurseurs a été contrôlée par digestion enzymatique, d'une part sur des coupes déparaffinées, d'autre part sur des coupes semi-fines débarrassées de l'araldite par la méthode de MAYOR *et al.* (1961). Les digestions enzymatiques ont été effectuées à 37°C dans les conditions suivantes : DNase (Sigma, DNase-I) à 0,1 % dans une solution 3mM de  $\text{MgSO}_4$  pH 5,6 ; RNase (Sigma, RNase-A) 0,2 % dans l'eau distillée pH 7 ; Pronase (Sigma, Protéase de *Streptomyces griseus* type VI) 0,01 % dans l'eau distillée pH 6,8.

L'intensité du marquage a été évaluée par mesure de la lumière réfléchie par les grains d'argent, à l'aide du microphotomètre Leitz MPV 1 et de son dispositif pour lumière réfléchie, équipé d'un objectif à immersion 60 X, ouverture numérique 0,95. Pour chaque série expérimentale, la tension appliquée au système de mesure est réglée pour provoquer une déviation de 100 divisions du galvanomètre dans le cas d'une cellule choisie parmi celles qui sont les plus marquées. On obtient ainsi pour chaque mesure, une valeur arbitraire relative, proportionnelle au nombre de grains d'argent présents dans le champ de mesure.

### 3 - Autoradiographie à haute résolution

Après fixation par la glutaraldéhyde les pièces subissent, selon les recommandations de MONNERON et MOULE (1969), un lavage de longue durée destiné à éliminer les molécules de précurseur non incorporées. Le liquide de lavage est renouvelé plusieurs fois en 48 heures avant la postfixation par l'osmium.

Les coupes fines (600 à 700 Å d'épaisseur) sont recouvertes par trempage d'émulsion Ilford L 4, selon la méthode décrite en détail par LARRA et DROZ (1970). Après une exposition de 3 à 6 semaines les autoradiogrammes sont développés soit par le révélateur Kodak Microdol X, soit par la méthode à l'élon-acide ascorbique après "latensification" à l'or (SALPETER et BACHMANN, 1964) adaptée à l'émulsion L 4 par WISSE et TATES (1968).

## V - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

### 1 - Extraction des RNA totaux

L'analyse biochimique des RNA a été effectuée sur des ovocytes ayant subi une incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H *in vivo* (voir paragraphe IV-1). Les ovocytes sont obtenus par ponction du liquide coelomique de plusieurs animaux d'un même diamètre ovocytaire et séparés des coelomocytes par dilution dans l'eau de mer, suivie d'une légère centrifugation. L'opération est répétée plusieurs fois. Les ovocytes sont ensuite homogénéisés dans un tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,4 - NaCl 0,1 M - SDS 0,5 p. 100 - EDTA 1 mM. Les RNA ont été extraits selon la méthode de WILCOCKSON (1973).

### 2 - Fractionnement des RNA

Les RNA sont déposés, à raison de 1,5 unité A 260, sur un gradient linéaire de saccharose (5 - 20 %), réalisé en tampon acétate de sodium 10 mM pH 5 - NaCl 0,1 M - EDTA 1 mM - Sarkosyl 0,1 p. 100 et centrifugés dans le rotor SW 40 d'une ultracentrifugeuse Beckman L5-65, à 4°C pendant 5 heures (202 000 g R<sub>Av</sub>).

Chaque gradient est alors analysé sur le fractionneur automatique ISCO modèle 640. On obtient ainsi directement l'enregistrement à 260 nm du profil des RNA sur lequel on superpose le résultat des comptages de radioactivité effectués (sur des fractions de 0,3 ml) dans un spectromètre à scintillation liquide Intertechnique SL 30.

PREMIERE PARTIE

OVOGENESE

## RAPPEL DES DIFFERENTES ETAPES DE L'OVOGENESE DES *NEREIDAE*

L'étude de l'ovogenèse des *Nereidae* et de sa régulation par l'hormone cérébrale inhibitrice a été réalisée à la fois dans les conditions hormonales naturelles (ovogenèse naturelle) et après suppression expérimentale de l'activité endocrine cérébrale (ovogenèse expérimentale).

### I - OVOGENESE NATURELLE

L'ovogenèse des deux espèces de *Nereidae* étudiées : *Perinereis cultrifera* et *Nereis diversicolor*, se déroule suivant un même schéma général. La subdivision en quatre stades principaux (Fig. 1) est basée sur les modifications du métabolisme cytoplasmique mises en évidence par DHAINAUT (1970a) et PORCHET (1974).

#### 1 - Stade de prévitellogenèse

Le déroulement du stade diplotène de la prophase méiotique s'accompagne d'une diminution puis d'une disparition complète de la coloration de la chromatine par la réaction de Feulgen. C'est à ce moment que commence la période de grand accroissement, caractérisée par une augmentation considérable du volume cellulaire. La prévitellogenèse coïncide avec le début de ce phénomène. Elle peut se définir comme une phase d'élaboration des organites cytoplasmiques.

#### 2 - Stade de vitellogenèse

Les granules de vitellus et les globules lipidiques apparaissent dans les ovocytes d'un diamètre de 30 à 40  $\mu$ . Les granules vitellins s'accroissent par incorporation de vésicules issues de l'appareil de Golgi (DHAINAUT, 1967). Chez *P. cultrifera*, les ovocytes contiennent surtout des globules lipidiques jusqu'à une taille de 60  $\mu$  environ. Ce n'est qu'à partir de cette taille que les granules vitellins commencent à constituer une part notable des réserves ovocytaires, contrairement au cas de *N. diversicolor* chez laquelle les deux types d'inclusions apparaissent simultanément.

#### 3 - Stade d'élaboration des organites corticaux

C'est le stade ovocyttaire qui différencie le plus nettement les deux espèces étudiées.

Chez *P. cultrifera*, les ovocytes atteignent ce stade à un diamètre de 120-130  $\mu$ . L'appareil de Golgi s'oriente alors vers la production de vésicules riches en glycoconjugués (DHAINAUT et PORCHET, 1977b). Ces vésicules golgiennes, qui sont à l'origine des alvéoles corticaux, prennent un développement considérable et sont disséminées dans l'ensemble du cytoplasme.

Chez *N. diversicolor*, la synthèse des glycoconjugués par l'appareil de Golgi est plus tardive que chez *P. cultrifera* et ne débute que très lentement à partir d'un diamètre ovocytaire de 150  $\mu$  environ. Les organites corticaux, qui sont de deux types : alvéoles et granules (DHAINAUT, 1969a) n'apparaissent qu'à une taille de 170-180  $\mu$ . Ils sont beaucoup moins développés que chez *P. cultrifera* et leur élaboration reste confinée au cytoplasme cortical.

#### 4 - Stade de maturité

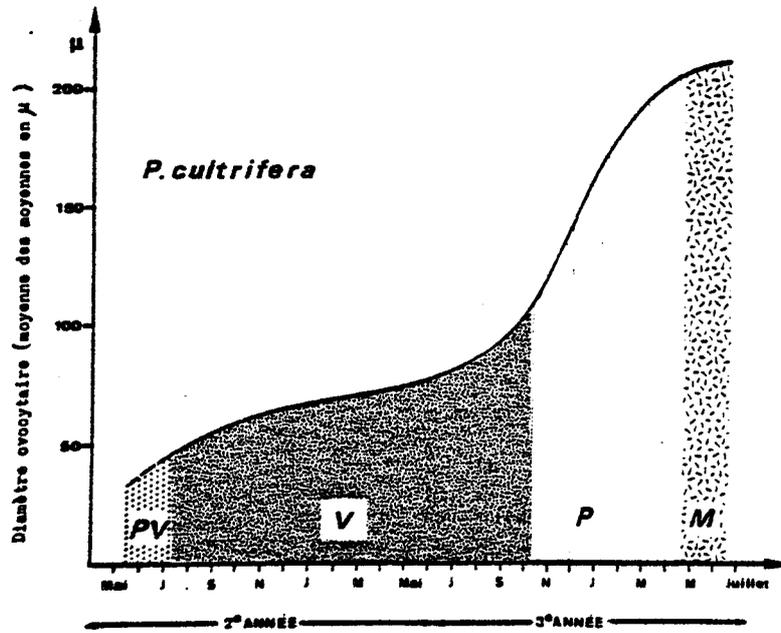
Cette étape ultime de l'ovogénèse est caractérisée par l'arrêt des synthèses cytoplasmiques. Chez *P. cultrifera*, la maturité se traduit par une redistribution des inclusions cytoplasmiques qui se disposent en auréoles concentriques. On distingue, du noyau vers le cortex : une zone périnucléaire riche en ribosomes, les globules lipidiques, les granules vitellins, les alvéoles corticaux. Chez *N. diversicolor*, la maturité ne s'accompagne pas d'une telle ségrégation des constituants du cytoplasme. Il est toutefois possible de caractériser ce stade, au niveau ultrastructural, par l'involution de l'appareil de Golgi et le développement de vésicules intranucléaires (DHAINAUT, 1969b).

## II - OVOGENESE EXPERIMENTALE

La diminution brutale du taux d'hormone provoquée expérimentalement *in vivo* (ablation du cerveau, coupure en deux tronçons) ou *in vitro* (mise en culture de parapodes isolés) entraîne des modifications de l'évolution ovocytaire. Ces modifications sont très différentes selon l'espèce et le stade ovocytaire au moment de l'intervention expérimentale.

### 1 - *Nereis diversicolor*

Chez cette espèce, la suppression expérimentale de l'activité cérébrale provoque des perturbations profondes de l'ovogénèse. L'évolution expérimentale des ovocytes a été étudiée du point de vue biométrique, cytologique et métabolique (BERTOUT et DHAINAUT, 1971).



-  Prévitellogenèse (PV)
-  Vitellogenèse (V)
-  Elaboration des alvéoles corticales riches en polysaccharides (P)
-  Maturité (M)

Figure 1 - Evolution cytologique des ovocytes de *Perinereis cultrifera* en fonction de leur courbe de croissance.  
La durée de vie de *P. cultrifera* est de 3 ans. La phase de grand accroissement ovocytaire commence à la fin de la 1ère année.  
D'après DHAINAUT (1970a).

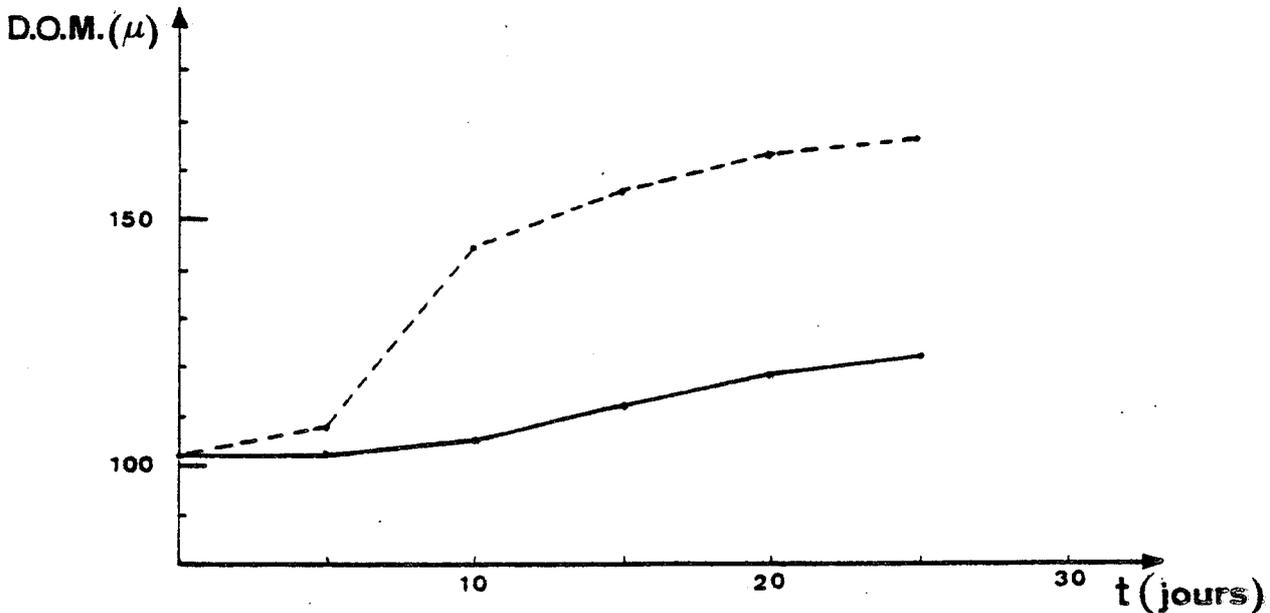


Figure 2 - Croissance ovocytaire chez *Nereis diversicolor*.  
Etude biométrique effectuée sur un lot de 9 animaux récoltés en octobre et dont les ovocytes mesurent de 90 à 110 μ. Evolution du diamètre ovocytaire moyen (D.O.M.) en fonction du temps (t). Les animaux ont été sectionnés en 2 tronçons. — ovocytes témoins provenant de la partie antérieure. — ovocytes prélevés dans la partie postérieure évoluant en absence du facteur hormonal cérébral.  
D'après BERTOUT et DHAINAUT (1971).



En phase de vitellogenèse, la levée de l'inhibition provoque une croissance accélérée par rapport aux ovocytes témoins (Fig. 2). Après une phase de latence de 5 jours, on assiste à une croissance très rapide jusqu'au 10e jour (phase précoce de l'ovogenèse expérimentale) suivie d'une période de croissance plus lente qui aboutit à un plateau au 25e-30e jour (phase tardive de l'ovogenèse expérimentale).

L'étude cytologique et autoradiographique de la phase précoce montre que la croissance rapide de l'ovocyte s'accompagne à la fois d'un arrêt de la vitellogenèse et d'une perturbation de certains processus métaboliques. Tout se passe comme si la cellule, au lieu d'accumuler des substances de réserve, amassait les éléments chargés de l'élaboration de celles-ci (BERTOUT et DHAINAUT, 1971). Il se produit donc chez *N. diversicolor* une déviation du métabolisme ovocytaire qui semble due notamment à la dégénérescence précoce de l'appareil de Golgi, ce qui entraînerait la disparition d'un maillon indispensable à la chaîne d'élaboration du vitellus (DHAINAUT, 1970 a).

La phase tardive de l'ovogenèse expérimentale se distingue par l'arrêt des synthèses cellulaires et présente de ce fait les caractéristiques métaboliques de la phase de maturité de l'ovogenèse naturelle (BERTOUT et DHAINAUT, 1971). Toutefois, les ovocytes acquièrent une morphologie différente de celle qui est observée pendant l'ovogenèse naturelle. Il se produit une redistribution des éléments cytoplasmiques qui évoque celle qui survient naturellement chez *P. cultrifera*.

Pendant le stade d'élaboration des organites corticaux, la levée de l'inhibition hormonale n'a pratiquement aucun effet sur le déroulement ultérieur de l'ovogenèse. En particulier, la croissance est identique à celle des témoins (CLARK et RUSTON, 1963 a).

## 2 - *Perinereis cultrifera*

L'évolution expérimentale des ovocytes de *P. cultrifera* est variable selon la saison pendant laquelle s'effectue l'expérimentation (DHAINAUT et PORCHET, 1967).

En période estivale, l'étude biométrique et l'examen cytologique ne révèlent aucune différence entre les ovocytes évoluant en absence d'hormone et les ovocytes témoins. Cette absence de réponse à la suppression de l'action endocrine n'a pas été élucidée. Il semble qu'en été, les ovocytes se trouvent dans un état de repos relatif.

En période hivernale (Fig. 3), l'évolution expérimentale est fonction du stade ovocytaire atteint au moment de la levée de l'in-

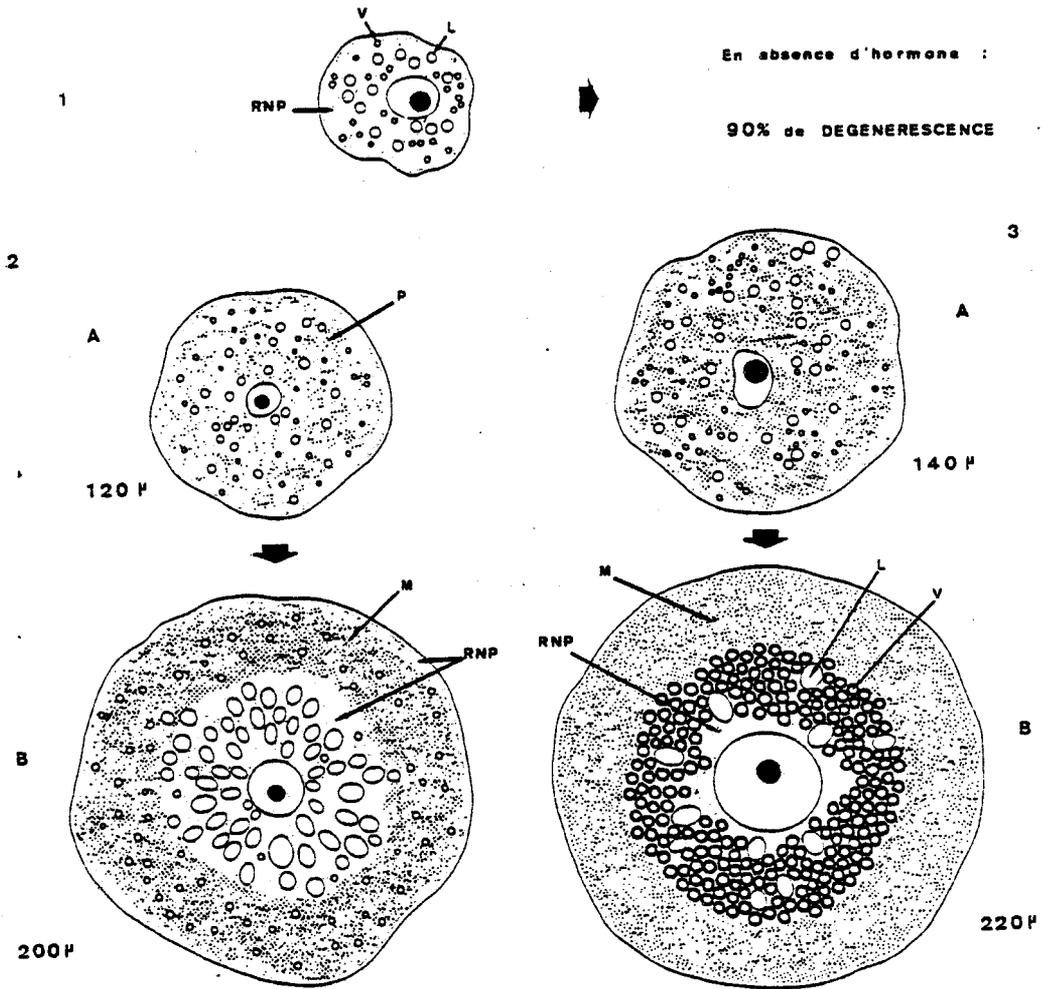


Figure 3 - Effets de la levée expérimentale de l'inhibition endocrine cérébrale sur l'ovogenèse de *P. cultrifera* en période hivernale.

- 1 - Ovocyte d'un animal de 2 ans : répartition des ribonucléoprotéines (RNP), des granules vitellins (V) et des lipides (L).
- 2 - A. Structure d'un ovocyte de 3 ans (120  $\mu$  de diamètre). Noter la présence de polyosides (P) représentés par des pointillés.  
B. 40 jours d'évolution sans hormone cérébrale. Les lobules lipidiques sont groupés au centre de l'ovocyte. Les polyosides présentent une réaction acide (mucopolysaccharides : M) : répartition périphérique mais localisation disséminée parmi les RNP.
- 3 - A. Ovocyte de 3 ans (140  $\mu$  de diamètre). Présence de mucopolysaccharides dans le cytoplasme.  
B. 40 jours d'évolution sans hormone cérébrale. Ségrégation des constituants cytoplasmiques. A la périphérie, présence unique de mucopolysaccharides ; au centre : accumulation des granules vitellins et lipidiques. Migration des RNP du cytoplasme dans la zone périnucléaire.

D'après DHAINAUT et PORCHET (1967).



hibition cérébrale (DHAINAUT et PORCHET, 1967 ; PORCHET, 1974). Les ovocytes d'une taille inférieure à 120  $\mu$  (prévitellogenèse et vitellogenèse) subissent un léger accroissement de taille et dégénèrent. Les ovocytes en fin de vitellogenèse (120-130  $\mu$ ) parviennent à une taille de 200  $\mu$  mais élaborent des alvéoles corticaux anormaux. Par contre, lorsque l'opération est effectuée pendant la phase d'élaboration des alvéoles corticaux, les ovocytes croissent à une vitesse peu différente de celle des témoins et acquièrent une morphologie analogue à celle des ovocytes parvenus naturellement à maturité (DHAINAUT et PORCHET, 1967 ; PORCHET, 1974).

## CHAPITRE I

### ÉVOLUTION DES FORMATIONS NUCLÉOPLASMIQUES AU COURS DE L'OVOGÉNÈSE

L'ultrastructure des constituants du nucléoplasme et des formations cytoplasmiques résultant du transfert de matériel nucléaire est comparable chez les deux espèces étudiées. Ces structures sont néanmoins beaucoup plus développées chez *Perinereis cultrifera* que chez *Nereis diversicolor*. L'exposé sera donc essentiellement consacré aux ovocytes de la première espèce ; nous ne signalerons qu'incidemment les différences existant éventuellement chez *N. diversicolor*.

Contrairement au nucléole (voir chapitres II et III), ces formations ne subissent pas de modifications morphologiquement décelables après suppression expérimentale de l'action hormonale. La description sera, par conséquent, limitée aux observations réalisées dans les conditions naturelles.

#### I - ÉTUDE ULTRASTRUCTURALE DES CONSTITUANTS NUCLEOPLASMIQUES

Au début du grand accroissement ovocytaire, le noyau ovocytaire renferme, outre un nucléole en cours de reconstitution (voir chapitre II), des chromosomes méiotiques qui subissent la décondensation caractéristique du stade diplotène dans la lignée femelle. Ce processus arrive à son terme

avant la fin du stade de prévitellogénèse. A partir de ce moment, et à l'opposé de la morphologie nucléolaire qui subit une évolution spectaculaire (voir chapitre II), la structure des constituants nucléoplasmiques restera pratiquement constante pendant toute la période de grand accroissement.

#### 1 - Décondensation des chromosomes

Dans les ovocytes parvenus au stade diplotène de la prophase méiotique, les noyaux mesurent environ 5  $\mu$ . Le phénomène de décondensation des chromosomes s'accompagne d'une augmentation sensible de la taille nucléaire. Lorsque le noyau atteint un diamètre de 6  $\mu$  (Pl. I, fig. a), on constate que le processus de dispersion de la chromatine est déjà engagé. Il est possible d'identifier les bivalents bien que les coupes fines rendent difficilement compte de la structure des chromosomes. Ceux-ci se présentent sous forme de massifs de chromatine condensée de 1 à 2  $\mu$  de longueur (Pl. I, fig. a). La décondensation des chromosomes se traduit par l'existence, à la périphérie des bivalents, d'un matériel fibrillaire de texture très lâche qui semble provenir de la dispersion de la chromatine condensée (Pl. I, fig. b). Le nucléoplasme situé au voisinage des bivalents renferme également des structures très opaques aux électrons : les "amas denses". Ces derniers, d'une taille qui varie de 400 à 1 000 Å, ont une forme assez régulière, approximativement sphérique (Pl. I, fig. a et b et Pl. II, fig. a).

Dans les ovocytes légèrement plus âgés, dont le noyau atteint un diamètre de 7 à 8  $\mu$ , le processus de dispersion de la chromatine a notablement progressé (Pl. I, fig. b), les massifs de chromatine ne dépassent plus une taille de 0,3 à 0,4  $\mu$ . Parallèlement, on assiste à un développement tel du matériel fibrillaire clair, qu'il enrobe parfois plusieurs amas de chromatine condensée (Pl. I, fig. b).

L'étape ultime de la décondensation des chromosomes méiotiques est atteinte dans les ovocytes d'un diamètre de 20  $\mu$ , dont les noyaux mesurent environ 10  $\mu$  (Pl. I, fig. c). Les mottes de chromatine condensée ne sont plus décelables tant par l'observation au microscope électronique (Pl. II, fig. a) que par la réaction de Feulgen (DHAINAUT, 1970a). Seuls subsistent le matériel fibrillaire clair et les amas denses.

## 2 - Structure des constituants nucléoplasmiques pendant la phase de grand accroissement ovocytaire

Les chromosomes en cours de décondensation sont disséminés dans l'ensemble du volume nucléaire. Mais lorsque la dispersion de la chromatine arrive à son terme, le matériel issu de ce processus se trouve repoussé à la périphérie du noyau par le nucléole qui migre, à ce moment, depuis l'enveloppe nucléaire vers le centre du noyau (voir chapitre II). Le nucléole va d'ailleurs contribuer, par les formations provenant de la désagrégation de son cortex granulaire, à accroître la quantité de matériel qui occupe le nucléoplasme périphérique. Elles constituent avec les structures d'origine chromosomique ce qui a été appelé les "granulations nucléoplasmiques" (DHAINAUT, 1970 a, 1972).

### A - Structure du matériel d'origine chromosomique

Les constituants issus de la décondensation des chromosomes ne sont pas disposés uniformément le long de l'enveloppe nucléaire. L'observation à faible grossissement montre au contraire qu'ils sont regroupés en plusieurs unités séparées les unes des autres par des zones de nucléoplasme beaucoup moins riche en granulations (Pl. I, fig. c). Chacune de ces unités est composée d'amas denses disposés à la périphérie de plusieurs plages de matériel fibrillaire clair (Pl. II, fig. a et b), dont certaines sont accolées à la face interne de l'enveloppe nucléaire (Pl. II, fig. a).

Le matériel fibrillaire clair constitue des formations à contour très irrégulier et de taille variée (0,2 à 0,7  $\mu$ ). A fort grossissement (Pl. II, fig. c), on observe que les éléments de base de ce matériel sont des fibrilles de 20 Å de diamètre, assemblées en fibres d'une épaisseur de 200 Å environ. Celles-ci sont enchevêtrées en une trame assez lâche qui donne à ce constituant son aspect relativement peu contrasté à plus faible grossissement (Pl. II, fig. a et b). Les différentes plages sont reliées entre-elles par des fibres solitaires, non enchevêtrées (Pl. II, fig. c). Il semble par conséquent que le matériel fibrillaire clair d'une même unité constitue en fait un réseau continu.

Les amas denses présentent les mêmes caractères que depuis de début du processus de décondensation des chromosomes, aussi bien du point de vue de leur forme, sensiblement sphérique, que de leur taille qui oscille entre 400 et 1 000 Å (Pl. II, fig. a et b). Ils montrent parfois un aspect plus polymorphe et des dimensions plus hétérogènes qui résultent, en fait, de l'agrégation de plusieurs amas (Pl. II, fig. b). A un grossissement

élevé, on constate qu'ils sont constitués d'un feutrage très serré de fibrilles dont le diamètre varie de 20 à 50 Å. Les amas denses sont toujours situés dans le voisinage d'une plage de matériel fibrillaire clair (Pl. II, fig. a, b et c) et il semble qu'il existe des relations étroites entre ces deux catégories de constituants. En effet, sur certaines coupes dont le plan est favorable, le contact, sinon la continuité, entre les amas denses et les fibres de 200 Å est évident (Pl. II, fig. c).

#### B - Structure du matériel d'origine nucléolaire

Le cortex granulaire du nucléole se dissocie en fragments d'une taille de 0,1 à 0,2 µ, constitués de granules de 150 Å enrobés dans une matrice fibrillaire dense (Pl. III, fig. a). Ce processus est particulièrement actif dans les ovocytes en vitellogenèse d'un diamètre de 40 à 80 µ. Les fragments du cortex nucléolaire sont facilement identifiables dans le voisinage immédiat du nucléole où ils occupent une zone nucléoplasmique périnucléolaire d'une épaisseur de 1 µ environ (Pl. III, fig. a). Il est également possible d'observer certaines de ces formations le long de l'enveloppe nucléaire, mêlées au matériel d'origine chromosomique (Pl. II, fig. a).

Mais, la plupart du temps, les fragments du cortex granulaire subissent des modifications qui leur font perdre très rapidement leur nature granulaire typique. En effet, à proximité immédiate de la zone périnucléolaire riche en fragments du cortex, on observe des amas de même taille, constitués de la même matrice fibrillaire dense, mais dont les granules sont difficilement discernables (Pl. III, fig. a). Ces formations migrent ensuite dans la région marginale du noyau où il devient difficile de les différencier des amas denses d'origine chromosomique.

## II - ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES TRANSFERTS NUCLEOCYTOPLASMIQUES

### 1 - Extrusion du matériel nucléaire

Le passage de matériel à travers les pores de l'enveloppe nucléaire est très intense dans les ovocytes des deux espèces étudiées. Des extrusions nucléaires sont visibles dès le début du phénomène de décondensation des chromosomes. Avant même que la dispersion de la chromatine soit complète, les extrusions sont suffisamment importantes pour s'agglomérer en amas de taille conséquente autour desquels se groupent

des mitochondries (Pl. III, fig. b). Ce processus s'amplifie avec l'augmentation du nombre de pores nucléaires, qui accompagne l'accroissement de la surface nucléaire. Il atteint un maximum pendant la vitellogenèse et ne se ralentit de manière sensible qu'à partir de la seconde moitié du stade d'élaboration des organites corticaux.

Pendant les stades où les transferts nucléocytoplasmiques sont intenses, les pores nucléaires sont obturés par un matériel fibrillaire relativement dense aux électrons (Pl. III, fig. c). Ce constituant est en relation avec les amas denses des granulations nucléoplasmiques. Ces derniers se trouvent maintenus à une certaine distance (0,1  $\mu$  environ) de l'enveloppe nucléaire. Le matériel fibrillaire qui les constitue n'est en contact avec le contenu du pore qu'au niveau de l'anneau (Pl. III, fig. c). De même, le passage du matériel nucléaire dans le cytoplasme semble s'effectuer uniquement par cette région du pore (Pl. II, fig. c). Le matériel extrudé s'agglomère en amas fibrillaires de 1 000 Å environ, à une distance de 300 Å de l'enveloppe nucléaire (Pl. II, fig. c et Pl. III, fig. d).

## 2 - Evolution des extrusions dans le cytoplasme

Les amas fibrillaires extrudés s'éloignent de l'enveloppe nucléaire en fusionnant entre eux pour constituer les "agrégats cytoplasmiques" (DHAINAUT, 1970b). La taille de ces formations s'accroît rapidement au fur et à mesure de leur migration dans le cytoplasme (Pl. III, fig. d). Elles ne s'éloignent toutefois pas du noyau au delà d'une distance de 2 à 3  $\mu$ , où elles atteignent leur taille maximale.

A ce stade, chez *P. cultrifera*, les agrégats cytoplasmiques ont approximativement la forme de sphères de 1  $\mu$  de diamètre (Pl. III, fig. e et Pl. IV, fig. a). Ils prennent un développement considérable dans les ovocytes en cours de vitellogenèse (60-100  $\mu$ ), où ils s'associent en files atteignant parfois une longueur de 5 à 6  $\mu$  (Pl. III, fig. e). Des mitochondries entrent souvent en contact étroit avec les agrégats (Pl. IV, fig. a), mais ce cas n'est pas général (Pl. IV, fig. c).

Chez *N. diversicolor*, les agrégats cytoplasmiques ont une taille plus modeste qui dépasse rarement 0,8  $\mu$  (Pl. IV, fig. b). Par ailleurs, leur association avec les mitochondries est moins fréquente. Lorsqu'il existe, le contact entre ces organites et le matériel fibrillaire des agrégats semble beaucoup plus lâche que chez *P. cultrifera* (Pl. IV, fig. b).

L'observation à un grossissement élevé montre que les agrégats sont constitués d'un feutrage de fibrilles de 40 à 50 Å de diamètre (Pl. IV, fig. c). Dans la partie la plus externe, les fibrilles apparaissent disposées

en une trame beaucoup moins serrée. On observe, au sein de ce matériel plus diffus, des granules d'une taille légèrement inférieure ou égale à celle des ribosomes (Pl. IV, fig. c).

### III - DISCUSSION

#### 1 - Structure des chromosomes décondensés

La localisation du matériel chromosomique dans la vésicule germinative des ovocytes de *Nereidae* a posé un problème dès les premières études consacrées à ces cellules. En effet, DHAINAUT (1972) avait déjà signalé l'impossibilité de déceler la chromatine pendant la période d'accroissement ovocytaire, tant en microscopie photonique par la réaction de Feulgen, que par l'examen au microscope électronique. La "déspiralisation" des chromosomes, accompagnée d'une diminution ou d'une disparition de leur colorabilité par les techniques usuelles, est d'ailleurs une caractéristique générale de la méiose dans la lignée femelle (RAVEN, 1961). Ce processus de décondensation des chromosomes pendant le stade diplotène de la prophase, aboutit aux structures dites "en écouvillon" ou "lampbrush" observées non seulement dans les ovocytes d'Amphibiens mais également chez de nombreuses espèces animales (revue dans BAUMEISTER, 1973). Dans certains cas la décondensation se poursuit au delà du stade lampbrush, ce qui justifie selon certains auteurs (FRANCHI *et al.*, 1962 ; HOLLAND et GIESE, 1965), une subdivision supplémentaire de la prophase : le stade dictyé.

Les chromosomes des ovocytes de *Nereidae* présentent des analogies certaines avec ces types d'organisation. L'étude ultrastructurale du processus de décondensation montre qu'il est très semblable à celui de la formation des chromosomes dictyés chez l'Oursin (BAL *et al.*, 1969). Le matériel fibrillaire clair dont nous avons suivi le développement au contact de la chromatine condensée des bivalents rappelle très nettement la chromatine dispersée de "l'enveloppe fibrillaire" des chromosomes plumeux humains (BAKER et FRANCHI, 1967) et celle des chromosomes dictyés de l'ovocyte de Souris (CHOUINARD, 1975).

Il est donc tout-à-fait vraisemblable que ce constituant du nucléoplasme de l'ovocyte des *Nereidae* représente la chromatine des bivalents sous une forme très dispersée. Une telle interprétation pose le problème de la localisation du DNA dans ces structures. Or, les techniques de cytochimie ultrastructurale utilisées : fixation d'actinomycine D tri-

tiée selon GEUSKENS (1974) (DHAINAUT, communication personnelle), méthodes de MOYNE (1973) et de COGLIATI et GAUTIER (1973), n'ont donné aucun résultat. Si la réaction négative au test de Feulgen peut s'expliquer assez facilement par le fait que la taille de ces formations se situe en dessous du pouvoir de résolution du microscope photonique, les résultats négatifs obtenus avec les techniques de cytochimie ultrastructurale sont plus difficilement interprétables. Certaines de ces méthodes sont pourtant capable de mettre en évidence le DNA au niveau de la chromatine dispersée (DERENZINI, 1979). Il faudrait admettre que, dans le matériel fibrillaire clair du nucléoplasme de l'ovocyte des *Nereidae*, la dilution extrême du DNA situe sa concentration en dessous du seuil de sensibilité des réactions cytochimiques utilisées. Une autre possibilité est que le matériel fibrillaire clair constitue une forme très modifiée de la chromatine avec, par exemple, adjonction de protéines qui rendraient très difficile l'accessibilité du DNA aux différents réactifs.

Les amas denses que nous avons observés en association avec le matériel fibrillaire clair semblent avoir leur équivalent aussi bien dans les chromosomes plumeux que dans les chromosomes dictyés. Dans les ovocytes d'Amphibiens, la matrice des boucles des chromosomes plumeux est constituée par des agrégats de "particules" denses aux électrons (MALCOLM et SOMMERVILLE, 1974 ; MOTT et CALLAN, 1975). De même, des structures opaques aux électrons ont été décrites en association avec la chromatine dispersée des chromosomes plumeux de l'ovocyte humain (BAKER et FRANCHI, 1967) et des chromosomes dictyés de l'Oursin (BAL *et al.*, 1969) et de la Souris (CHOUINARD, 1975). Toutes ces formations rappellent les amas denses des chromosomes méiotiques des *Nereidae*, tant par leur association constante avec les chromosomes que par leur densité élevée aux électrons.

Selon CHOUINARD (1975), les granules opaques des ovocytes de Souris seraient impliqués dans le processus de condensation des bivalents. Ils auraient par conséquent un rôle tout à fait différent des particules ribonucléiques associées aux chromosomes plumeux d'Amphibiens, la présence de ces particules étant liée à la transcription de RNA à partir du DNA de l'axe des boucles (MALCOLM et SOMMERVILLE, 1974). Dans le cas des ovocytes de *Nereidae*, il est peu probable que les amas fibrillaires denses interviennent dans la condensation des chromosomes. Ils auraient plutôt une signification proche de celle de la matrice des boucles des chromosomes plumeux. D'une part, ces structures se développent au fur et à mesure de la déspiralisation des bivalents et non parallèlement à leur condensation comme chez la Souris. D'autre part, l'étude autoradiographique montre que ces formations sont fortement marquées après une incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H (voir chapitre IV).

En conclusion, il semble que les chromosomes méiotiques des *Nereidae* se trouvent, pendant la phase d'accroissement ovocytaire, sous une forme proche de celle des chromosomes plumeux et dictyés. Ils seraient constitués de fibres de chromatine très dispersée et de structures fibrillaires denses, expression morphologique de la transcription des RNA extranucléolaires.

## 2 - Nature des agrégats cytoplasmiques

Les ovocytes des *Nereidae* renferment des "agrégats cytoplasmiques" dont l'étude ultrastructurale montre qu'ils résultent de l'accumulation de matériel extrudé par les pores de l'enveloppe nucléaire, aussi bien chez les deux espèces (*N. diversicolor*, *P. cultrifera*) qui font l'objet de ce travail, que chez *N. pelagica* (DHAINAUT, 1970b). La cytochimie (DHAINAUT, 1970b) et l'autoradiographie (DHAINAUT, 1970b et chapitre IV) ont démontré que ces structures étaient de nature ribonucléoprotéique. Il semble que les "agrégats cytoplasmiques" puissent être rapprochés des formations RNP décrites dans le cytoplasme des cellules germinales de l'ensemble du règne animal. Ces constituants cytoplasmiques, qui ont fait l'objet d'abondantes revues bibliographiques (CLEROT, 1968, 1976 ; KALT, 1973 ; EDDY, 1975), ont reçu des appellations diverses. EDDY (1975) propose de leur donner le nom de "nuages" selon le terme employé pour la première fois par ANDRE et ROUILLER (1957). Les "nuages" se trouvent souvent en contact avec les mitochondries à un moment quelconque de leur évolution, et reçoivent alors le nom de "ciment intermitochondrial" (CLEROT, 1968). Plusieurs thèses ont été avancées en ce qui concerne le rôle des "nuages" et du "ciment intermitochondrial". Pour certains auteurs, ce type de structure représenterait une forme de stockage du RNA messager (WEAKLEY, 1971) ou ribosomien (DHAINAUT, 1970b) et serait à l'origine du cytoplasme germinal (KALT, 1973 ; EDDY, 1975). Dans ce cas, l'association avec les mitochondries n'aurait d'autre signification que de fournir l'énergie nécessaire aux transformations métaboliques qui se dérouleraient au sein des constituants des "nuages" (EDDY et ITO, 1971 ; SCHJEIDE *et al.*, 1972). Pour d'autres auteurs, au contraire, le "ciment intermitochondrial" est le site de synthèse des protéines destinées à être incorporées dans les mitochondries (TOURY *et al.*, 1977 ; CLEROT, 1979).

En ce qui concerne les agrégats cytoplasmiques des ovocytes des *Nereidae*, la fréquente relation de ces structures avec des granules d'une taille proche de celle des ribosomes a incité DHAINAUT (1970b)

à leur prêter un rôle dans le stockage des rRNA et l'élaboration des ribosomes. L'étude du métabolisme des RNA, réalisée aux différents stades de l'ovogenèse (voir chapitre IV), nous met en mesure d'apporter des précisions dans le cadre de cette hypothèse. En effet, cette étude montre que la synthèse des RNA extranucléolaires (rRNA 5S, tRNA, hnRNA) débute avant celle des rRNA 18 et 28 S, selon un mécanisme comparable à celui de l'ovogenèse des Vertébrés inférieurs (DENIS, 1977). Or, les agrégats cytoplasmiques sont surtout développés dans les ovocytes jeunes et apparaissent avant même que le nucléole soit constitué et que la synthèse des rRNA 18 et 28 S s'accomplisse. On peut donc envisager que ces structures soient, non des formes de stockage du rRNA d'origine nucléolaire, mais plutôt un lieu d'accumulation de RNA non nucléolaire, par exemple du rRNA 5 S synthétisé en excès au début de l'ovogenèse. On conçoit alors facilement qu'une des étapes de l'élaboration des ribosomes, qui nécessite la réunion du rRNA 5 S au rRNA 18 et 28 S, se situe au niveau des agrégats cytoplasmiques.

## CHAPITRE II

### ÉVOLUTION DU NUCLÉOLE AU COURS DE L'OVOGENÈSE NATURELLE

#### I - ETUDE MORPHOLOGIQUE

##### 1 - *Nereis diversicolor*

##### A - Stade de prévitellogenèse

Le nucléole de l'ovocyte se reconstitue pendant le processus de dispersion des chromosomes. Alors que la chromatine condensée est encore visible sous forme de mottes de 0,2  $\mu$  environ, le nucléole forme une masse arrondie en contact avec la chromatine marginale accolée à l'enveloppe nucléaire (Pl. V, fig. a). A ce stade, l'organite est constitué essentiellement par un matériel de nature fibrillaire qui se répartit en deux zones. La région centrale, située au contact de la chromatine marginale, possède une densité aux électrons légèrement plus faible que la zone périphérique par suite de la disposition plus lâche des fibrilles et de la présence de petites vacuoles. Le pourtour de l'organite est en relation avec des mottes de chromatine condensée (Pl. V, fig. a).

Le constituant granulaire, très peu développé à ce stade, n'est présent que sous forme de quelques éléments à la périphérie de la zone fibrillaire dense. Il ne prend une importance appréciable qu'à la fin de

la prévitellogenèse, lorsque le nucléole perd son contact avec l'enveloppe nucléaire et migre vers le centre du noyau. Le constituant granulaire forme alors une "coiffe" à l'un des pôles de la sphère nucléolaire (Pl. V, fig. b).

#### B - Stade de vitellogenèse

Ce stade est caractérisé par le développement de la coiffe granulaire qui s'étend progressivement à toute la périphérie du composant fibrillaire. Le nucléole se trouve ainsi constitué de 3 zones concentriques (Pl. V, fig. c) : un cortex granulaire et les deux zones fibrillaires déjà présentes au stade précédent.

##### a) Constituant granulaire

L'observation à fort grossissement montre que le cortex nucléolaire est formé de granules de 150 Å enrobés dans une matrice fibrillaire relativement dense aux électrons. Ce constituant est disposé en trabécules de 1 000 Å d'épaisseur, anastomosées en une sorte de réseau. Les espaces compris entre les mailles de ce réseau sont d'une densité comparable à celle du nucléoplasme (Pl. V, fig. d). Les trabécules les plus externes se dissocient en fragments (Pl. V, fig. e) qui migrent ensuite dans la région périphérique du noyau où ils participent à la formation des granulations nucléoplasmiques (voir chapitre I).

##### b) Constituant fibrillaire dense

A faible grossissement, ce constituant apparaît sous forme d'une couronne d'aspect homogène et de densité élevée aux électrons, limitée extérieurement par le cortex granulaire et intérieurement par le constituant fibrillaire clair. L'observation à fort grossissement de coupes très fines (Pl. V, fig. f) permet de constater qu'il est constitué de fibrilles d'un diamètre assez uniforme de 50 Å. En certains points, leur disposition en un feutrage très serré donne naissance à des amas denses de 500 à 1 000 Å (Pl. V, fig. f).

##### c) Constituant fibrillaire clair

Ce second composant nucléolaire de nature fibrillaire apparaît beaucoup moins homogène que le précédent. Cette hétérogénéité est due à l'existence d'un réseau de fines lacunes qui lui confère une densité plus faible que celle de la couronne fibrillaire. Les lacunes s'élargissent parfois en vacuoles dont certaines atteignent une taille de 1 à 2 μ (Pl. V, fig. c).

### C - Stade d'élaboration des organites corticaux

La morphologie typique que nous venons de décrire se rencontre essentiellement au début de la vitellogenèse. Au fur et à mesure du déroulement de cette dernière, la structure du nucléole évolue pour aboutir à une organisation tout à fait différente qui sera caractéristique du stade d'élaboration des organites corticaux.

Certains éléments de cette évolution apparaissent très tôt. C'est le cas des transformations concernant les constituants fibrillaires. En effet, à partir d'un diamètre ovocytaire de 70-80  $\mu$ , la couronne fibrillaire dense prend une importance croissante. Son développement semble s'effectuer au détriment de la zone fibrillaire claire qui devient de plus en plus difficile à discerner. Dans les ovocytes de 130-140  $\mu$ , la zone fibrillaire dense devient le seul constituant fibrillaire visible. Elle se fragmente alors en plusieurs plages (Pl. VI, fig. a).

La zone granulaire subit, elle aussi, des modifications progressives, à partir d'une taille ovocytaire de 100  $\mu$  environ. L'organisation typique en trabécules disparaît peu à peu. Puis on assiste à une diminution du nombre des granules. Lorsque le stade d'élaboration des organites corticaux est atteint (diamètre ovocytaire de 150  $\mu$  environ), ce constituant présente un aspect caractéristique. Il est formé de granules de 150 Å disséminés parmi des fibrilles issues de la matrice des trabécules (Pl. VI, fig. b). Cette nouvelle organisation confère à ce matériel une nature fibrillo-granulaire, terme que nous utiliserons à ce stade pour qualifier ce composant du nucléole.

A partir d'un diamètre ovocytaire de 150  $\mu$  environ, le nucléole présente donc une organisation tout fait différente de celle qui caractérise le stade de vitellogenèse. Il est formé de plages fibrillaires denses dispersées dans un constituant fibrillo-granulaire (Pl. VI, fig. a). A la fin du stade d'élaboration des organites corticaux, les plages fibrillaires tendent à se regrouper en une zone dense qui apparaît, en coupe, sous forme d'un anneau (Pl. VI, fig. c).

### D - Stade de maturité

Durant la phase ultime de l'évolution du nucléole, ses constituants se ségrègent en deux hémisphères de densité différente aux électrons, caractérisés chacun par un type particulier de vacuoles (Pl. VII, fig. a). On assiste en même temps à la désagrégation de l'organite, processus qui semble à l'origine des nombreux "micronucléoles" qui envahissent le nucléoplasme (Pl. VII, fig. c).

a) Hémisphère dense

Il est constitué d'un feutrage de fibrilles très serrée qui confère à cette partie du nucléole la densité élevée qui la caractérise. Les vacuoles, d'un diamètre de plusieurs microns, sont particulièrement nombreuses dans cet hémisphère. Elles possèdent un contenu fibreux issu de la dispersion du matériel nucléolaire situé sur leur pourtour (Pl. VII, fig. b). Le réseau vacuolaire est en communication avec le nucléoplasme par suite de la fragmentation du bord externe des vacuoles les plus périphériques (Pl. VII, fig. a). Ce processus donne naissance à des formations denses de 0,5  $\mu$  environ qui constituent l'un des types de micronucléoles.

b) Hémisphère clair

Cette zone est formée d'un matériel fibrillaire de plus faible densité que celui de l'autre hémisphère (Pl. VII, fig. b). Ce matériel semble provenir du composant fibrillo-granulaire dont les granules disparaissent progressivement au cours du stade précédent. Les vacuoles sont en général de petite taille (0,5  $\mu$ ) et possèdent un contenu diffus (Pl. VII, fig. a). La périphérie de cet hémisphère ne subit pas de dislocation et son contour est donc nettement plus régulier que celui de l'autre région du nucléole.

c) Micronucléoles

Au stade de maturité, la vésicule germinative est envahie par de nombreuses formations dont la structure rappelle celle du matériel nucléolaire et que nous avons appelées pour cette raison "micronucléoles". Ils sont de deux types (Pl. VII, fig. c). Les micronucléoles denses, d'une taille assez régulière de 0,5  $\mu$ , sont les plus nombreux. Ils proviennent vraisemblablement de la fragmentation de l'hémisphère dense du nucléole. Les micronucléoles clairs sont plus rares que les premiers et sont de plus grande taille (1 à 5  $\mu$ ). Leur texture assez lâche rappelle celle de l'hémisphère clair. Mais aucune figure de fragmentation de ce composant n'ayant été observée, l'origine de ce second type de micronucléoles est assez énigmatique.

## 2 - Perinereis cultrifera

### A - Stade de prévitellogenèse

La phase de reconstitution du nucléole présente de légères différences par rapport à celle décrite chez *N. diversicolor*. D'autre part, le plus grand développement, chez *Perinereis cultrifera*, des éléments chromosomiques, nous a permis d'étudier avec plus de précision les relations entre la chromatine de l'organisateur nucléolaire et les constituants du nucléole.

Comme chez *N. diversicolor*, le nucléole apparaît, au cours de la phase de dispersion des chromosomes sous forme d'une masse arrondie, accolée à l'enveloppe nucléaire (Pl. VIII, fig. a). L'organite s'édifie à partir d'un matériel relativement peu opaque aux électrons, formé de fibrilles d'un diamètre de 50 Å. Ces fibrilles se trouvent en continuité directe avec une motte de chromatine condensée qui représente vraisemblablement la région de l'organisateur nucléolaire (Pl. VIII, fig. a).

Le constituant granulaire apparaît, sous forme de massifs très denses, à la périphérie du composant fibrillaire. Les granules de 150 Å sont enrobés dans une matrice constituée de fibrilles disposées en un feutrage uniforme et très serré qui rend ce matériel très opaque aux électrons (Pl. VIII, fig. a et b). Le constituant granulaire est en rapport à sa périphérie avec des mottes de chromatine (Pl. VIII, fig. a et b). Mais, contrairement au cas de la zone fibrillaire, il n'existe pas de continuité directe entre la chromatine condensée et les massifs granulaires. La relation s'établit par l'intermédiaire de fibrilles vraisemblablement issues de la décondensation de la chromatine (Pl. VIII, fig. b).

A un stade légèrement plus avancé, le nucléole s'éloigne de l'enveloppe nucléaire. En même temps, le composant granulaire, disposé initialement en quelques massifs à la périphérie de la zone fibrillaire, s'étend progressivement sur tout le pourtour de cette dernière (Pl. VIII, fig. c). A cette étape de leur élaboration, les constituants du nucléole sont encore en relation avec la matériel issu de la décondensation des chromosomes (Pl. VIII, fig. c).

### B - Stade de vitellogenèse

Ce stade est caractérisé par une certaine diversité de la morphologie nucléolaire, due essentiellement à l'organisation du constituant fibrillaire. Le cortex granulaire a, par contre, une structure constante, tout à fait identique à celle décrite chez *Nereis diversicolor*.

Dans certains cas, rencontrés le plus souvent dans les ovocytes en début de vitellogenèse, le nucléole est composé de 3 zones concentriques (Pl. VIII, fig. d), comme chez *N. diversicolor*. Par contre, dans d'autres ovocytes, la morphologie nucléolaire est tout à fait différente. L'organite est formé d'une zone centrale très peu opaque aux électrons et d'un cortex granulaire beaucoup plus dense (Pl. VIII, fig. e). A fort grossissement, on constate que la zone centrale renferme des fibrilles organisées des deux formes : une forme très dispersée qui constitue une matrice très transparente aux électrons, et une forme très serrée qui donne naissance à des amas denses de 1 000 Å environ, disséminés dans la matrice claire (Pl. VIII, fig. f). Certains plans de coupe favorables permettent de constater que les relations observées au stade précédent, entre le constituant fibrillaire et des éléments chromosomiques existent toujours (Pl. IX, fig. a et b).

#### C - Stade d'élaboration des alvéoles corticaux

Comme chez *N. diversicolor*, le début de ce stade est marqué par la transformation du cortex granulaire en un constituant de nature fibrillo-granulaire. Mais chez *P. cultrifera*, le matériel fibrillo-granulaire n'est pas élaboré seulement à la périphérie du constituant fibrillaire mais au sein même de ce dernier. On assiste en effet à la formation, dans la zone centrale fibrillaire, de massifs fibrillo-granulaires qui peuvent atteindre une taille de 3 à 4  $\mu$  (Pl. IX, fig. c). Dans les ovocytes plus âgés (150-160  $\mu$ ), ces formations fusionnent en une seule masse centrale et le nucléole se trouve ainsi constitué de trois zones concentriques : une couronne fibrillaire claire limitée intérieurement et extérieurement par un composant fibrillo-granulaire dense (Pl. IX, fig. d).

#### D - Stade de maturité

L'analyse de la fin de l'évolution nucléolaire n'a pas été aussi détaillée que chez *N. diversicolor*. L'observation de vésicules germinatives d'ovocytes de 240-250  $\mu$  permet de constater que le nucléoplasme est envahi par des amas denses issus de la fragmentation du nucléole. De forme assez régulière, ces formations fibrillaires ont une taille de 0,8 à 2  $\mu$  (Pl. IX, fig. e).

II - ETUDE CYTOCHIMIQUE

1 - Réactions de mise en évidence du RNA et des protéines

Cette étude a été réalisée en microscopie photonique essentiellement chez *Nereis diversicolor*. Les résultats obtenus aux différents stades du grand accroissement ovocytaire sont récapitulés dans le tableau 2.

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

a - Stade de vitellogenèse

Zones nucléolaires	RNA	Protéines basiques liées au RNA	Protéines basiques libres	Acidophilie totale (NH <sub>2</sub> libres)	Protéines acides	Protéines sulfhydrylées
Cortex granulaire	++	++	-	+	++	-
Couronne fibrillaire dense	+	+	+	++	++	+
Zone fibrillaire claire	++	++	-	+	++	++

b - Stade d'élaboration des organites corticaux

Zone fibrillo-granulaire	+	+	-	+	++	+
Zone fibrillaire	++	++	+	++	++	++

A - Stade de vitellogenèse

La plupart des réactions cytochimiques utilisées mettent en évidence les trois zones concentriques observées en microscopie électronique. Ainsi, après coloration par le bleu de toluidine à pH 4,2, le cortex apparaît constitué d'un matériel granuleux, très basophile ; la couronne fibrillaire dense présente un aspect homogène et une basophilie plus faible ; le constituant fibrillaire clair forme une zone centrale colorée de manière sensiblement identique au cortex granulaire (Pl. X, fig. a). La disparition de la coloration après digestion par la ribonucléase montre que la basophilie mise en évidence dans les conditions précédentes est due au RNA.

L'étude cytochimique des protéines permet de retrouver les trois zones précédemment décrites. La répartition des protéines basiques

présente une grande analogie avec celle du RNA. Leur mise en évidence par la méthode d'ALFERT et GESCHWIND (1953) se traduit en effet par une coloration moins intense dans la couronne fibrillaire dense que dans la région centrale et le cortex (Pl. X, fig. b). Par contre, seule la zone fibrillaire dense retient le fast green lorsque la coloration est effectuée sans hydrolyse préalable des acides nucléiques. De même, l'acidophilie totale (fonctions amines libres) est beaucoup plus importante dans cette région que dans les deux autres parties du nucléole (Pl. X, fig. c). Ces résultats suggèrent que les protéines basiques des zones centrale et corticale se trouvent sous forme de complexes avec le RNA et que la couronne fibrillaire dense renferme des protéines basiques à l'état libre.

Les protéines acides sont distribuées de manière uniforme dans les trois zones du nucléole comme le montre la coloration par le bleu de toluidine à pH 9 selon la méthode de SMETANA et BUSCH (1966). Par contre, chacune des trois zones du nucléole présente une teneur différente en protéines sulfhydrilées. En effet, la réaction au D.D.D. de BARNETT et SELIGMANN (1952) donne une coloration très intense dans la zone fibrillaire centrale, plus faible dans la couronne fibrillaire dense et pratiquement nulle dans la zone corticale (Pl. X, fig. d).

#### B - Stade d'élaboration des organites corticaux

Après coloration par le bleu de toluidine à pH 4,2, la répartition de la basophilie permet de distinguer deux constituants comme en microscopie électronique : une zone d'aspect granuleux qui correspond au constituant fibrillo-granulaire, et un composant homogène disposé sous forme d'un anneau ou d'un disque central, qui représente le constituant fibrillaire. Ce dernier se colore par le bleu de toluidine de manière généralement plus intense que le composant fibrillo-granulaire (Pl. X, fig. e).

Le taux des protéines basiques (Pl. X, fig. f), acides (Pl. X, fig. g) et sulfhydrilées est sensiblement identique dans les deux parties du nucléole. Toutefois, lorsque l'ovocyte atteint une taille de 180  $\mu$  environ, le constituant fibrillo-granulaire subit une diminution de la teneur en certains types de protéines (Pl. X, fig. h).

#### C - Stade de maturité

Les deux hémisphères observés au microscope électronique sont assez facilement identifiables en microscopie photonique. L'hémisphère dense se reconnaît au développement important des vacuoles,

l'hémisphère clair à sa structure homogène et à son contour régulier. Ce dernier est généralement de plus grande taille.

Le test de MANN-DOMINICI (GABE, 1968) montre que seul l'hémisphère dense révèle une basophilie, d'ailleurs réduite (Pl. X, fig. i). Les protéines basiques ont une concentration sensiblement identique dans les deux hémisphères (Pl. X, fig. j) tandis que la teneur en protéines acides est légèrement plus élevée dans l'hémisphère clair (Pl. X, fig. k).

## 2 - Réactions à l'argent

Les techniques utilisant l'affinité du nucléole pour les sels d'argent ne sont pas des réactions cytochimiques au sens strict. Elles sont néanmoins précieuses pour l'interprétation de l'organisation nucléolaire. Elles mettent en évidence, soit le constituant fibrillaire dense (technique de RISUENO *et al.* (1973), soit la région de l'organisateur nucléolaire et les centres fibrillaires (technique de BLOOM et GOODPASTURE, 1976).

### A - Technique de RISUENO *et al.*

L'observation au microscope électronique de coupes d'ovocytes traités par cette technique a été réalisée chez les deux espèces étudiées.

Chez *N. diversicolor*, le dépôt d'argent est plus important au niveau du constituant fibrillaire dense aussi bien au stade de vitellogenèse (Pl. XI, fig. a) qu'au stade d'élaboration des organites corticaux (Pl. XI, fig. b).

Chez *P. cultrifera*, le stade de vitellogenèse se caractérise, rappelons-le, par une certaine diversité de l'organisation nucléolaire. Dans le cas où le nucléole possède une zone fibrillaire dense et une zone centrale vacuolisée (Pl. VIII, fig. c), l'argent est réparti en une couronne qui correspond au constituant fibrillaire dense (Pl. XI, fig. c). Dans le cas où le composant fibrillaire forme une zone unique peu dense aux électrons, c'est l'ensemble de cette zone qui est argyrophile. Au stade de l'élaboration des alvéoles corticaux, stade pendant lequel le nucléole est constitué de trois zones concentriques (Pl. IX, fig. d), c'est encore la couronne fibrillaire et elle seule qui est concernée par le dépôt d'argent (Pl. XI, fig. d).

### B - Technique de BLOOM et GOODPASTURE

L'application, à des coupes histologiques, des deux variantes (Ag I et AgAS) de la technique de BLOOM et GOODPASTURE (1976) donne des résultats identiques.

Dans les ovocytes en vitellogenèse, le précipité d'argent est visible au niveau des deux zones fibrillaires, aussi bien chez *N. diversicolor* (Pl. XI, fig. e) que chez *P. cultrifera* (Pl. XI, fig. f). Toutefois, alors que l'intensité de la réaction est identique dans ces zones chez *N. diversicolor*, elle est parfois, chez *P. cultrifera*, plus faible dans la zone centrale du nucléole que dans la couronne fibrillaire qui l'entoure (Pl. XI, fig. f).

Au cours du stade d'élaboration des organites corticaux, l'argyrophilie est localisée uniquement au niveau de la couronne fibrillaire, seul constituant fibrillaire qui subsiste à ce stade chez les deux espèces étudiées (Pl. XI, fig. g). Le composant fibrillo-granulaire, comme d'ailleurs le cortex granulaire au stade précédent, ne présente aucun dépôt d'argent.

### III - DISCUSSION

Parmi les questions que soulève l'étude du nucléole ovocytaire des *Nereidae*, celles qui nous semblent les plus importantes sont en rapport, d'une part, avec l'organisation ultrastructurale de l'organite, d'autre part, avec la physiologie ovocytaire et son contrôle endocrine.

#### 1 - Organisation ultrastructurale du nucléole

##### A - Variantes de l'organisation nucléolaire chez les *Nereidae*

Nous disposons actuellement de données concernant l'organisation nucléolaire des ovocytes de trois espèces de *Nereidae* : *Nereis pelagica* (DHAINAUT, 1972), *Nereis diversicolor* et *Perinereis cultrifera*. D'emblée, la morphologie du nucléole peut apparaître assez différente chez les trois espèces. En fait, si on effectue une confrontation détaillée des observations à un stade déterminé, la vitellogenèse par exemple, on constate que l'organite est toujours constitué des mêmes composants, au nombre de trois : granulaire, fibrillaire dense, fibrillaire clair. Ainsi, chez *N. pelagica*, DHAINAUT (1972) différencie, à côté

des massifs granulaires, le matériel fibrillaire dense des "lames nucléolaires" et le constituant des "blocs fibrillaires". La dualité du composant fibrillaire est plus nette lorsque les constituants sont disposés en trois zones concentriques comme c'est le cas chez *N. diversicolor*. A notre connaissance, une telle organisation nucléolaire n'est pas fréquente dans les ovocytes en période de grand accroissement. La présence de deux constituants fibrillaires est moins évidente dans les nucléoles de *P. cultrifera* formés d'une zone centrale claire et d'un cortex granulaire dense. Ce type d'organisation, contrairement au précédent, a été plus souvent signalé dans la littérature (MILLONIG *et al.*, 1968 ; MANCUSO, 1972 ; GOULD-SOMERO et HOLLAND, 1975). En fait, l'observation à fort grossissement de ce type de nucléoles permet de montrer que le constituant fibrillaire de la zone centrale claire se trouve sous deux formes : l'une condensée, l'autre très diffuse. La zone centrale résulterait donc, chez *P. cultrifera*, de l'interpénétration des deux constituants fibrillaires disposés en deux zones distinctes chez les autres *Nereidae*.

Il semble par conséquent que les différences observées dans l'organisation du nucléole ovocytaire des différentes espèces de *Nereidae* étudiées, résident essentiellement dans l'agencement spatial des trois constituants fondamentaux du nucléole. Cette organisation se caractérise par la dualité du constituant fibrillaire, fait qui n'a été que rarement signalé dans les ovocytes en croissance. Le plus souvent, comme par exemple chez les Amphibiens, le constituant fibrillaire est homogène et forme une seule zone : le "core" nucléolaire (MILLER, 1966 ; LANE, 1967 ; VAN GANSEN et SCHRAM, 1972). Dans les rares cas (CHOUINARD, 1971 ; HUBERT, 1973) où la dualité du constituant fibrillaire a été rapportée, il est intéressant de noter qu'il s'agit toujours d'ovocytes à nucléole unique, dont l'organisation s'opposerait, par conséquent, à celle des nucléoles multiples du type "ovocyte d'Amphibiens".

#### B - Signification de la dualité du constituant fibrillaire

La dualité du constituant fibrillaire semble être un fait très général, notamment dans les cellules somatiques. En effet, dans de nombreux types cellulaires (revue dans GOESSENS et LEPOINT, 1979), on observe en plus du constituant fibrillaire dense (*pars fibrosa*) connu depuis longtemps (MARINOZZI et BERNHARD, 1963), un second constituant appelé "centres fibrillaires" par RECHER *et al.* (1969). La présence de deux composants fibrillaires dans le nucléole des ovocytes de *Nereidae* amène à effectuer une

comparaison avec les deux types de matériel fibrillaire rapportés dans la littérature. Ainsi, le constituant fibrillaire dense semble être l'équivalent de la *pars fibrosa* du nucléole des cellules somatiques. Les caractéristiques ultrastructurales et cytochimiques ainsi que les résultats de l'imprégnation à l'argent selon la technique de RISUENO *et al.* (1973) sont tous en faveur d'une telle interprétation.

En ce qui concerne le constituant fibrillaire clair, des analogies intéressantes peuvent être établies avec les centres fibrillaires. En effet, la plupart des auteurs admettent actuellement que ces derniers représentent une forme dispersée de la chromatine de l'organisateur nucléolaire (NOR) (GOESSENS et LEPOINT, 1979). Or, dans les ovocytes de *Nereidae*, l'étude de la nucléogénèse met en évidence des relations très étroites entre la chromatine et le constituant fibrillaire clair. De plus, l'étude autoradiographique de la synthèse des RNA (voir chapitre IV et la fig. b de la Pl. XIX) donne des résultats qui rappellent ceux de GOESSENS (1976) et MIRRE et STAHL (1978 a et b). Ces résultats sont compatibles avec les modèles d'organisation du nucléole (MIRRE et STAHL, 1978 a et b ; GOESSENS et LEPOINT, 1979) selon lesquels seuls les cistrons ribosomiques en cours de transcription seraient localisés dans la couronne fibrillaire dense qui entoure chaque centre fibrillaire. Par contre, les observations effectuées après l'application des techniques à l'argent de BLOOM et GOODPASTURE (1976) sont plus difficilement interprétables. De manière générale, le mécanisme exact de la mise en évidence des NORs par ces méthodes est sujet à controverses (OLERT *et al.*, 1979 ; HUBBELL *et al.*, 1979). Pour SCHWARZACKER *et al.* (1978), c'est la zone fibrillaire dense disposée autour du centre fibrillaire qui serait la véritable responsable de la fixation de l'argent. D'autres auteurs envisagent la possibilité d'une coloration des deux composants : centre fibrillaire et couronne fibrillaire dense (BOURGEOIS *et al.*, 1979). Il semble que ce soit le cas dans les ovocytes des *Nereidae*, où les deux constituants fibrillaires du nucléole font l'objet d'un dépôt d'argent. Récemment, BUYS et OSINGA (1980) ont apporté des arguments en faveur du rôle des groupements réducteurs des protéines sulfhydrilées dans la "coloration" sélective des NORs par l'argent. Ceci est à rapprocher de nos résultats cytochimiques qui mettent en évidence une grande quantité de protéines sulfhydrilées dans les zones fibrillaires du nucléole.

L'hypothèse selon laquelle le constituant fibrillaire clair est l'équivalent des centres fibrillaires et représente, par conséquent, une forme de la chromatine des NORs, pose le problème de la localisation du DNA nucléolaire dans l'ovocyte des *Nereidae*. Or, les différentes

tentatives pour mettre ce DNA en évidence (fixation d'actinomycine tritiée, techniques de cytochimie ultrastructurale de MOYNE (1973) et de COGLIATI et GAUTIER (1973), se sont toutes soldées par un échec. Il faut d'ailleurs remarquer que, dans les centres fibrillaires, le DNA a surtout été détecté par digestion enzymatique (GOESSENS, 1973 ; HUBERT, 1975 ; MIRRE et STAHL, 1978b) et par une réaction cytochimique (POUCHELET *et al.*, 1975 ; POUCHELET et ANTEUNIS, 1979 ; GOESSENS, 1979) dont la spécificité n'est pas absolue (ANTEUNIS *et al.*, 1973). Par contre, les cistrans ribosomiques ont été clairement mis en évidence dans les centres fibrillaires, par hybridation moléculaire *in situ* (KNIBIEHLER *et al.*, 1977). Nous espérons appliquer prochainement cette technique aux nucléoles des ovocytes de *Nereidae* et essayer ainsi de faire progresser la solution du problème de la localisation intranucléolaire du DNA dans ce type cellulaire.

## 2 - Relations entre l'évolution de la morphologie nucléolaire et les variations de l'activité endocrine du cerveau

### A - Signification de l'évolution morphologique du nucléole

Il est possible chez les trois espèces de *Nereidae* étudiées de caractériser chacune des étapes de l'ovogenèse par une organisation nucléolaire spécifique. On peut facilement concevoir que les remaniements de la structure du nucléole soient liés à des modifications du métabolisme dont cet organite est le siège. Le rôle du nucléole dans l'élaboration des ribosomes est maintenant bien établi (PERRY, 1965 ; BUSCH et SMETANA, 1970), et il a été démontré dans de nombreux types cellulaires que la morphologie nucléolaire est très largement tributaire de l'intensité des synthèses de rRNA (SIMARD, 1970 ; THOMAS, 1972).

Chez les *Nereidae*, des remaniements importants de l'organisation du nucléole se produisent lorsque l'ovocyte passe de la phase de vitellogenèse à celle de l'élaboration des organites corticaux. Ces modifications se traduisent notamment par la transformation du cortex granulaire typique en un matériel fibrillo-granulaire moins riche en granules. Cette évolution ultrastructurale reflète très certainement une diminution des synthèses de rRNA (voir chapitre IV). De même, il est vraisemblable que la ségrégation des constituants nucléolaires qui survient lors du stade de maturité soit liée à l'arrêt de la synthèse des RNA ribosomiques (voir chapitre III).

B - Relations entre l'évolution nucléolaire et l'activité endocrine cérébrale

Le dosage de l'activité endocrine du cerveau des *Nereidae* réalisé par DURCHON et PORCHET (1970) et PORCHET (1972), nous a permis de comparer l'évolution nucléolaire aux variations de l'inhibition endocrine au cours de l'ovogenèse. Le dosage de l'activité inhibitrice des cerveaux de femelles d'âges différents a permis de tracer une courbe indiquant l'activité endocrine cérébrale en fonction du diamètre ovocytaire (DURCHON et PORCHET, 1970 ; PORCHET, 1972). Il est donc possible de confronter chaque phase de l'évolution du nucléole ovocytaire à une valeur de l'activité cérébrale (Fig. 4). Ainsi, la zone granulaire en trabécules, spécifique de la phase de vitellogenèse, est corrélative d'un taux hormonal élevé. Elle disparaît pendant la diminution de la quantité d'hormone produite par le cerveau, pour être remplacée par un constituant fibrillo-granulaire typique du stade d'élaboration des organites corticaux. Ce constituant atteint son plein développement en dessous d'un seuil d'activité cérébrale très bas.

Ce synchronisme entre les remaniements de l'ultrastructure nucléolaire et les variations de l'activité endocrine du cerveau suggère l'existence d'un contrôle endocrine de l'évolution nucléolaire. Cette régulation hormonale de la morphologie du nucléole s'explique vraisemblablement, au niveau moléculaire, par une action de l'hormone cérébrale sur l'élaboration des rRNA (voir chapitre IV). De nombreux travaux se sont en effet attachés à étudier l'influence hormonale sur la synthèse des rRNA dans les types cellulaires les plus divers (revue dans BUSCH et SMETANA, 1970 ; LIAO, 1975). Par contre, peu d'études ont été consacrées aux conséquences de cette régulation sur l'évolution morphologique du nucléole. En dehors d'une étude histobiométrique de l'action de l'ACTH sur les nucléoles des cellules corticosurrénales et hépatiques (HEINIGER *et al.*, 1971), la plupart des travaux se rapporte à l'action de stéroïdes (GIRARD *et al.*, 1968 ; KOHORN *et al.*, 1972 ; GORDON *et al.*, 1973 ; SHELD, 1978 ; BOCQUET-VEDRINE, 1980). Mais, en général, les nucléoles des cellules cibles ne montrent pas de modifications ultrastructurales aussi importantes que dans l'ovocyte des *Nereidae* qui constitue, à notre connaissance, un modèle unique pour l'étude de l'influence d'une hormone régulatrice de la gamétogenèse sur la morphologie et les synthèses nucléolaires.

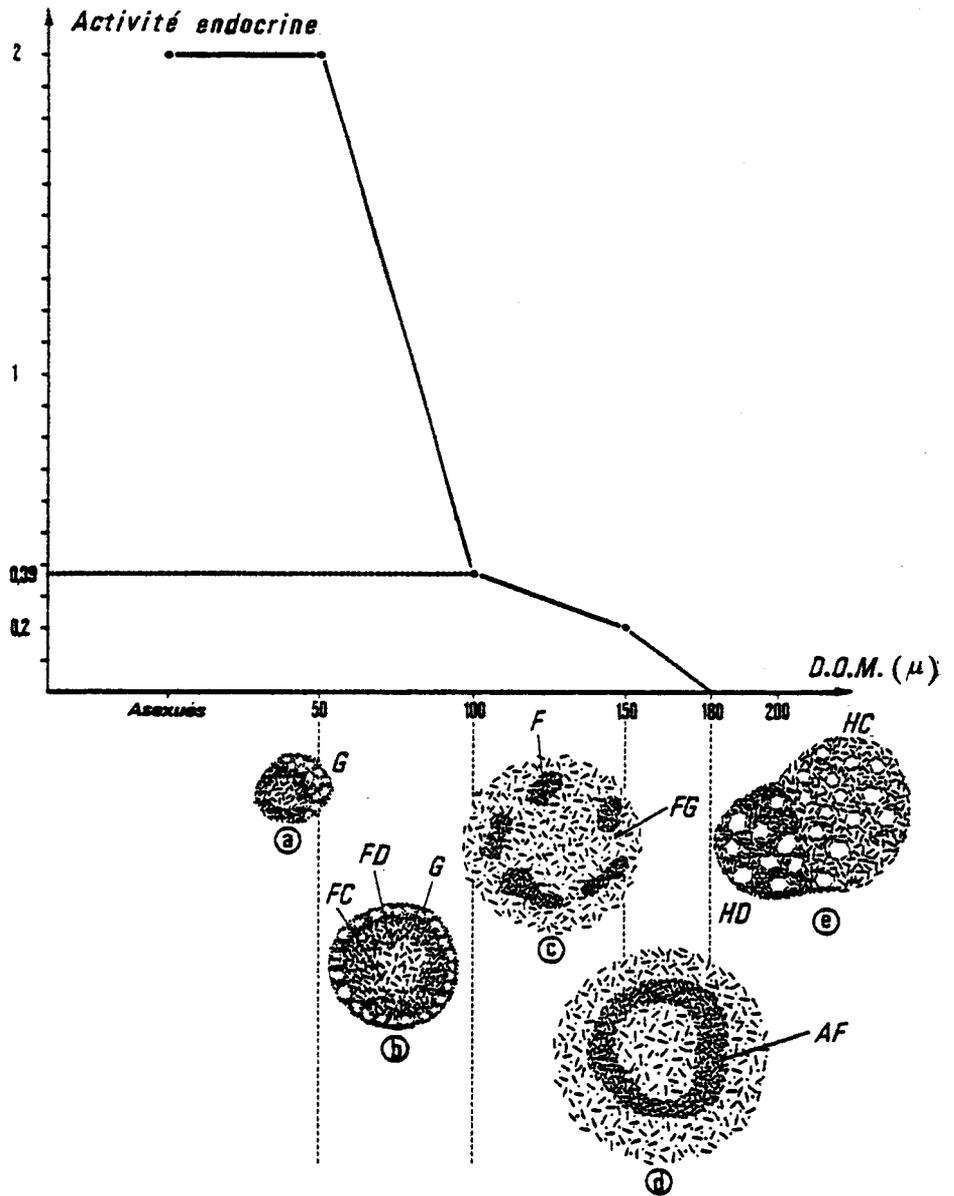


Figure 4 - Relations entre l'évolution du nucléole et les variations de l'activité endocrine cérébrale chez *Nereis diversicolor* (graphique donnant l'activité endocrine en fonction du diamètre ovocytaire moyen (D.O.M.). D'après DURCHON et PORCHET, 1970).

- a - Elaboration de la zone granulaire (G) en trabécules à la fin du stade de prévitellogénèse.
- b - Structure du nucléole au cours du stade de vitellogénèse : zone fibrillaire claire (FC), zone fibrillaire dense (FD), cortex granulaire (G).
- c - Structure du nucléole au cours du stade d'élaboration des organites corticaux : plages fibrillaires (F) dispersées dans le composant fibrillo)granulaire (FG).
- d - Regroupement des plages fibrillaires en un anneau (AF) à la fin du stade d'élaboration des organites corticaux.
- e - Ségrégation des constituants nucléolaires au cours du stade de maturité. HD : hémisphère dense ; HC : hémisphère clair.

### CHAPITRE III

## ÉVOLUTION DU NUCLÉOLE AU COURS DE L'OVOGENÈSE EXPÉRIMENTALE

### I - NEREIS DIVERSICOLOR

#### 1 - Effets de la suppression du facteur hormonal

Cette étude a été réalisée sur des ovocytes provenant soit de parties postérieures d'animaux sectionnés en deux tronçons, soit de cultures de parapodes isolés. Les modifications observées au niveau du nucléole sont identiques dans les deux cas. La seule différence entre ces deux processus expérimentaux réside dans la durée de l'évolution nucléolaire. Très variable *in vivo*, elle est remarquablement constante et reproductible dans le cas des parapodes isolés. Pour cette raison nous ferons essentiellement référence à la chronologie observée *in vitro*.

D'autre part, seuls les nucléoles des ovocytes initialement en phase de vitellogenèse au moment de la suppression de l'influence cérébrale donnent lieu à une évolution expérimentale complète ; nous exposerons donc uniquement les résultats obtenus avec ce type de matériel. Les transformations subies en absence d'hormone par les nucléoles d'ovocytes d'âges différents sont schématisées dans la figure 5.

#### A - Stade du nucléole vacuolisé

Après 24 heures de culture organotypique en condition an hormonale, la structure du nucléole ne change pas par rapport au moment du prélèvement de l'explant. On observe les 3 parties du nucléole de l'ovocyte en période de vitellogenèse : zone centrale fibrillaire, couronne intermédiaire fibrillaire, cortex granulaire en trabécules. Au 2ème jour de l'expérience, certains nucléoles présentent, en section, une forme annulaire par suite du développement d'une vacuole dans la partie centrale de l'organite.

Après 3 jours de culture, tous les nucléoles examinés possèdent une vacuole centrale. Elle atteint, dans les ovocytes de 60  $\mu$  au moment de la mise en culture, un diamètre de 5  $\mu$  pour une taille nucléolaire de 10 à 12  $\mu$  (Pl. XII, fig. a). L'anneau nucléolaire est constitué de plages fibrillaires dispersées dans le composant granulaire dont la disposition en trabécules tend à disparaître (Pl. XII, fig. b). La vacuole centrale possède une densité aux électrons légèrement plus élevée que celle du nucléoplasme. Le contenu vacuolaire est constitué de granules de 150 Å dispersés parmi un matériel fibrillaire d'aspect diffus (Pl. XII, fig. b). Ces composants de la vacuole proviennent vraisemblablement de la dispersion du constituant granulaire de l'anneau. On observe en effet une fragmentation du bord de la vacuole en formations de 1 000 à 2 000 Å dont les constituants, granules et matrice fibrillaire, semblent se dissocier à l'intérieur de la vacuole (Pl. XII, fig. b).

Au 6ème jour de l'expérimentation *in vitro*, la vacuole atteint un volume considérable (Pl. XIII, fig. a). Son diamètre varie de 10 à 15  $\mu$  selon la taille ovocytaire au moment de la levée de l'inhibition hormonale. Corrélativement, la largeur de l'anneau nucléolaire diminue et ne dépasse pas 1  $\mu$  (Pl. XIII, fig. a). Parvenu à ce stade de l'évolution expérimentale, les constituants de l'anneau ont subi des transformations comparables à celles de l'ovogenèse naturelle. Ainsi, le composant granulaire a complètement perdu sa disposition en trabécules et a fait place à un matériel de nature fibrillo-granulaire (Pl. XIII, fig. b).

L'étude cytochimique des nucléoles vacuolisés montre que seul l'anneau nucléolaire se colore de manière intense par les différentes techniques utilisées. Ainsi, après coloration par le bleu de toluidine à pH 4,2, le nucléole se présente sous forme d'un anneau basophile délimitant une vacuole non colorable (Pl. XIII, fig. c). De

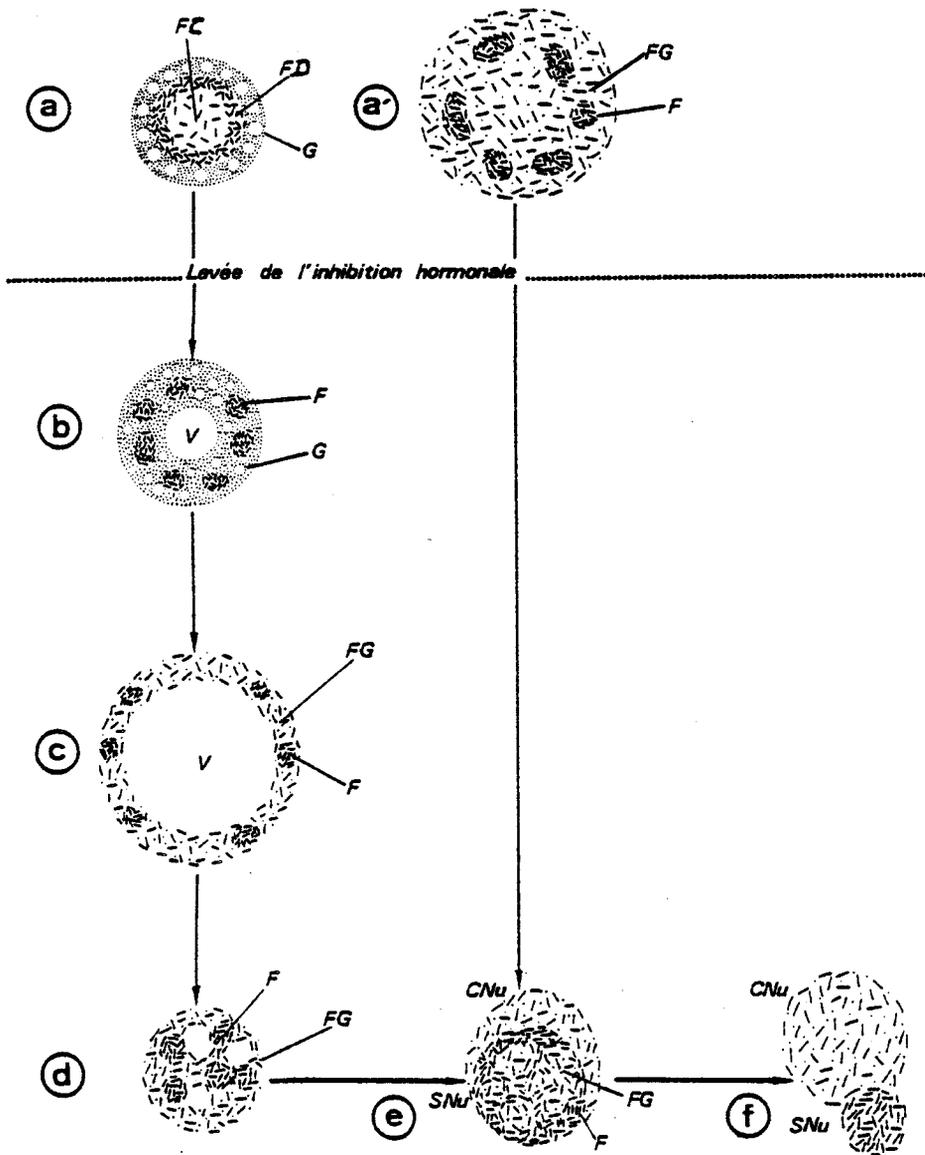


Figure 5 - Evolution du nucléole après suppression expérimentale de l'action endocrine cérébrale chez *Nereis diversicolor*.

- a et a' - Structure des nucléoles au moment de l'ablation du prostomium (expérimentation *in vivo*) ou de la mise en culture (expérimentation *in vitro*). a : nucléole d'ovocyte en période de vitellogenèse ; a' : nucléole d'ovocyte en période d'élaboration des organites corticaux (abréviations identiques à celles de la Figure 4).
- b - Nucléole vacuolisé (3 jours de culture). L'anneau nucléolaire est constitué de plages fibrillaires (F) dispersées dans le composant granulaire (G). V : vacuole centrale.
- c - Extension maximale de la vacuole (6 jours de culture). L'anneau nucléolaire est constitué de plages fibrillaires dispersées dans le composant fibrillo-granulaire (FG).
- d - Régression de la vacuole (7 jours de culture).
- e - Formation de la coiffe nucléolaire (10 jours de culture). La sphère nucléolaire (SNU) est composée d'un réseau fibrillaire (F) et de plages fibrillo-granulaires (FG). CNU : coiffe nucléolaire.
- f - Nucléole ségrégué (20 jours de culture). Seuls les nucléoles des ovocytes en période de vitellogenèse (a) présentent la phase précoce de l'évolution (stade du nucléole vacuolisé). Les nucléoles des ovocytes plus âgés (a') subissent directement la ségrégation sans se vacuoliser au préalable.

même, la coloration des protéines basiques selon ALFERT et GESCHWIND (1953) est nettement plus intense au niveau de l'anneau que de la vacuole centrale (Pl. XIII, fig. d).

#### B - Stade du nucléole ségrége

##### a) Régression de la vacuole centrale

Après avoir atteint une taille maximale au 6<sup>ème</sup> jour, la vacuole nucléolaire disparaît rapidement. Dès le 7<sup>ème</sup> jour, elle a fait place à plusieurs petites vacuoles ne dépassant pas 4  $\mu$  de diamètre (Pl. XIII, fig. e). Corrélativement, le nucléole reprend un aspect compact et son volume diminue. Il est constitué de plages brillantes denses disséminées dans un constituant fibrillo-granulaire plus clair.

Les vacuoles sont situées au sein de ce composant fibrillo-granulaire et sont souvent rejetées à la périphérie de l'organite (Pl. XIII, fig. f). Seul un fin cordon de 2 000 à 3 000 Å d'épaisseur sépare le contenu vacuolaire du nucléoplasme. L'organisation du matériel constituant ce cordon étant extrêmement lâche, il est possible que la rupture de celui-ci soit le processus par lequel les vacuoles libèrent leur contenu dans le nucléoplasme. L'aspect très granuleux de ce dernier pendant ce stade de l'évolution expérimentale est en faveur de cette hypothèse (Pl. XIII, fig. f).

##### b) Ségrégation des constituants nucléolaires

Après 10 jours d'évolution *in vitro* le matériel nucléolaire se ségrége en deux zones juxtaposées que nous avons appelées "sphère" et "coiffe" nucléolaire (Pl. XIV, fig. a). La sphère nucléolaire qui est, au début de ce processus, la zone de plus grande taille, est formée d'un réseau fibrillaire dont les mailles sont occupées par le matériel fibrillo-granulaire (Pl. XIV, fig. a et b). La coiffe nucléolaire se développe à l'un des pôles de la sphère nucléolaire. Elle est uniquement de nature fibrillo-granulaire et présente de ce fait un aspect plus homogène (Pl. XIV, fig. a et b). La ségrégation entre les composants fibrillaire et fibrillo-granulaire s'opère par la migration de ce dernier depuis la sphère nucléolaire vers la coiffe nucléolaire. Au 20<sup>ème</sup> jour, la coiffe fibrillo-granulaire possède un diamètre près de deux fois supérieur à celui de la sphère nucléolaire (Pl. XV, fig. a). Celle-ci est alors essentiellement de nature fibrillaire. Seules quelques

plages claires de 0,5 à 1  $\mu$  sont encore occupées par le constituant fibrillo-granulaire (Pl. XV, fig. a et b).

La ségrégation nucléolaire que nous venons de décrire diffère par certains aspects du phénomène survenant à la fin de l'ovogenèse naturelle. Il ne semble pas se produire de vacuolisation ni de fragmentation du nucléole ségrégué comme dans le cas du processus naturel. De même, la ségrégation expérimentale n'est pas précédée d'une disparition totale des granules du constituant fibrillo-granulaire, bien que le nombre de granules diminue très nettement par rapport au stade du nucléole vacuolisé.

L'étude cytochimique du nucléole ségrégué a été réalisée en microscopie photonique. Les résultats de cette étude sont consignés dans le tableau 3. On constate que seule la sphère nucléolaire renferme une quantité appréciable de RNA puisque la coloration par le bleu de toluidine à pH 4,2, abolie après digestion par la RNase, ne concerne que cette zone (Pl. XVI, fig. a). La sphère nucléolaire est également très riche en protéines basiques (Pl. XVI, fig. b et c), vraisemblablement liées au RNA (Pl., XIV, fig. d). La coiffe nucléolaire est essentiellement de nature protéique. Les différents types de protéines recherchées, à l'exception des protéines basiques, ne sont présentes que dans cette partie du nucléole (Pl. XVI, fig. e et f).

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

Zones Nucléolaires	RNA	Protéines basiques liées au RNA	Protéines basiques libres	Acidophilie totale (NH <sub>2</sub> libres)	Protéines acides	Protéines sulfhydryliées
Sphère	+	++	-	+	-	-
Coiffe	-	+	+	++	++	+

### c) Micronucléoles

Dans les ovocytes dont le nucléole est en cours de ségrégation, le nucléoplasme périphérique renferme, en alternance avec les vésicules intranucléaires (DHAINAUT, 1969b), des formations d'une taille de 1 à 2  $\mu$  dont l'ultrastructure rappelle celle du matériel nucléolaire. Nous leur avons attribué le terme de micronucléole bien que leur élaboration à partir du nucléole n'ait pas été observée. Ils se répartissent en deux catégories selon leur densité aux électrons.

Les micronucléoles clairs (Pl. XV, fig. c) sont généralement de forme irrégulière et fréquemment en relation avec les vésicules

intranucléaires. L'examen à fort grossissement permet d'observer des granules de 150 Å dispersés dans un matériel fibrillaire. La nature fibrillo-granulaire de ces formations semble identique à celle de la coiffe nucléolaire.

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

Ces deux types de formations diffèrent profondément des micronucléoles décrits au cours de la phase de maturité de l'ovogenèse naturelle.

## 2 - Effets de la réintroduction de l'action hormonale au cours de l'évolution expérimentale

Cette étude a pour but de déterminer dans quelle mesure le rétablissement de l'inhibition hormonale après une période plus ou moins longue d'évolution en absence du facteur cérébral, peut ralentir ou empêcher le développement du processus expérimental. L'expérience consiste à associer, tous les 3 jours, des prostomiums à des parapodes initialement isolés. Ces explants sont fixés après une durée totale de culture de 24 jours.

Après 24 jours de culture en absence d'hormone cérébrale, les ovocytes sont entrés en dégénérescence. Ce résultat est conforme aux observations effectuées par DURCHON et DHAINAUT (1964).

Les ovocytes des parapodes associés à un prostomium après 3 jours d'évolution en absence d'hormone conservent une structure analogue à celle des ovocytes témoins, provenant de parapodes associés à un prostomium dès le début de la mise en culture. La plupart des nucléoles ne subit pas de modifications. Seuls quelques-uns d'entre-eux présentent une vacuole centrale (Pl. XVI, fig. g).

Les ovocytes remis en présence du facteur hormonal le 6ème jour de culture montrent tous les caractères des ovocytes en phase de maturité expérimentale : zone basophile périnucléaire, redistribution des réserves vitellines. Au niveau du nucléole, on constate que la ségrégation s'est produite (Pl. XVI, fig. h). L'observation de parapodes fixés après 6 jours de culture en absence de cerveau permet de vérifier que les nucléoles étaient vacuolisés au moment de la réassociation (Pl. XVI, fig. i).

Dans les parapodes réassociés à un prostomium le 9ème jour, tous les ovocytes sont en dégénérescence.

Ces résultats montrent que le rétablissement de l'inhibition hormonale sur des ovocytes préalablement soustraits à l'influence du cerveau, est capable d'empêcher l'évolution expérimentale, à condition d'opérer avant une période critique. Celle-ci se situe du 3ème au 6ème jour et correspond au moment où la vacuole nucléolaire se développe. Passé ce stade de l'évolution expérimentale du nucléole, l'association d'un cerveau ne provoque qu'un retard dans le déroulement de l'ovogenèse expérimentale (6ème jour), ou est totalement inefficace (9ème jour).

## II - PERINEREIS CULTRIFERA

Chez *Perinereis cultrifera*, la suppression expérimentale de l'influence endocrine du cerveau a été réalisée uniquement *in vivo*, aucune technique satisfaisante permettant la culture d'organes de cette espèce n'ayant été, jusqu'à présent, mise au point. L'expérimentation a été effectuée en été et en hiver puisque, rappelons-le, la réponse des ovocytes de *P. cultrifera* à la levée expérimentale de l'inhibition hormonale est très différente selon la saison.

### 1 - Période estivale

Les animaux de 3 ans disparaissent après s'être reproduits en mai-juin ; on ne rencontre, en été, que des individus âgés de 2 ans au plus, dont le diamètre ovocytaire ne dépasse pas 100  $\mu$ . Les ovocytes de tels animaux se trouvent soit en prévitellogenèse, soit en vitellogenèse.

Après 40 jours d'évolution en absence d'hormone, la structure du nucléole n'est pas modifiée par rapport aux témoins. La morphologie nucléolaire est celle qui existe au moment de l'opération, ceci quelle que soit la taille initiale de l'ovocyte. Ainsi, les nucléoles en cours de formation (ovocytes en prévitellogenèse ou au début de la vitellogenèse) lors de la levée de l'inhibition cérébrale sont encore constitués, après 40 jours d'évolution, de massifs granulaires denses disposés à la périphérie de la zone centrale fibrillaire (Pl. XVII, fig. a). De même, dans les ovocytes en phase de vitellogenèse au moment de l'opération, les nucléoles ont conservé l'organisation caractéristique de ce stade, 40 jours après l'intervention expérimentale (Pl. XVII, fig. b).

Il s'avère par conséquent, qu'en période estivale, la suppression expérimentale de l'action hormonale est sans effet sur la morphologie nucléolaire. Le nucléole se comporte donc comme l'ensemble de l'ovocyte qui ne subit aucunes modifications biométriques et cytologiques à la suite de la levée expérimentale de l'inhibition cérébrale en été (DHAINAUT et PORCHET, 1967).

## 2 - Période hivernale

A cette époque de l'année, la réponse des ovocytes de *P. cultrifera* à la suppression expérimentale de l'activité cérébrale est fonction du stade ovocyttaire initial. Nous avons donc suivi l'évolution du nucléole dans chacun des cas.

Les ovocytes au stade de prévitellogenèse ou de vitellogenèse au moment de l'opération subissent une légère augmentation de taille puis dégènèrent. L'observation du nucléole d'ovocytes ayant atteint une taille de 100  $\mu$  après 25 jours d'évolution, montre que l'organite a subi une augmentation de taille parallèle à celle de l'ovocyte, comme c'est le cas au cours de l'ovogenèse naturelle. Sa morphologie est celle d'un nucléole parvenu à la même taille dans les conditions naturelles (Pl. XVII, fig. c).

Les ovocytes plus âgés (fin de vitellogenèse ou stade d'élaboration des alvéoles corticaux) lors de la levée de l'inhibition cérébrale subissent une évolution accélérée mais ne dégènèrent pas. L'observation du nucléole de tels ovocytes n'a pas permis de déceler de différences par rapport à l'évolution naturelle. Ainsi, dans des ovocytes d'une taille initiale de 130  $\mu$ , parvenus à 200  $\mu$  45 jours après l'opération, on constate que le nucléole est constitué d'une couronne fibrillaire claire limitée intérieurement et extérieurement par une zone fibrillo-granulaire dense (Pl. XVII, fig. d) comme dans le cas de l'ovogenèse naturelle.

Chez *P. cultrifera* en période hivernale, la diminution brutale du taux hormonal consécutive à la suppression expérimentale de l'influence cérébrale est donc suivie d'une accélération de l'évolution du nucléole, mais cette évolution expérimentale est tout à fait comparable au processus naturel. Aucune des modifications caractéristiques de l'ovogenèse expérimentale observées chez *Nereis diversicolor* ne se produit chez *Perinereis cultrifera*.

### III - DISCUSSION

#### 1 - Signification de l'évolution nucléolaire caractéristique de l'ovogenèse expérimentale

Chez les deux espèces étudiées, la suppression expérimentale de l'action cérébrale provoque une accélération de l'évolution nucléolaire. Mais, en outre, chez *N. diversicolor*, il se produit des modifications caractéristiques qui sont la vacuolisation et la ségrégation. La vacuolisation se produit pendant la phase précoce de l'ovogenèse expérimentale et peut être considérée comme un évènement typique de l'évolution en condition anormale. La ségrégation, qui survient pendant la phase tardive de l'ovogenèse expérimentale, n'est vraisemblablement qu'une variante du phénomène observé au cours de la phase de maturité de l'ovogenèse naturelle. La "ségrégation expérimentale" présente néanmoins des caractères particuliers dont nous étudierons la signification dans ce paragraphe.

#### A - Vacuolisation

Au cours de l'ovogenèse expérimentale de *N. diversicolor*, le matériel nucléolaire apparaît, en section, sous forme d'un anneau délimitant une vacuole centrale. Etant donné que nous n'avons jamais observé de continuité entre le contenu vacuolaire et le nucléoplasme, nous pouvons admettre que, dans l'espace, le matériel nucléolaire constitue le cortex d'une sphère dont le centre est occupé par la vacuole.

Les nucléoles annulaires ont donné lieu à une littérature assez abondante. Cependant, il semble que cette dénomination concerne des phénomènes très différents. Il faut, à notre avis, distinguer deux types de nucléoles en anneau. Le premier possède une forme véritablement annulaire par suite de la disposition des constituants ribonucléoprotéiques autour d'une zone plus claire qui se trouve en relation plus ou moins directe avec les éléments nucléoplasmiques. C'est le cas rencontré surtout dans les cellules sanguines de Mammifères (revue dans BUSCH et SMETANA, 1970). Le second type est formé, comme dans le cas de l'ovocyte de *N. diversicolor*, d'une sphère de matériel nucléolaire entourant une cavité centrale qui n'est pas en communication avec le nucléoplasme. Il serait préférable de désigner ce type de nucléoles, qui n'apparaissent sous forme d'anneaux que par suite de l'observation de sections, par le terme de "nucléoles vacuolisés".

Le contenu vacuolaire est très différent dans l'un et l'autre type. En effet, dans les nucléoles annulaires, il a été démontré que la

"vacuole" ou " zone centrale claire" renferme des fibrilles de chromatine (SMETANA *et al.*, 1968 ; TERA0 *et al.*, 1971). En fait, il semble que cette "vacuole" soit, comme l'indiquent GOESSENS et LEPOINT (1979), l'équivalent d'un centre fibrillaire. Dans les nucléoles vacuolisés, la présence, au sein de la vacuole, de granules morphologiquement identiques aux granules ribonucléoprotéiques de "l'anneau" a été observée dans plusieurs types cellulaires (CHOUINARD, 1966 ; JOHNSON, 1969 ; HUBERT, 1970 ; ROSE *et al.*, 1972 ; BARCKHAUSEN et ROSENSTOCK, 1973). Il en est de même dans le nucléole vacuolisé de l'ovocyte de *N. diversicolor* ; l'étude du développement de la vacuole montre en effet que le contenu de cette dernière provient de la dispersion du constituant granulaire de "l'anneau".

La présence de constituants ribonucléoprotéiques dans la vacuole amène à poser le problème de la relation entre le phénomène de vacuolisation et la synthèse des RNA nucléolaires. Dans notre matériel, l'étude autoradiographique après incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H (voir chapitre IV) montre que l'anneau nucléolaire est le siège de synthèses de RNA non négligeables (BERTOUT, 1972). Les résultats obtenus dans divers types cellulaires sont assez contradictoires. Dans de nombreux cas, la vacuolisation du nucléole est l'indice de synthèses de RNA réduites ou nulles (HUBERT et ANDRIVON, 1972 ; ROSE *et al.*, 1972 ; GONTCHAROFF et RAO, 1972 ; SINA et CHIN, 1978). Par contre, dans d'autres cellules, le développement de la vacuole nucléolaire est concomitant d'une augmentation de la synthèse des RNA nucléolaires (JOHNSON, 1969 ; AZEVEDO et COÏMBRA, 1980) ou se produit dans des cellules en croissance accélérée (SOUDEK, 1960 ; PANNESE, 1963 ; KORDAN, 1969 ; DURYEE, 1969 ; HARDIN *et al.*, 1970 ; BURNS et SOLOFF, 1972). L'hypothèse de ROSE *et al.* (1972) pourrait permettre d'interpréter ces résultats divergents. Selon ces auteurs, la vacuolisation du nucléole apparaîtrait liée à des modifications dans la maturation du rRNA plutôt qu'à l'intensité des synthèses de RNA nucléolaires. En outre, toujours selon la même hypothèse, la vacuole jouerait un rôle dans l'accumulation et le transfert hors du nucléole de "types particuliers" de RNA. Il est en effet probable que les processus de dilatation et de contraction des vacuoles, observés dans plusieurs types cellulaires (JOHNSON, 1969 ; ROSE *et al.*, 1972 ; BURNS et SOLOFF, 1972 ; BARCKHAUSEN et ROSENSTOCK, 1973 ; ERDELSKA, 1973 ; AZEVEDO et COÏMBRA, 1980) traduisent un rejet de matériel vacuolaire hors du nucléole. Il est plausible qu'un phénomène semblable se produise dans l'ovocyte de *N. diversicolor* puisque la vacuole, après avoir

atteint une taille maximale, disparaît rapidement en 1 ou 2 jours. De plus, le fait que, dans l'ovocyte de *N. diversicolor*, le développement de la vacuole survienne dans des conditions physiologiques où la maturation du rRNA est anormale (voir chapitre IV), permet de considérer l'hypothèse de ROSE *et al.* (1972) avec beaucoup d'intérêt et d'envisager la possibilité que la vacuole nucléolaire de l'ovocyte de *N. diversicolor* joue un rôle dans l'accumulation puis le transfert hors du nucléole de types "anormaux" de rRNA.

#### B - Ségrégation

Le nucléole ségrégué qui se constitue dans les ovocytes de *N. diversicolor* soustraits à l'action hormonale, est formé de deux zones juxtaposées qui se différencient tant par leur aspect ultrastructural que par leurs propriétés cytochimiques. Ce type d'organisation nucléolaire présente les caractéristiques des "amphinucléoles" décrits dans les ovocytes de Mollusques (RAVEN, 1961) et d'Annélides (RUTHMANN, 1964). Les amphinucléoles ont surtout fait l'objet d'études cytochimiques qui ont montré que les RNP étaient essentiellement localisées dans la partie basophile de l'organite tandis que la partie acidophile était constituée de protéines (YAMAMOTO, 1966 ; KIELBOWNA et KOSCIELSKI, 1974). Nos propres observations cytochimiques sont en tous points conformes à ces résultats, la "coiffe nucléolaire" de l'ovocyte de *N. diversicolor* étant l'équivalent du "Protein-körper" (BOTTKÉ, 1973a) des ovocytes de Mollusques.

Si la cytochimie de l'amphinucléole a été bien étudiée, son ultrastructure est, par contre, peu connue. Seuls, à notre connaissance, quelques travaux ponctuels ont été effectués chez les Mollusques (REVERBERI, 1972 ; BOTTKÉ, 1973a et b ; BOLOGNARI *et al.*, 1976). Notre étude ultrastructurale permet de préciser les modalités de la formation de cet organite. On constate que la coiffe de nature protéique se constitue par migration du matériel fibrillo-granulaire provenant du nucléole. Ce résultat confirme les observations effectuées en microscopie photonique dans l'ovocyte de la Limnée par KIELBOWNA et KOSCIELSKI (1974) pour qui la partie acidophile de l'amphinucléole résulterait de "l'activité sécrétoire du nucléole".

Ce processus présente, en fait, de grandes analogies avec le phénomène de redistribution des composants nucléolaires observé dans les cellules somatiques de Vertébrés et appelé ségrégation nucléolaire par BERNHARD *et al.* (1965). La ségrégation se produit dans de nombreuses conditions : action d'inhibiteurs (revue dans SIMARD, 1970), cellules au terme de leur différenciation (ADAMSTONE et TAYLOR, 1972), infection virale

(SIRTORI et BOSISIO-BESTETTI, 1967 ; WEISS et MEYER, 1972), contamination par les mycoplasmes (JEZEQUEL *et al.*, 1967). Dans tous les cas, cette modification de l'organisation nucléolaire caractérise des cellules métaboliquement peu actives. De nombreux travaux ont montré que la ségrégation nucléolaire est liée à une inhibition de la synthèse du rRNA (revue dans BUSCH et SMETANA, 1970 ; SIMARD, 1970). De même, dans l'ovocyte de *N. diversicolor*, le nucléole ségrégué se développe pendant la phase tardive de l'ovogenèse expérimentale, qui est caractérisée par un arrêt du métabolisme ovocytaire et qui peut être considéré comme l'équivalent de la phase de maturité naturelle (BERTOUT et DHAINAUT, 1971). De plus, l'étude autoradiographique de la synthèse des RNA révèle que l'incorporation d'uridine tritiée dans le nucléole ségrégué est très faible (voir chapitre IV). Il est donc fort probable que, dans l'ovocyte de *N. diversicolor*, la formation d'un amphinucléole résultant de la ségrégation des constituants nucléolaires soit liée à l'arrêt des synthèses de rRNA.

## 2 - Importance de l'étape nucléolaire dans les modalités du contrôle hormonal de l'ovogenèse

Au cours de l'ovogenèse naturelle, la mise en évidence d'un parallélisme étroit entre les modifications de la morphologie nucléolaire et les variations de l'activité endocrine cérébrale suggérait l'existence d'un contrôle endocrine de l'évolution du nucléole. L'étude de cet organite après suppression expérimentale de l'inhibition cérébrale confirme cette hypothèse. En effet, la diminution brutale du taux hormonal consécutive à la décérébration, est très rapidement suivie de modifications spectaculaires (vacuolisation) de l'organisation du nucléole.

De plus, les effets de la levée expérimentale de l'inhibition cérébrale sont ressentis au niveau du nucléole bien avant d'être décelables dans le cytoplasme (BERTOUT, 1972). En particulier, en ce qui concerne l'appareil de Golgi, dont on connaît le rôle important dans les synthèses cytoplasmiques (DHAINAUT, 1967, 1969a) et la sensibilité élevée aux variations du taux hormonal (DHAINAUT, 1976 ; DHAINAUT et PORCHET, 1977b), on observe que les premiers indices d'une nouvelle orientation de l'activité des dictyosomes est nettement postérieure au processus de vacuolisation du nucléole (DHAINAUT, communication personnelle).

Enfin, les expériences de réassociation de prostomiums à des parapodes primitivement isolés montrent qu'il est possible de rétablir une ovogenèse normale à condition d'intervenir avant le développement de la vacuole nucléolaire. L'altération de l'organisation structurale du nucléole apparaît donc comme un évènement décisif dans le déterminisme hormonal de l'ovogenèse.

En conclusion, l'ensemble des observations effectuées après la suppression expérimentale de l'action endocrine du cerveau suggère que le contrôle de l'évolution nucléolaire constitue une étape privilégiée dans le mécanisme de la régulation hormonale de l'ovogenèse.

## CHAPITRE IV

### ÉTUDE DE LA SYNTHÈSE DES RNA AU COURS DE L'OVOGÈNESE

La synthèse des RNA a été étudiée au cours des différentes étapes de l'ovogenèse naturelle et expérimentale, par des méthodes autoradiographiques et biochimiques. L'autoradiographie a surtout été utilisée dans le but de suivre la cinétique d'incorporation du précurseur dans les divers compartiments cellulaires. L'étude quantitative des variations éventuelles de l'intensité des synthèses de RNA a été réservée à l'analyse biochimique, effectuée en collaboration avec F. CANER (BERTOUT *et al.*, 1981 ; CANER *et al.*, sous presse). La nécessité de disposer d'une quantité importante d'ovocytes nous a obligé à restreindre l'étude biochimique à *P. cultrifera*, espèce de plus grande taille que *N. diversicolor*.

#### I - OVOGENESE NATURELLE

##### 1 - Etude autoradiographique *in vivo*

L'étude cinétique de l'incorporation *in vivo* de l'uridine-<sup>3</sup>H a été réalisée en microscopie photonique. *N. diversicolor* ayant déjà fait l'objet d'un tel travail (DHAINAUT, 1964b), notre étude a surtout été effectuée chez *P. cultrifera*. Les résultats concernant cette espèce sont consignés dans le tableau 4.

Tableau 4 - Etude cinétique de l'incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H *in vivo* au cours de l'ovogenèse naturelle (*P. cultrifera*).

ZF : zone fibrillaire ; ZG : zone granulaire

a - Stade de prévitellogenèse (20-40 μ)

	Nucléole		Nucléoplasme	Cytoplasme
	ZF	ZG		
1 heure	-	-	++	-
6 heures	+	-	+++	-
24 heures	++	++	+++	+
3 jours	++	++	++	+++

b - Stade de vitellogenèse (60-100 μ)

	Nucléole		Nucléoplasme	Cytoplasme
	ZF	ZG		
1 heure	++	-	++	-
6 heures	+++	+++	+++	-
24 heures	+++	+++	++	++
3 jours	++	++	++	+++
6 jours	+	+	+	++++

c - Stade d'élaboration des alvéoles corticaux (130-180 μ)

	Nucléole		Nucléoplasme	Cytoplasme
	ZF	ZG		
1 heure	+	-	-	-
6 heures	++	+	+	-
24 heures	++	++	+	+
3 jours	++	++	++	++
6 jours	++	++	++	+++

d - Stade de maturité (220-240 μ)

	Nucléole		Nucléoplasme	Cytoplasme
	ZF	ZG		
1 heure	+	-	-	-
6 heures	+	+	-	-
24 heures	++	+	+	-
3 jours	++	++	++	+
6 jours	++	++	++	+

- : marquage nul ;

+ : marquage plus ou moins intense selon le nombre de +.



Dans les ovocytes en prévitellogenèse, on constate que le nucléoplasme est le seul site marqué après un temps court d'incorporation et reste le compartiment cellulaire le plus radioactif jusqu'à 24 heures après l'injection du précurseur. Pendant le stade de vitellogenèse, le marquage apparaît en même temps dans la zone centrale du nucléole et dans le nucléoplasme (Pl. XVIII, fig. a). C'est à ce stade que le nucléole montre le niveau de radioactivité le plus élevé de toute la durée de l'ovogenèse (Pl. XVIII, fig. b). Dans les ovocytes âgés (stades d'élaboration des organites corticaux et de maturité), le nucléoplasme n'est plus marqué après un temps court d'incorporation. Contrairement au stade précédent, seul le nucléole est radioactif (Pl. XVIII, fig. d).

Les résultats des incorporations de longue durée mettent en évidence une diminution de la radioactivité cytoplasmique dans les ovocytes âgés par rapport aux ovocytes jeunes (Pl. XVIII, fig. c et f). Cette diminution semble avoir deux causes : d'abord une baisse des synthèses de RNA au niveau des sites nucléaires (Pl. XVIII, fig. e) mais également un transfert nucléo-cytoplasmique des molécules marquées moins important. En effet, à partir d'une durée d'incorporation de 24 heures, le marquage nucléaire se stabilise dans les ovocytes âgés (Pl. XVIII, fig. f) alors qu'il diminue rapidement dans les ovocytes jeunes (Pl. XVIII, fig. c).

Les résultats obtenus chez *N. diversicolor* (Pl. XVIII, fig. g et h et DHAINAUT, 1964b) montrent que les grandes lignes de la cinétique d'incorporation de l'uridine-<sup>3</sup>H sont semblables chez les deux espèces. Il semble toutefois que la prépondérance du marquage nucléolaire sur le marquage nucléoplasmique survienne à un stade plus précoce que chez *P. cultrifera* (tableau 5 a).

## 2 - Etude autoradiographique *in vitro*

L'incorporation *in vitro* de l'uridine-<sup>3</sup>H a été réalisée chez *N. diversicolor* et chez *P. cultrifera*. Elle a permis d'une part les expériences de chasse du précurseur, d'autre part une application plus aisée des techniques d'autoradiographie à haute résolution.

### A - Stades de prévitellogenèse et de vitellogenèse

Les résultats obtenus après des temps courts d'incorporation sans chasse du précurseur, confirment les observations faites *in vivo*. L'autoradiographie à haute résolution apporte certaines précisions sur la localisation des sites de synthèse des RNA. Ainsi, il apparaît que le marquage nucléoplasmique est restreint au matériel issu de la décondensation des chromosomes

(Pl. XIX, fig. a et c ; Pl. XX, fig. a). De même, on observe que la radioactivité nucléolaire est due à une incorporation de l'uridine-<sup>3</sup>H au niveau du constituant fibrillaire (Pl. XIX, fig. b et d). Dans le cas du nucléole ovocytaire de *N. diversicolor*, dont le composant fibrillaire est formé de 2 zones concentriques, le marquage est plus élevé dans la couronne fibrillaire dense que dans la zone fibrillaire claire (Pl. XIX, fig. b).

Les expériences de chasse *in vitro* ont permis, elles aussi, de préciser les résultats obtenus par l'étude cinétique de l'incorporation *in vivo* du précurseur. Après une durée de chasse de 3 à 4 heures, la radioactivité a gagné la zone corticale du nucléole et l'ensemble du nucléoplasme (Pl. XX, fig. b). Six heures après l'immersion dans la solution d'uridine froide, on observe une diminution très nette du marquage de la zone fibrillaire (Pl. XX, fig. c). C'est également à partir de cette période que les grains d'argent apparaissent au niveau du cytoplasme. L'autoradiographie à haute résolution montre une localisation préférentielle de la radioactivité dans les agrégats cytoplasmiques, qu'ils soient (Pl. XX, fig. e) ou non (Pl. XX, fig. d) en contact avec des mitochondries.

#### B - Stade d'élaboration des organites corticaux

Contrairement au stade précédent, les granulations nucléoplasmiques ne sont que très faiblement marquées après une incorporation de courte durée (Pl. XXI, fig. a) ; les grains d'argent sont essentiellement localisés au niveau de la zone fibrillaire du nucléole (Pl. XXI, fig. b). La chasse du précurseur est suivie d'une augmentation du marquage de la zone fibrillo-granulaire (Pl. XXI, fig. c) puis des granulations nucléoplasmiques (Pl. XXI, fig. d). Mais cette migration des molécules marquées vers le nucléoplasme puis le cytoplasme est beaucoup plus limitée qu'au stade précédent, conformément aux résultats obtenus lors de l'étude cinétique *in vivo*.

#### 3 - Etude biochimique

L'analyse biochimique a été réalisée à différents stades de l'ovogenèse, sur des lots homogènes du point de vue de la taille ovocytaire. L'étude des ovocytes d'un diamètre inférieur à 80  $\mu$  n'a pu être effectuée par suite de l'impossibilité de séparer ces derniers des coelomocytes. Les tentatives d'isolement sur gradient de ficoll se sont soldées par un échec ; les coelomocytes s'agglomèrent en amas dans ce milieu.

Les types de RNA synthétisés dans les ovocytes de différentes tailles ont été déterminés après incorporation *in vivo* d'uridine-<sup>3</sup>H pendant 5 jours. Cette durée a été choisie en fonction des résultats autoradiographiques qui indiquent que l'accumulation dans l'ovocyte d'une quantité appréciable de RNA marqués nécessite ce délai. La figure 6 montre, pour les différents stades étudiés, les courbes donnant la densité optique et la radioactivité des RNA séparés sur gradient de saccharose. On constate, en ce qui concerne la période étudiée (80-220 μ), que l'incorporation du précurseur diminue au fur et à mesure de la croissance ovocytaire. Cette baisse est importante et atteint les trois classes de RNA séparés : 4-5 S (diminution de 70 %), 18 S (80 %) et 28 S (75 %).

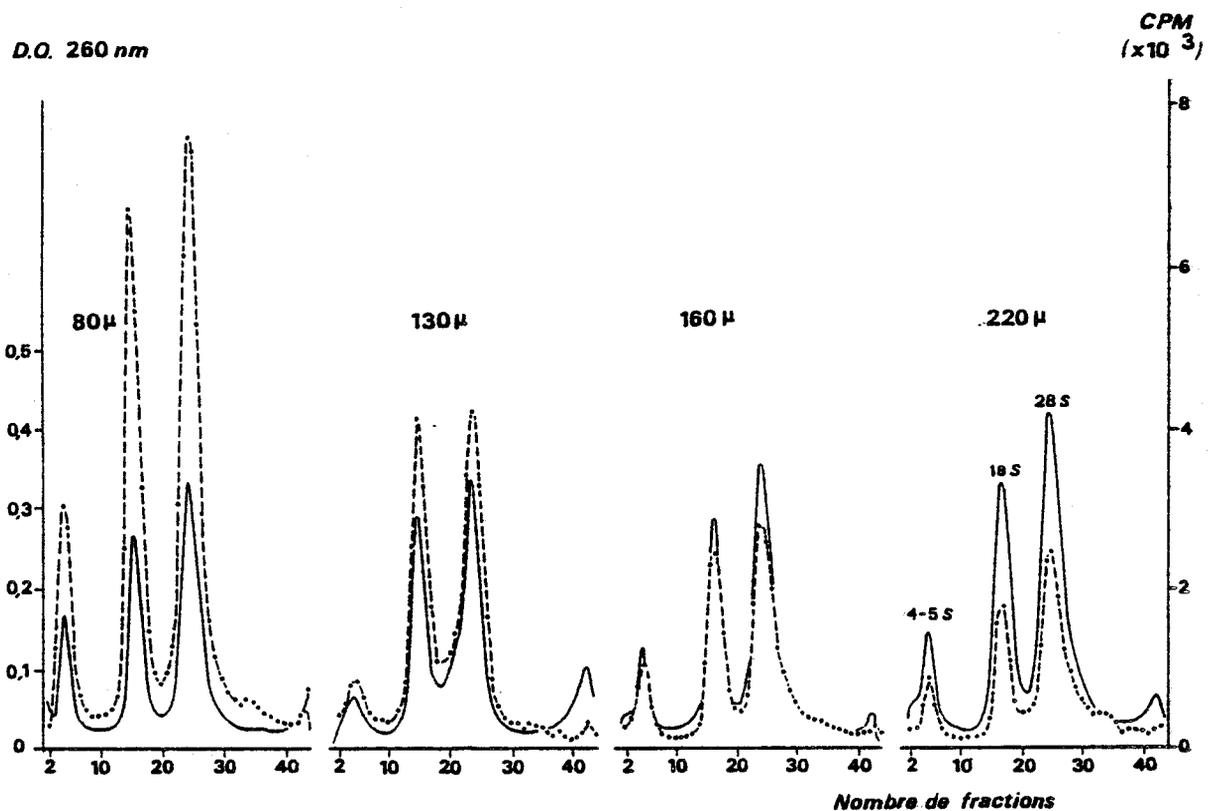


Figure 6 - Profils de sédimentation des RNA extraits à partir de 4 lots d'ovocytes de *P. cultrifera*, répartis en fonction de leur diamètre : 80 μ (vitellogenèse), 130 μ, 160 μ (élaboration des organites corticaux), 220 μ (début du stade de maturité).

- Densité optique (D.O.) à 260 nm.
- - - Radioactivité en coups par minute (CPM) après incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H pendant 6 jours.

## II - OVOGENESE EXPERIMENTALE

### 1 - Etude autoradiographique

L'intensité de la synthèse des RNA dans les ovocytes maintenus en absence du facteur hormonal dépend de deux facteurs : le stade atteint au moment de la levée expérimentale de l'inhibition cérébrale et le temps écoulé depuis l'intervention expérimentale. Les résultats obtenus dans ces différentes conditions ont été reportés dans les tableaux 5, 6 et 7.

Comme pouvaient le laisser prévoir les observations morphologiques, les modifications les plus importantes concernent les ovocytes en vitellogenèse lors de la suppression de l'action hormonale (tableaux 5 et 7). L'incorporation du précurseur est très différente pendant la phase précoce (10 jours après l'opération) et pendant la phase tardive (23 jours après l'opération) de l'ovogenèse expérimentale. Pendant la phase précoce de l'évolution, la cinétique d'incorporation de l'uridine-<sup>3</sup>H ne montre pas de modifications très nettes par rapport aux témoins (Tableau 5 et Pl. XXII, fig. a et b). Le nucléole et les granulations nucléoplasmiques sont marqués dès les temps courts d'incorporation (Pl. XXII, fig. a). Dans les ovocytes de *N. diversicolor*, dont le nucléole est vacuolisé à ce stade, la radioactivité n'est décelable qu'au niveau de l'anneau nucléolaire et jamais dans la vacuole (Pl. XXII, fig. e). Seuls des temps longs d'incorporation mettent en évidence une différence sensible avec les témoins. Il s'agit d'une diminution des transferts nucléo-cytoplasmiques, le marquage du noyau restant assez élevé tandis que la radioactivité cytoplasmique augmente moins que pendant l'ovogenèse naturelle (Tableau 5 b et Pl. XXII, fig. c et d).

Pendant la phase tardive de l'ovogenèse expérimentale, la synthèse des RNA est très faible par rapport à celle des témoins (Tableau 5 c). Le nucléole est encore le site marqué le plus rapidement, bien que faiblement. Chez *N. diversicolor*, cet organite a subi, rappelons-le, la ségrégation de ses constituants et seule la sphère nucléolaire est marquée 1 heure après l'injection (Pl. XXII, fig. f et g). Après une incorporation de longue durée, les grains d'argent, très peu nombreux, sont répartis dans les deux zones de l'amphinucléole. La radioactivité est également décelable dans le nucléoplasme mais le cytoplasme n'est pas marqué (Pl. XXII, fig. h).

La suppression expérimentale de l'influence cérébrale pendant le stade d'élaboration des organites corticaux n'entraîne pas de

Tableau 5 - Etude cinétique de l'incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H *in vivo* au cours de l'ovogénèse expérimentale (*N. diversicolor*). Diamètre ovocytaire initial : 60-100 μ (stade de vitellogenèse).

a - Témoins

	Nucléole	Nucléoplasme	Cytoplasme
1 heure	+	-	-
6 heures	+++	+	-
24 heures	++++	++	+
48 heures	+++	++	++
5 jours	++	+	+++

b - Après 10 jours d'évolution en absence d'hormone

	Nucléole	Nucléoplasme	Cytoplasme
1 heure	+	-	-
6 heures	+++	+	-
24 heures	++++	++	-
48 heures	+++	++	+
5 jours	++	++	++

c - Après 23 jours d'évolution en absence d'hormone

	Nucléole	Nucléoplasme	Cytoplasme
1 heure	+	-	-
6 heures	+	-	-
48 heures	quelques grains	quelques grains	-

modifications de l'incorporation de l'uridine-<sup>3</sup>H par rapport aux témoins (Tableau 6). A ce stade, le métabolisme des RNA se comporte, vis-à-vis de la décérébration, comme l'ensemble de la physiologie ovocytaire (PORCHET, 1974). En fait, les dosages de l'activité endocrine montrent que le taux hormonal est très faible pendant la phase d'élaboration des organites corticaux (DURCHON et PORCHET, 1971 ; PORCHET, 1972). On conçoit alors facilement que l'opération ne modifie pas l'environnement hormonal dans lequel évoluent les ovocytes et n'ait aucune influence sur leur métabolisme.

## 2 - Etude biochimique

L'étude biochimique de la synthèse des RNA a été réalisée sur des ovocytes d'un diamètre initial de 80-100  $\mu$  (vitellogenèse) et de 150-170  $\mu$  (élaboration des organites corticaux), après 12 jours d'évolution en absence d'hormone. Dans le premier cas, on observe une diminution très importante de la radioactivité spécifique des RNA, qui devient très nettement inférieure à celle des ovocytes témoins ayant évolué dans les conditions naturelles (Tableau 8). La baisse de la radioactivité spécifique intéresse les trois classes de RNA séparés en gradient de saccharose (Tableau 8) mais elle est plus importante pour le RNA 18 S (86 % de diminution par rapport aux témoins) que pour le RNA 28 S (77 %) et le RNA 4-5 S (58 %). En outre, les profils de sédimentation du RNA radioactif montrent deux pics supplémentaires (Fig. 7). Ces derniers résultent vraisemblablement de l'accumulation de produits intermédiaires du processus de maturation du rRNA 45 S, processus qui semble être perturbé en absence du facteur hormonal.

La levée de l'inhibition cérébrale pendant le stade de l'élaboration des alvéoles corticaux (ovocytes de 150-170  $\mu$ ) ne provoque aucun des effets observés dans les ovocytes plus jeunes. Les radioactivités spécifiques (Tableau 9) et les profils de sédimentation (Fig. 8) sont sensiblement identiques à ceux des témoins, ce qui est parfaitement conforme aux résultats de l'étude autoradiographique.

Tableau 6 - Etude cinétique de l'incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H *in vivo* au cours de l'ovogenèse expérimentale (*N. diversicolor*). Diamètre ovocytaire initial : 150-170 μ (stade d'élaboration des organites corticaux).

a - témoins

	Nucléole	Nucléoplasme	Cytoplasme
6 heures	+++	++	-
48 heures	++	+	++

b - Après 10 jours d'évolution en absence d'hormone

	Nucléole	Nucléoplasme	Cytoplasme
6 heures	++++	+++	-
48 heures	++	+	+++

c - Après 23 jours d'évolution en absence d'hormone

	Nucléole	Nucléoplasme	Cytoplasme
48 heures	++	+	++

Tableau 7 - Etude cinétique de l'incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H *in vivo* au cours de l'ovogenèse expérimentale (*P. cultrifera*). Diamètre ovocytaire initial : 60-100 μ (stade de vitellogenèse).

a - témoins

	Nucléole	Nucléoplasme	Cytoplasme
1 heure	++	++	-
4 jours	+++	++	+++

b - Après 10 jours d'évolution en absence d'hormone

	Nucléole	Nucléoplasme	Cytoplasme
1 heure	++	++	-
4 jours	+	+	+

### III - DISCUSSION

#### 1 - Evolution de la synthèse des RNA pendant l'ovogenèse naturelle

##### A - RNA d'origine extranucléolaire

Dans les ovocytes jeunes, l'autoradiographie montre que les granulations nucléoplasmiques deviennent fortement radioactives après une incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H pendant un temps court. Ce marquage révèle vraisemblablement une synthèse *in situ* de RNA extranucléolaire. Il est en effet peu probable qu'il résulte uniquement d'une migration de RNA nucléolaires puisque dans les ovocytes en prévitellogenèse, la radioactivité apparaît au niveau des granulations nucléoplasmiques avant d'être détectée dans le nucléole. Il est bien connu que seuls les cistrons codant les rRNA 18 et 28 S sont transcrits dans le nucléole et que la synthèse des autres types de RNA (tRNA, rRNA 5 S, hnRNA) résulte du fonctionnement de gènes localisés dans la chromatine extranucléolaire. Ainsi, dans les ovocytes d'Amphibiens, les gènes impliqués dans la transcription de certains RNA de type messenger et du rRNA 5 S ont été localisés par hybridation moléculaire *in situ* (OLD *et al.*, 1977 ; PUKKILA, 1975) au niveau des boucles des chromosomes plumeux. Or, les granulations nucléoplasmiques des ovocytes de *Nereidae* traduisent un phénomène de décondensation des chromosomes méiotiques analogue à celui des chromosomes plumeux (voir chapitre I). Il est donc tout à fait vraisemblable que l'incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H par les zones extranucléolaires du noyau de l'ovocyte des *Nereidae* témoigne de l'existence de synthèses de RNA de petit poids moléculaire (4 S et 5 S) ou de précurseurs des mRNA (hnRNA), ou encore de plusieurs classes de ces RNA à la fois. En effet, la nature exacte des RNA synthétisés dans les ovocytes très jeunes n'a pu être déterminée, ces derniers n'étant pas accessibles à l'analyse biochimique. Toutefois, l'examen des profils de sédimentation obtenus à partir d'ovocytes plus âgés montre que le taux des RNA de coefficient de sédimentation hétérogène (RNA de type messenger), par rapport aux RNA "stables" (4-5 S, 18 S, 28 S), est faible. Ce résultat est d'ailleurs conforme aux observations effectuées au cours de l'ovogenèse de nombreuses espèces (GROSS *et al.*, 1965 ; BROWN et LITTNA, 1966 ; PIATIGORSKY et TYLER, 1967 ; DAVIS et WILT, 1972). Il est donc fort probable que les RNA extranucléolaires synthétisés au niveau des granulations nucléoplasmiques soient, en grande partie, des RNA 4 et 5 S.

Tableau 8 - Radioactivités spécifiques des RNA extraits d'ovocytes de *P. cultrifera* au stade de vitellogenèse (80-100  $\mu$ ). Comparaison entre les témoins (ovogenèse naturelle) et les ovocytes ayant subi une évolution de 12 jours après l'ablation du prostomium (ovogenèse expérimentale).

Catégories de RNA	Ovogenèse naturelle			Ovogenèse expérimentale		
	Radio-activité (cpm)	D.O.	Radio-activité spécifique (cpm/DO)	Radio-activité (cpm)	D.O.	Radio-activité spécifique (cpm/DO)
4-5 S	9 496	0,25	37 984	4 590	0,29	15 828
18 S	20 721	0,49	42 288	3 741	0,62	6 034
28 S	30 235	0,79	38 272	6 760	0,78	8 667

Tableau 9 - Radioactivités spécifiques des RNA extraits d'ovocytes de *P. cultrifera* au stade d'élaboration des organites corticaux (150-170  $\mu$ ). Comparaison entre les témoins (ovogenèse naturelle) et les ovocytes ayant subi une évolution de 12 jours après l'ablation du prostomium (ovogenèse expérimentale).

Catégories de RNA	Ovogenèse naturelle			Ovogenèse expérimentale		
	Radio-activité (cpm)	D.O.	Radio-activité spécifique (cpm/DO)	Radio-activité (cpm)	D.O.	Radio-activité spécifique (cpm/DO)
4-5 S	3 220	0,18	17 889	2 135	0,16	13 344
18 S	8 523	0,61	13 972	6 255	0,59	10 602
28 S	13 440	0,97	13 856	9 990	0,88	11 352

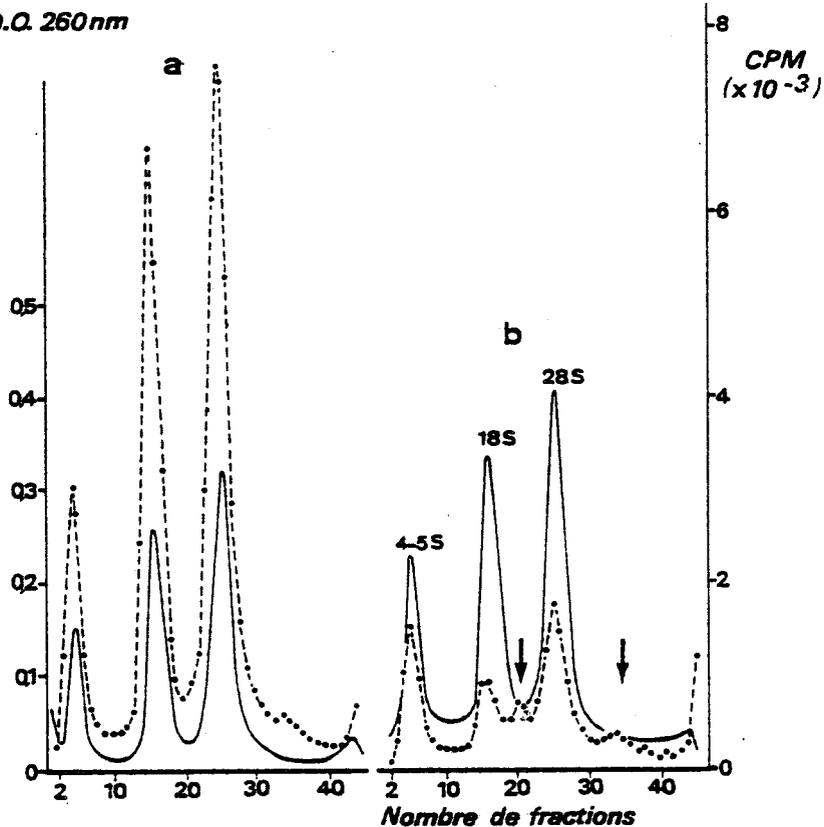


Il est intéressant d'examiner l'évolution des synthèses de RNA extranucléolaires au fur et à mesure de la croissance ovocytaire. Dans les ovocytes en prévitellogenèse, ces synthèses sont plus importantes que celles des rRNA d'origine nucléolaire. Cette prépondérance des synthèses non-nucléolaires s'atténue pendant la vitellogenèse pour disparaître dans les ovocytes en phase d'élaboration des organites corticaux. Cette observation est conforme aux études biochimiques de GOULD et SCHROEDER (1969) et du présent travail, études qui montrent que la radioactivité spécifique des RNA de petit poids moléculaire diminue dans les ovocytes âgés. Ce résultat est à rapprocher des études autoradiographiques et biochimiques effectuées chez les Amphibiens (MAIRY et DENIS, 1971 ; VAN GANSEN *et al.*, 1976 ; SCHEER *et al.*, 1976) et les Poissons (MAZABRAU *et al.*, 1975 ; WEGNEZ *et al.*, 1978). En effet, les ovocytes de ces Vertébrés inférieurs synthétisent beaucoup plus de RNA non-nucléolaires 4 et 5 S que de rRNA 18 et 28 S pendant la prévitellogenèse ; puis cette proportion s'inverse dans les ovocytes en vitellogenèse. Par contre, nos observations s'opposent aux résultats obtenus au cours de l'ovogenèse d'un autre ver marin, *Urechis caupo*, chez lequel la synthèse des différents types de RNA s'accroît dans les mêmes proportions (DAVIS et WILT, 1972 ; DAS, 1976).

#### B - RNA d'origine nucléolaire

Les résultats autoradiographiques et biochimiques montrent que les RNA d'origine nucléolaire (rRNA 18 et 28 S) sont synthétisés à tous les stades de l'ovogenèse, mais à des taux très différents selon les stades. Dans les ovocytes en prévitellogenèse, l'autoradiographie (seule technique applicable à ce stade pour les raisons exposées précédemment) indique que l'intensité des synthèses nucléolaires est plus faible qu'au stade suivant (vitellogenèse). Ces synthèses semblent atteindre un maximum pendant la vitellogenèse, puis diminuent ensuite sensiblement pendant les stades d'élaboration des organites corticaux et de maturité. Ces données autoradiographiques, qui sont en accord avec les observations morphologiques effectuées au niveau du nucléole (voir chapitre II), sont confirmées par l'analyse biochimique. Cette technique a en effet permis de montrer qu'à partir d'un diamètre ovocytaire de 80  $\mu$ , la radioactivité spécifique des rRNA 18 et 28 S diminue progressivement jusqu'à la fin de l'ovogenèse. Le fait que la synthèse des rRNA nucléolaires soit maximale pendant la vitellogenèse rappelle les observations effectuées chez les Amphibiens (MAIRY et

D.O. 260nm



- 69 -

Figure 7 - Profils de sédimentation des RNA extraits à partir d'ovocytes de *P. cultrifera* au stade de vitellogenèse (80-100  $\mu$ ).  
 a - Témoins. b - Ovocytes ayant subi une évolution de 12 jours après ablation du prostomium. — Densité optique (D.O.) à 260 nm.  
 - - - Radioactivité en coups par minute (CPM) après incorporation d'uridine- $^3\text{H}$  pendant 5 jours. Dans le cas de l'ovogenèse expérimentale (b), remarquer la présence de 2 pics supplémentaires (flèches) dans le profil des RNA radioactifs. Ils correspondent à des RNA dont le coefficient de sédimentation est, pour les uns, compris entre 18 et 28 S, pour les autres, supérieur à 28 S.

D.O. 260 nm

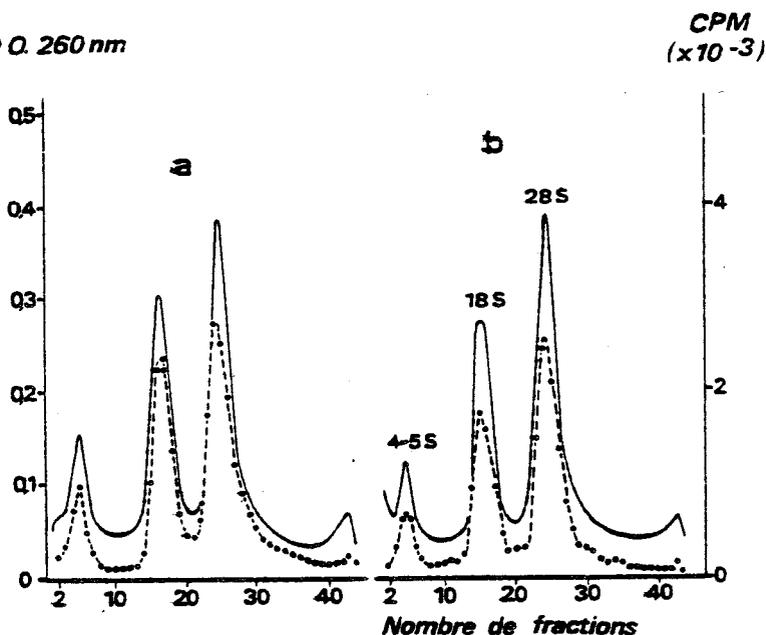


Figure 8 - Profils de sédimentation des RNA extraits à partir d'ovocytes de *P. cultrifera* au stade d'élaboration des organites corticaux (150-170  $\mu$ ).  
 a - Témoins. b - Ovocytes ayant subi une évolution de 12 jours après l'ablation du prostomium. — Densité optique à 260 nm.  
 - - - Radioactivité en coups par minute (CPM) après incorporation d'uridine- $^3\text{H}$  pendant 5 jours.

BIS  
LILLE

DENIS, 1971 ; GURDON, 1974 ; SCHEER *et al.*, 1976) mais s'oppose, là encore, à l'évolution de la synthèse des RNA survenant pendant l'ovogenèse des Echiurides, chez lesquels DAVIS et WILT (1972) et DAS (1976) ont montré que les synthèses de rRNA augmentent au fur et à mesure du déroulement de l'ovogenèse.

## 2 - Régulation hormonale de la synthèse des RNA ovocytaires

Les résultats obtenus tant au cours de l'ovogenèse naturelle que de l'ovogenèse expérimentale mettent en évidence un parallélisme étroit entre l'intensité de la synthèse des RNA et l'activité endocrine cérébrale. Ce synchronisme suggère que l'hormone gouverne le métabolisme ovocytaire en contrôlant la transcription. Ce mécanisme d'action ne différerait donc pas de celui qui est généralement admis pour la plupart des hormones morphogénétiques.

L'étude de la régulation hormonale de l'ovogenèse des *Nereidae* nous apporte toutefois des connaissances très inégales selon la classe de RNA envisagée. Ainsi nous ne disposons que de très peu d'informations sur la régulation hormonale de la synthèse des RNA de type messenger qui ne représentent qu'une faible partie des RNA synthétisés et sont difficilement accessibles aux techniques utilisées. Tout au plus les résultats autoradiographiques nous permettent-ils d'émettre l'hypothèse que la synthèse des hnRNA est favorisée par un taux hormonal élevé puisque l'incorporation de l'uridine-<sup>3</sup>H par les sites extranucléolaires décroît au fur et à mesure de la diminution du taux hormonal. Mais, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les RNA extranucléolaires sont vraisemblablement constitués à la fois de hnRNA et de RNA 4 et 5 S et il est impossible de faire la part exacte de chacun de ces deux types de molécules.

Nos résultats apportent, par contre, des données plus précises en ce qui concerne le contrôle hormonal du stockage des RNA "stables" (tRNA, rRNA 5 S, 18 S et 28 S). Il apparaît en effet très nettement que l'activité endocrine cérébrale est nécessaire à l'élaboration de ces RNA. Au cours de l'ovogenèse naturelle, l'autoradiographie et l'analyse biochimique montrent que la synthèse des RNA stables décroît parallèlement au taux hormonal. Dans les ovocytes soustraits expérimentalement à l'influence cérébrale pendant le stade de vitellogenèse, il se produit une diminution brutale de l'incorporation de l'uridine-<sup>3</sup>H dans ces RNA. Ceci conduit, comme l'ont montré des dosages chimiques (CANER *et al.*, sous presse), à un déficit important en RNA

dans les ovocytes ayant évolué en absence d'hormone, par rapport aux ovocytes ayant subi une ovogenèse naturelle. Parmi les RNA stables, les RNA 18 et 28 S méritent une mention particulière. En effet, leur synthèse diminue de façon plus importante que celle des RNA 4 et 5 S. De plus, la morphologie nucléolaire subit des modifications spectaculaires (vacuolisation), vraisemblablement liées à une altération de la maturation du rRNA 45 S. La sensibilité plus grande des rRNA à la stimulation hormonale a été souvent signalée dans les études consacrées à la régulation des synthèses de RNA, surtout dans le cas d'hormones stéroïdes (revue dans LIAO, 1975), mais également peptidiques (TATA, 1970 ; TURKINGTON, 1972 ; BRÄUER *et al.*, 1976). Toutefois, on sait que la transcription et la maturation des rRNA dépendent de l'activité de gènes extranucléolaires (JACOB *et al.*, 1970 ; SCHMID et SEKERIS, 1973 ; LEVEY et BRINSTER, 1978 ; VOETS *et al.*, 1979). En outre, il a été démontré que l'action hormonale ne s'exerce pas directement au niveau de la transcription des cistrons ribosomiques, mais par l'intermédiaire de mRNA codant des protéines régulatrices (BAULIEU *et al.*, 1972 ; NICOLETTE et BABLER, 1974).

Dans le système que nous avons étudié, la régulation hormonale du stockage des rRNA ovocytaires pourrait s'effectuer selon un mécanisme semblable. L'hormone cérébrale stimulerait la synthèse de mRNA codant des protéines (enzymes ?) qui jouent un rôle important dans la transcription et surtout dans la maturation du rRNA nucléolaire. Cette hypothèse permettrait d'interpréter plusieurs observations. En particulier, l'altération de la maturation du rRNA 45 S, provoquée par la suppression expérimentale de l'influence cérébrale, pourrait s'expliquer facilement par une diminution brutale de la synthèse des enzymes intervenant dans ce processus. De même, le fait que les synthèses nucléolaires soient faibles au début de l'ovogenèse, période qui se déroule pourtant en présence d'un taux élevé d'hormone cérébrale, pourrait être dû au temps de latence nécessaire à la synthèse d'une quantité suffisante de mRNA indispensables à la transcription et (ou) à la maturation du rRNA.

DEUXIEME PARTIE

SPERMATOGENESE

## RAPPEL DES DIFFERENTES ETAPES DE LA SPERMATOGENESE DES NEREIDAE

Chez les *Nereidae*, le déroulement de la spermatogenèse nécessite plusieurs mois. Ainsi, chez *N. diversicolor*, dont la longévité est de deux ans les produits génitaux apparaissent au cours de la deuxième année. On observe des spermatogonies dans le coelome à partir du mois d'octobre. Leur nombre augmente lentement pendant la phase de prolifération spermatogoniale qui dure plusieurs mois. La méiose et la spermiogenèse surviennent peu avant la reproduction dont la période s'étend de février à avril. Il est relativement difficile de suivre l'évolution complète de la spermatogenèse à partir d'animaux prélevés dans la nature pour plusieurs raisons : étalement de la période de reproduction, difficulté de déterminer certains stades avec précision et de replacer dans un ordre chronologique correct les observations effectuées. C'est pourquoi nous avons utilisé la possibilité de réaliser des cultures organotypiques chez *N. diversicolor*. Cette technique rend possible l'étude de la spermatogenèse complète chez un même animal dans un délai assez court. Elle permet en effet de soustraire les spermatogonies à l'action inhibitrice de l'hormone cérébrale et d'obtenir des spermatozoïdes en quelques jours (DURCHON et SCHALLER, 1963) en cultivant des parapodes isolés. Les cellules qui, dans les conditions naturelles, subirait un certain nombre de mitoses de multiplication spermatogoniale, entrent rapidement en méiose (DHAINAUT, 1964a). Mais contrairement au cas de l'ovogenèse, l'accélération de la spermatogenèse ne semble pas entraîner de déséquilibre physiologique et les modalités de l'évolution des cellules ne sont pas différentes de celles de la spermatogenèse naturelle (BERTOUT, 1976).

Dans ces conditions, la fixation régulière de parapodes isolés, cultivés à 15°C, et leur étude en microscopie électronique nous a permis de suivre la chronologie de l'évolution ultrastructurale des cellules germinales mâles chez *N. diversicolor* (BERTOUT, 1976).

### I - STADE DE LA PROLIFERATION SPERMATOGONIALE

L'ultrastructure des spermatogonies telles qu'elles se présentent lors de la mise en culture est illustrée par les Planches XXIII et XXIV. Les spermatogonies sont réunies en "amas mûrifomes" qui sont en fait des groupes de cellules isogéniques : les cystes germinaux (Pl. XXIII, fig. a). Les cellules d'un même amas sont en communication par des ponts cytoplasmiques qui résultent de cytodières incomplètes (Pl. XXIII, fig. b, c et d). La cohésion

des spermatogonies de chaque cyste est réalisée grâce à une intrication très complexe de prolongements cellulaires, le long desquels s'établissent des jonctions du type desmosome (Pl. XXIII, fig. e).

Dans le cytoplasme, l'appareil de Golgi se signale par son intense activité sécrétoire qui aboutit à l'élaboration de deux types de vésicules : les "corps denses" et les "corps multivésiculaires" (Pl. XXIV, fig. a, b, c, d). Une étude cytochimique et cytoenzymologique a permis de préciser la nature de ces différentes formations. L'emploi de la technique de THIERY (1967) montre que les corps denses renferment des polysaccharides (Pl. XXIV, fig. e, f, g, h) vraisemblablement de nature glycoprotéique (BERTOUT, 1976). La recherche de l'activité phosphatasique acide selon la méthode de GOMORI modifiée par MILLER et PALADE (1964) donne un résultat positif au niveau de la matrice des corps multivésiculaires. Les corps denses, par contre, sont toujours indemnes de précipités de plomb (Pl. XXIV, fig. i, j).

## II - STADE SPERMATOCYTE

### 1 - Passage du stade spermatogonie au stade spermatocyte I

La diminution brutale du taux hormonal, qu'elle soit naturelle (chez les animaux âgés) ou provoquée expérimentalement par la suppression de l'action cérébrale, entraîne l'arrêt des mitoses spermatogoniales et l'entrée en interphase préméiotique. Dans les parapodes cultivés en absence de prostomium, cette évolution commence, dans le cas d'explants maintenus à 15°C, dès le 3ème jour de culture. L'entrée en interphase préméiotique ne s'accompagne que de modifications nucléaires qui seront envisagées en détail dans le chapitre V. Les caractères ultrastructuraux du cytoplasme restent identiques à ceux du stade précédent.

### 2 - Prophase méiotique

La prophase méiotique commence aux 8ème et 9ème jour de culture. Elle est marquée par la dissociation des amas mûrifomes. On assiste, dès le stade leptotène, au raccourcissement des prolongements cytoplasmiques et à la disparition des desmosomes (Pl. XXIV, fig. k). Par contre, les ponts intercellulaires subsistent au moins jusqu'au stade pachytène (Pl. XXIV, fig. k). A la fin de la prophase (diplotène, diacinèse), les amas mûrifomes sont complètement dissociés par suite de la résorption totale des prolongements cytoplasmiques et

des ponts intercellulaires. Le spermatocyte qui s'apprête à subir les divisions de maturation est alors une cellule de 6  $\mu$  environ, qui possède un noyau globuleux de 4,5  $\mu$  et dont la majorité du cytoplasme se trouve rejetée à un pôle de la cellule (Pl. XXV, fig. a).

L'appareil de Golgi continue à être engagé, pendant toute la durée de la prophase, dans l'élaboration des corps denses et des corps multivésiculaires. La taille des corps denses augmente sensiblement et atteint 0,5  $\mu$  et plus.

### 3 - Divisions de maturation

Elles surviennent au 11<sup>ème</sup> jour de culture. Pendant leur déroulement, les corps denses sont toujours présents et distribués, parmi les autres organites cytoplasmiques, dans la bande périphérique laissée libre par le fuseau de division (Pl. XXV, fig. b). Les quatre spermatides issues d'un même spermatocyte I sont reliées entre-elles par des ponts (Pl. XXV, fig. d) résultant d'une cytotodiérèse incomplète lors de chacune des divisions de maturation. Ces groupes de quatre spermatides (Pl. XXV, fig. c et d) offrent alors l'aspect caractéristique, en "tétrade", fréquemment observé au microscope photonique (DURCHON et PORCHET, 1971).

### III - STADE SPERMATIDE

La spermiogénèse se déroule au 11 au 12<sup>ème</sup> jour de culture. Pendant toute la durée de ce processus, les spermatides restent groupées en tétrades, qui ne se dissocient que lorsque les spermatozoïdes sont complètement élaborés.

La formation de l'acrosome est illustrée par les figures a, c, d et e de la Planche XXV. La formation de la vésicule acrosomienne est un processus très rapide. Aussitôt après l'achèvement de la méiose, on constate simultanément la disparition des "corps denses" et la présence d'une vésicule acrosomienne (Pl. XXV, fig. a et c). Cette dernière renferme les mêmes constituants que les corps denses (Pl. XXV, fig. a et e).

Des dictyosomes sont présents dans les jeunes spermatides (Pl. XXV, fig. c) et manifestent une légère activité sécrétoire qui reste, toutefois, très limitée. Les corps multivésiculaires, visibles depuis le début de la spermatogénèse, sont encore présents dans les jeunes spermatides (Pl. XXV, fig. c) mais disparaissent à la fin de la spermiogénèse.

L'élaboration du flagelle commence dès le début de la spermiogénèse. Son axonème se constitue à partir du centriole distal.

#### IV - STADE SPERMATOZOÏDE

Les spermatozoïdes mûrs (Pl. XXVI, fig. a) sont présents dans les parapodes cultivés pendant 12 à 13 jours en absence d'hormone cérébrale. L'étude cytochimique et cytoenzymologique permet de constater que si le tube axial de l'acrosome est le siège d'une activité phosphatasique acide importante, la vésicule acrosomienne quant à elle, est indemne de tout précipité de plomb (Pl. XXVI, fig. d et e). Par contre, cette dernière réagit de manière positive à la mise en évidence des polysaccharides selon la méthode de THIERY (Pl. XXVI, fig. f). Le contenu de la vésicule acrosomienne a donc de nombreux points communs avec celui des corps denses observés aux stades précédents. En fait, ces derniers sont vraisemblablement des granules pro-acrosomiens élaborés très précocement, dès le stade spermatogonie, ce qui est un cas peu fréquent dans le règne animal (BERTOUT, 1976).

En ce qui concerne les autres éléments cytoplasmiques, quelques mitochondries, des ribosomes et de nombreuses rosettes de glycogène, sont situés dans la moitié postérieure de la tête spermatique (Pl. XXVI, fig. a). Les centrioles (Pl. XXVI, fig. b et c) et le flagelle (Pl. XXVI, fig. a) du spermatozoïde de *N. diversicolor* ne présentent pas de particularités par rapport à ceux des espèces voisines étudiées (BASS et BRAFIELD, 1974 ; DEFRETIN et WISSOCQ, 1974).

## CHAPITRE V

### ÉVOLUTION MORPHOLOGIQUE DU NOYAU AU COURS DE LA SPERMATOGENÈSE

#### I - STADE DE LA PROLIFÉRATION SPERMATOGONIALE

##### 1 - Structure du noyau interphasique

Le noyau des spermatogonies se caractérise par sa forme très aplatie (Pl. XVII, fig. a). Son épaisseur ne dépasse pas 2,5 à 3  $\mu$  pour une longueur qui peut atteindre 7 à 8  $\mu$ . La chromatine condensée est disposée en mottes de taille et de contour très irréguliers (Pl. XXVII, fig. a et b).

Les espaces interchromatiniens, très développés, occupent de larges plages au centre du noyau (Pl. XXVII, fig. a). Le contraste des coupes par la technique de BERNHARD (1969) montre que ces zones interchromatiniennes renferment trois catégories de formations ribonucléoprotéiques. Il s'agit, selon les critères de localisation et de morphologie ultrastructurale utilisés par MONNERON et BERNHARD (1969), de fibrilles périchromatiniennes et de grains péri- et interchromatiniens (Pl. XXVII, fig. c). Les fibrilles périchromatiniennes constituent un feutrage très dense à la périphérie de l'hétérochromatine. Les grains périchromatiniens ont une taille moyenne de 350 Å. Ils se présentent isolément ou en groupes de quelques unités (Pl. XXVII, fig. c). Les grains interchromatiniens, de taille plus réduite (200 Å), forment au contraire des amas importants (Pl. XXVII, fig. c).

L'appareil nucléolaire est généralement composé de deux nucléoles de 1  $\mu$  environ, souvent situés près de l'enveloppe nucléaire (Pl. XXVII, fig. a). Ils présentent un aspect compact (Pl. XXVII, fig. a et b) qui rend parfois les constituants nucléolaires difficiles à discerner de la chromatine à laquelle ils sont accolés (Pl. XXVII, fig. a). La technique de contraste préférentiel des RNP permet de mieux saisir la structure des nucléoles. Elle montre que le constituant fibrillaire, en contact étroit avec la chromatine périnucléolaire, est pénétré de travées de chromatine intranucléolaire (Pl. XXVII, fig. c). On constate également qu'au stade spermatogonie, les RNP nucléolaires sont essentiellement de nature fibrillaire, seul un nombre restreint de granules est situé dans la région la plus externe de l'organite (Pl. XXVII, fig. c).

## 2 - Mitoses spermatogoniales

L'étude ultrastructurale du matériel nucléaire pendant les divisions de multiplication spermatogonale s'est révélée peu aisée par suite de la rareté des figures de mitose. La faible proportion des cellules en division s'explique vraisemblablement par la lenteur de la prolifération spermatogonale qui, rappelons-le, s'étend sur plusieurs mois. La Planche XXVIII illustre deux stades de la mitose spermatogonale. L'un est vraisemblablement la prophase comme le laisse supposer l'enveloppe nucléaire encore présente (Pl. XXVIII, fig. a et b). Les cellules de l'amas mûriforme représenté sur la figure c de la Planche XXVIII sont en télophase comme l'indiquent les chromosomes déjà fusionnés. Dans ce cas, on peut noter entre deux cellules filles le "corps résiduel" qui subsistera pendant l'interphase sous forme d'un pont intercellulaire (BERTOUT, 1976).

La division se déroule de manière synchrone dans les spermatogonies d'un même cyste. Toutefois, certaines des cellules situées en position externe accusent parfois un léger retard sur l'ensemble de l'amas mûriforme (Pl. XXVIII, fig. a, b et c).

## II - STADE DE L'INTERPHASE PREMEIOTIQUE

L'entrée des cellules germinales mâles en interphase pré-méiotique s'accompagne d'une évolution très caractéristique de l'organisation ultrastructurale du noyau. L'étude autoradiographique de la synthèse des acides nucléiques, réalisée parallèlement (voir chapitre VI), révèle que les différentes étapes de cette évolution correspondent en fait aux périodes  $G_1$ , S et  $G_2$  de l'interphase.

## 1 - Phase G<sub>1</sub>

A partir du 3<sup>ème</sup> jour de culture en absence du facteur hormonal, on peut observer des modifications de la morphologie nucléaire dans un certain nombre d'amas mûriformes (Pl. XXIX, fig. a). Après 5 jours de culture, ces transformations ont atteint la totalité des cystes contenus dans les parapodes isolés.

L'évolution concerne d'abord la forme du noyau qui, jusqu'alors aplatie, devient nettement sphérique (Pl. XXIX, fig. b). La chromatine est disposée en trabécules d'épaisseur assez régulière (0,2  $\mu$ ), anastomosées en un réseau régulier, ce qui donne au noyau un aspect typiquement réticulé (Pl. XXIX fig. b et c, Pl. XXX, fig. a).

Les espaces interchromatiniens se trouvent fragmentés en zones plus petites par suite du développement du réseau de chromatine (Pl. XXIX, fig. b et Pl. XXX, fig. a). Parallèlement, on assiste à une augmentation de la quantité des RNP extranucléolaires. Ces dernières qui étaient, au stade spermatogonie, surtout disposées en bordure de la chromatine condensée, occupent maintenant tout le volume des espaces interchromatiniens (Pl. XXX, fig. b et c). Ce développement des RNP semble s'accompagner d'une certaine décondensation de la chromatine. Le contraste des coupes par la technique de COGLIATI et GAUTIER (1973) montre en effet que les zones interchromatiniennes renferment des fibres qui contiennent du DNA, agencées sous une forme beaucoup moins condensée que dans le réseau d'hétérochromatine (Pl. XXXI, fig. a).

Le matériel nucléolaire s'accroît également de façon sensible par rapport au stade précédent. Les sections de noyau montrent souvent un nucléole central volumineux (Pl. XXIX, fig. c) qui peut atteindre 2  $\mu$  de diamètre. La masse fibrillaire compacte observée au stade spermatogonie fait place à un nucléolonème très riche en éléments granulaires (Pl. XXIX, fig. c). La technique de COGLIATI et GAUTIER met en évidence, à l'intérieur du massif nucléolaire, l'existence d'un fin réseau de chromatine peu condensée (Pl. XXXI, fig. a), émanant de la chromatine péri- et intranucléolaire (Pl. XXXI, fig. b).

## 2 - Phases S et G<sub>2</sub>

Dès le 5<sup>ème</sup> jour de culture, les indices d'une nouvelle évolution de la structure du noyau apparaissent dans certains cystes germinaux. Au 7<sup>ème</sup> jour, toutes les cellules présentent une nouvelle morphologie nucléaire. Le noyau perd son aspect réticulé par suite d'une dispersion importante de la chromatine. L'hétérochromatine est maintenant constituée de mottes de petite taille (0,1 à 0,2  $\mu$ ) disséminées dans le nucléoplasme (Pl. XXX, fig. d).

L'observation de coupes contrastées par la méthode de BERNHARD permet de constater que la quantité des RNP présentes dans le noyau diminue sensiblement. Cette diminution est surtout très nette pour les RNP extranucléolaires (Pl. XXX, fig. e). Par contre, l'état d'évolution de l'appareil nucléolaire n'est pas identique dans tous les noyaux et permet de différencier deux populations cellulaires. Cette hétérogénéité peut s'expliquer par l'existence, à côté d'une majorité de cystes en phase S, d'un certain nombre de cellules en phase G<sub>2</sub> (voir chapitre VI). Dans le premier type cellulaire (Pl. XXX, fig. e), les nucléoles restent aussi développés qu'en phase G<sub>1</sub>. Dans la deuxième catégorie de cellules, les signes de régression nucléolaire sont indéniables (Pl. XXX, fig. d). Dans ce cas, l'organite, dont la taille ne dépasse plus 0,3 µ, est rejeté à la périphérie du noyau et réduit au seul composant fibrillaire.

### III - STADE SPERMATOCYTE

#### 1 - Prophase méiotique

Du 8ème au 10ème jour de culture, l'évolution nucléaire se poursuit par la prophase méiotique (Pl. XXXII, fig. a). Certains stades de cette prophase ont pu être identifiés en utilisant les critères de WESTERGAARD et VON WETTSTEIN (1970). Les axes chromosomiques non appariés des stades leptotène ou jeune zygotène (Pl. XXXII, fig. b) se rencontrent surtout au 8ème jour. Les complexes synaptonématiques (Pl. XXXII, fig. a et c), caractéristiques des stades zygotène et pachytène sont observés au 9ème et 10ème jours de culture.

La technique de BERNHARD permet de mettre en évidence des vestiges du nucléole (Pl. XXXIII, fig. a et c) et des RNP extranucléolaires relativement peu abondantes (Pl. XXXIII, fig. a), dont certaines appartiennent vraisemblablement aux complexes synaptonématiques (Pl. XXXIII, fig. b).

#### 2 - Divisions de maturation

Les deux divisions de maturation surviennent au 11ème jour de culture, les méiocytes sont alors isolés les uns des autres puisque les amas mûrifomes se dissocient à la fin de la prophase (BERTOUT, 1976). Les différentes phases du processus sont assez difficiles à suivre en microscopie électronique. Les figures d et e de la Planche XXXII illustrent deux aspects de télophase dont il est pratiquement impossible de dire s'ils appartiennent à l'une ou l'autre des divisions méiotiques.

La technique de BERNHARD met en évidence une couche périchromosomique de matériel RNP. Ce matériel, distinct des ribosomes, semble essentiellement de nature fibrillaire (Pl. XXXIII, fig. d).

#### IV - STADES SPERMATIDE ET SPERMATOZOÏDE

La structure du noyau des spermatides semble relativement constante pendant la spermiogenèse. Dans les spermatides, le noyau, sphérique, renferme une chromatine disposée en travées anastomosées, d'une épaisseur de 0,2 à 0,3  $\mu$ . Ce réseau délimite les plages interchromatiniennes renfermant des RNP (Pl. XXXIII, fig. e).

Dans le spermatozoïde mûr, le noyau offre l'aspect d'un hémisphère dont la face convexe est dirigée vers le pôle basal de la tête spermatique. Il est creusé en son axe par une invagination de l'enveloppe nucléaire qui constitue le tube axial (BERTOUT, 1976 et Pl. XXVI, fig. a). La chromatine forme une masse plus compacte que dans la spermatide par suite de la coalescence des travées anastomosées. Cette fusion s'accompagne d'une régression du volume occupé par les espaces interchromatiniens qui se trouvent réduits, pour l'essentiel, à un manchon entourant le tube axial (Pl. XXXIII, fig. f).

#### V - DISCUSSION

##### 1 - Morphologie ultrastructurale des RNP nucléaires

###### A - Stades préméiotiques

Au cours des stades préméiotiques (cycles de multiplication spermatogoniale et interphase préméiotique), les noyaux interphasiques renferment trois types de formations ribonucléoprotéiques extranucléolaires (fibrilles périchromatiniennes, grains inter- et périchromatiniens) dont les caractéristiques générales sont identiques à celles décrites dans les cellules de mammifères (MONNERON et BERNHARD, 1969). Seuls les grains périchromatiniens diffèrent légèrement de ceux des cellules de Mammifères dans la mesure où ils sont d'une taille légèrement inférieure (350 Å) et dépourvus de halo clair, la présence de ce dernier étant un des critères d'identification (WATSON, 1962 ; MOYNE *et al.*, 1974 ; FAKAN et PUVION, 1980). Il faut d'ailleurs noter que cette catégorie de RNP nucléaires est celle qui semble montrer les plus grandes variations selon le type cellulaire. Ainsi, les granules des anneaux de Balbiani des glandes salivaires de Diptères, dont la similitude avec les granules périchromatiniens a été démontrée (VAZQUEZ-NIN et BERNHARD, 1971) ne possèdent pas non plus de halo clair. De même, chez l'Euglène, les formations ribonucléoprotéiques qui remplissent un rôle similaire (MOYNE *et al.*,

1975) présentent une structure en U radicalement différente de celle des granules périchromatiniens des cellules de Mammifères.

La structure des RNP nucléaires ne subit pas de modifications lors du passage de la phase de multiplication spermatogoniale à l'interphase préméiotique. La seule différence entre ces deux étapes préméiotiques est d'ordre quantitatif. La signification de l'augmentation des synthèses de RNA qui survient à ce stade de la spermatogenèse sera discutée dans le chapitre VI. Néanmoins nous pouvons remarquer dès maintenant que l'augmentation de la quantité des fibrilles et des grains périchromatiniens est accompagnée d'un accroissement du marquage des noyaux après l'incorporation d'uridine tritiée. Cette convergence entre les observations morphologiques et les résultats autoradiographiques est en accord avec le rôle attribué aux fibrilles et aux grains périchromatiniens. On sait en effet que les fibrilles périchromatiniennes renferment le hnRNA nouvellement transcrit, et que les grains périchromatiniens sont vraisemblablement des formes de stockage et de transport de ce même hnRNA (revue dans FAKAN et PUVION, 1980).

#### B - Stades méiotiques

La méthode de mise en évidence préférentielle des RNP révèle l'existence de matériel contrasté à la périphérie des chromosomes méiotiques au cours de la spermatogenèse des *Nereidae*. Pendant la prophase, il semble qu'une partie de ce matériel RNP soit constituée par les complexes synaptonématiques. Cette observation concorde avec les résultats obtenus chez diverses espèces animales et végétales, soit par la même technique (ESPONDA et STOCKERT, 1971, 1972 ; ESPONDA et GIMENEZ-MARTIN, 1972 ; CHEVAILLIER, 1974), soit par digestion enzymatique (NEBEL et COULON, 1962 ; WESTERGAARD et VON WETTSTEIN, 1970).

Notre étude met également en évidence l'existence de RNP périchromosomiques pendant les divisions de maturation. Ces observations permettent d'étendre aux chromosomes méiotiques les résultats acquis précédemment dans le cas de cellules somatiques en mitose (PAPSIDERO et BRASELTON, 1973 ; MOYNE *et al.*, 1974 ; MORENO DIAZ DE LA ESPINA *et al.*, 1976 ; FAKAN et NOBIS, 1978). MOYNE et GARRIDO (1976) ont montré que les RNP associées aux chromosomes mitotiques étaient synthétisées à la fin de la phase G<sub>2</sub> ou au début de la prophase. Une étude autoradiographique, comparable à celle des auteurs précédents a été réalisée au cours de la spermatogenèse des *Nereidae* (voir chapitre VI). Bien que nos résultats ne permettent pas des conclusions

aussi précises que celles de MOYNE et GARRIDO, il semble néanmoins que des RNA synthétisés pendant l'interphase préméiotique soient présents dans le noyau de cellules en méiose.

## 2 - Contrôle hormonal de la différenciation méiotique

Nos observations font apparaître que les cellules germinales mâles de *N. diversicolor* entrent immédiatement en interphase préméiotique après la suppression de l'action endocrine cérébrale. Des spermatogonies dont la destinée était de subir un certain nombre de cycles mitotiques se différencient donc directement en spermatocytes. Chez les *Nereidae*, le passage de la phase de prolifération spermatogoniale à la phase de différenciation méiotique semble par conséquent sous le contrôle strict de l'hormone cérébrale. Ce fait est, à notre connaissance, assez rare dans l'ensemble du règne animal. Chez les Mammifères, l'existence de "déterminants méiotiques" a été proposée (BYSKOV et SAXEN, 1970), mais les faits expérimentaux en faveur d'une régulation hormonale, notamment hypophysaire, sont controversés (MAULEON, 1973, 1975 ; RIVELIS *et al.*, 1976). Chez les Insectes, les spermatogonies doivent obligatoirement subir un nombre déterminé de divisions mitotiques avant de se différencier en spermatocytes ; la séquence de ces événements étant insensible à l'action de l'hormone juvénile (DUMSER et DAVEY, 1975).

Dans le cas où un contrôle hormonal a été démontré, les mécanismes de régulation semblent beaucoup plus complexes que chez les *Nereidae*. Ainsi, chez les Némertes, dont la spermatogenèse est inhibée, comme chez les *Nereidae*, par un facteur endocrine cérébral, l'ablation du cerveau détermine à la fois une prolifération des spermatogonies et une accélération des synthèses préméiotiques de DNA (RUE et BIERNE, 1978). Chez les Ecrevisses, le passage de la phase de multiplication spermatogoniale à la méiose est contrôlée par plusieurs hormones (AMATO et PAYEN, 1978). Enfin, au cours de l'ovogenèse des Insectes, le déroulement des mitoses ovogoniales d'une part et de la méiose d'autre part, nécessitent des stimuli hormonaux différents (FURTADO, 1979). Le système de régulation de la spermatogenèse des *Nereidae* est donc fondamentalement différent de ces divers exemples. La prolifération des spermatogonies s'effectue en présence d'une activité cérébrale élevée et la suppression de cette activité endocrine suffit à provoquer la différenciation méiotique, la spermatogenèse étant capable de parvenir à son terme en absence de toute action hormonale.

## CHAPITRE VI

### ÉVOLUTION DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES NUCLÉIQUES AU COURS DE LA SPERMATOGENÈSE

#### I - ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE DES SYNTHÈSES DE DNA

##### 1 - Méthode de détermination du taux de réplication

Le taux de réplication d'une population cellulaire est défini comme étant le pourcentage de cellules en phase S, donc capables d'incorporer de la thymidine dans leur DNA (VAN GANSEN, 1979). Il correspond à l'indice de marquage après incorporation de thymidine-<sup>3</sup>H, c'est-à-dire à la proportion de cellules marquées par rapport à l'ensemble des cellules de la population.

En ce qui concerne la spermatogenèse des *Nereidae*, l'indice de marquage a été déterminé dans les conditions suivantes. Des parapodes renfermant des spermatogonies sont mis en culture en absence du facteur hormonal cérébral. A intervalle régulier, l'un d'entre eux est prélevé et transféré dans de l'eau de mer contenant de la thymidine-<sup>3</sup>H. Après 4 heures d'incorporation, il est fixé puis traité ultérieurement pour l'autoradiographie en microscopie photonique (voir matériel et méthodes). Les cystes dont les cellules se trouvent en phase S incorporent intensément le précurseur radioactif (Pl. XXXIV, fig. a - d) et peuvent être facilement dénombrés. L'indice de marquage est calculé suivant la formule :

$$\text{Indice de marquage (en pourcentage)} = \frac{N_1 \times 100}{N_1 + N_2}$$

$N_1$  : nombre de cystes marqués ;  $N_2$  : nombre de cystes non marqués

## 2 - Etude de l'incorporation de la thymidine-<sup>3</sup>H

Le taux de réplication varie considérablement en fonction des stades de la spermatogenèse (Fig. 9 et Pl. XXXIV, fig. a - d). La proportion de cellules en phase S est relativement faible chez les spermatogonies au moment de la mise en culture. Elle reste peu élevée jusqu'au 5ème jour de culture et a plutôt tendance à diminuer dans les tous premiers jours. Elle augmente ensuite nettement pour atteindre un maximum au 7ème jour. Le pourcentage de cellules marquées diminue brutalement au 9ème jour de culture, ce qui s'explique facilement puisque l'étude morphologique montre que la prophase méiotique a commencé, à ce moment, dans la plupart des amas mûriformes.

Ces résultats permettent d'établir que la plupart des cellules germinales (plus de 90 %) se trouvent en phase S préméiotique au 7ème jour de culture. Ils suggèrent par ailleurs que cette phase a une durée de plusieurs jours étant donné qu'un pourcentage notable de cellules (50 % environ) incorpore la thymidine-<sup>3</sup>H dès le 5ème jour. Il est probable que la faible proportion de cystes (moins de 10 %) non marqués au 7ème jour représente des cellules chez lesquelles la réplication est terminée et qui se trouveraient par conséquent en phase G<sub>2</sub>. Elles correspondent vraisemblablement au petit nombre de cellules qui se distinguent de la majorité de la population par la morphologie nucléolaire (voir chapitre V) et par l'intensité de l'incorporation de l'uridine-<sup>3</sup>H (voir paragraphe III-3 de ce chapitre).

Le taux de réplication extrêmement élevé pendant l'interphase préméiotique différencie nettement cette dernière des cycles mitotiques de multiplication spermatogoniale, lesquels sont caractérisés par un indice de marquage très faible. En d'autres termes, les spermatogonies en cours de prolifération n'entrent pas toutes au même moment en phase S, alors qu'il se produit une relative synchronisation des cystes d'un même animal lors de l'interphase préméiotique.

L'autoradiographie à haute résolution (Pl. XXXIV, fig. e et f) permet de vérifier que la phase de synthèse du DNA préméiotique s'accompagne d'une organisation nucléaire particulière. L'incorporation de la thymidine-<sup>3</sup>H s'effectue en effet dans des noyaux dont la chromatine

subit la dispersion décrite dans le chapitre I (Pl. XXX, fig. d). Par ailleurs, les observations permettent de noter l'excellente spécificité de localisation du marquage après incorporation de thymidine-<sup>3</sup>H. La figure f de la planche XXXIV montre que la totalité des grains d'argent est située au niveau de la chromatine, le nucléole étant absolument indemne de tous marquage. Ceci écarte pratiquement toute possibilité d'une incorporation de la radioactivité dans d'autres molécules que le DNA.

## II - ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE DES SYNTHÈSES DE RNA

### 1 - Etude de l'indice de marquage

L'indice de marquage a été déterminé à chaque stade de la spermatogenèse après incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H dans des conditions identiques à celles de la thymidine-<sup>3</sup>H. Seules ont été dénombrées les cellules qui élaborent une quantité relativement importante de RNA, c'est-à-dire, en pratique, les cystes dont les noyaux cellulaires apparaissent sur les autoradiogrammes sous forme de taches noires. L'indice de marquage après incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H (Fig. 10) subit une évolution assez comparable à celle du taux de répllication. Au moment de la mise en culture (jour 0), seule une faible proportion des spermatogonies est le siège d'une synthèse intense de RNA (Fig. 10 et Pl. XXXV, fig. a). Les spermatogonies en phase de prolifération ne sont donc pas toutes en même temps en phase de synthèse des RNA. De plus, l'indice de marquage peu élevé montre que cette période n'occupe qu'une faible partie de l'interphase de chaque cycle mitotique. Par contre, lorsque les cellules entrent en interphase préméiotique, l'indice de marquage augmente considérablement (Fig. 10). Cette augmentation précède celle du taux de répllication puisqu'elle survient dès le 3ème jour de culture (Fig. 10). Au 5ème jour, la totalité des cellules est en phase de synthèse des RNA (Pl. XXXV, fig. b). Une valeur élevée de l'indice de marquage se maintient jusqu'au 7ème jour (Fig. 10 et Pl. XXXV, fig. c). Il semble par conséquent que la phase de synthèses de RNA préméiotiques commence dès la phase G<sub>1</sub> (jour 3) et se poursuit jusqu'à la fin de la phase S (jour 7).

### 2 - Etude de l'intensité de marquage

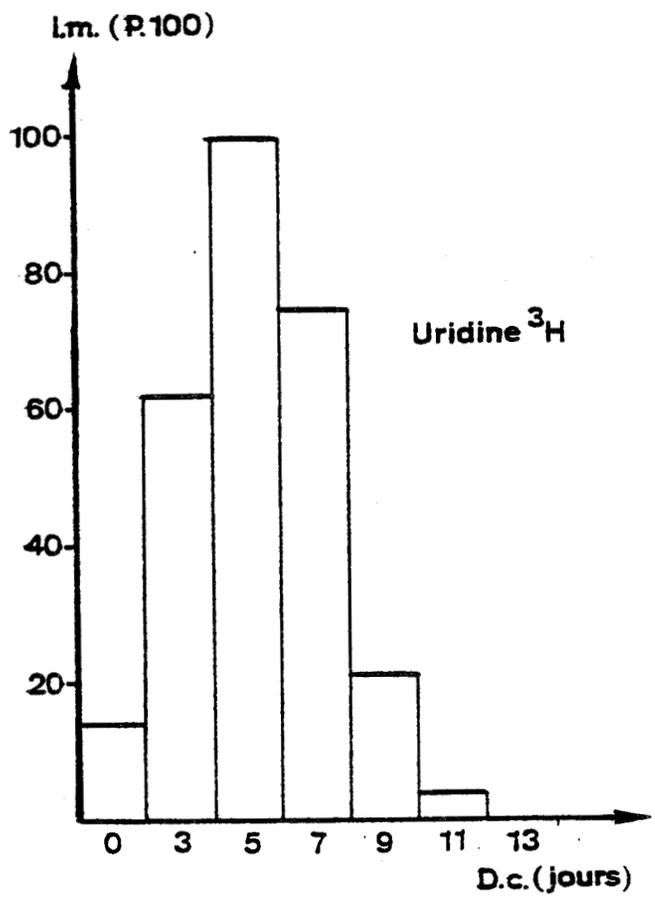
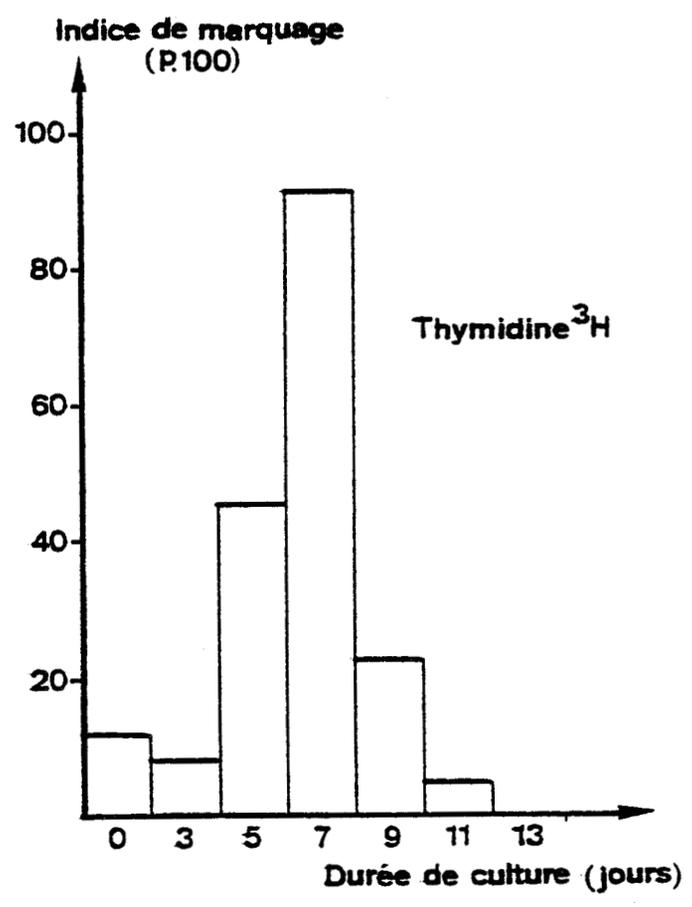
L'étude de l'indice de marquage après incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H nous donne, pour chaque stade de la spermatogenèse, la proportion de la population cellulaire en phase de synthèse des RNA mais ne nous fournit aucune indication sur l'intensité de cette synthèse. Or, ce paramètre est important dans le cas des RNA puisque, contrairement à ce qui se produit pour

Figure 9 - Evolution du taux de réplication au cours de la spermatogenèse. Histogramme donnant l'indice de marquage (pourcentage de cystes marqués après incorporation de thymidine-<sup>3</sup>H) en fonction de la durée de culture.

Le taux de réplication est faible chez les spermatogonies en phase de prolifération prélevées lors de la mise en culture (jour 0). Par contre, l'indice de marquage atteint une valeur supérieure à 90 % au 7<sup>ème</sup> jour de culture, ce qui montre qu'à ce moment presque toutes les cellules sont en phase S préméiotique. Au 11<sup>ème</sup> jour, les cellules d'un certain nombre de cystes se séparent pour subir les divisions de maturation ; la valeur de l'indice de marquage donnée à ce stade ne concerne donc que les cystes non encore dissociés. L'indice est nul au 13<sup>ème</sup> jour de culture, toutes les cellules ayant atteint le stade spermatozoïde.

Figure 10 - Evolution de la proportion de cellules en phase de synthèse des RNA. Histogramme donnant l'indice de marquage (I.m. : pourcentage de cystes marqués après incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H) en fonction de la durée de culture (D.c.).

Comme pour le taux de réplication, l'indice est faible pendant la phase de prolifération spermatogoniale (jour 0) (comparer avec la figure 9). Pendant l'interphase préméiotique, il atteint un maximum (jour 5) qui précède de 2 jours celui du taux de réplication. Remarques identiques à celles de la figure 9 concernant la valeur de l'indice aux 11<sup>ème</sup> et 13<sup>ème</sup> jours.



le DNA, la quantité de RNA élaborée peut varier d'un stade de la spermatogenèse à un autre. C'est pourquoi nous avons réalisé une étude de l'intensité de marquage qui donne une indication sur la quantité d'uridine-<sup>3</sup>H incorporée par chaque cellule.

L'intensité de marquage a été déterminée par mesure de la quantité de lumière réfléchiée par les grains d'argent (voir matériel et méthodes). Les contours cellulaires étant pratiquement impossible à délimiter, c'est le marquage d'une section de cyste entier qui a été mesuré. Les valeurs obtenues sont facilement transposables à l'échelle cellulaire puisque, les cellules isogéniques étant synchronisées, leurs marquages respectifs sont sensiblement identiques. Il nous a semblé préférable de ne mesurer que la radioactivité des cellules en phase de synthèse des RNA, la prise en compte des cellules non marquées abaissant de façon non significative l'expression des résultats. C'est pourquoi les mesures n'ont été effectuées que sur des cystes comptabilisés positivement lors de l'établissement de l'indice de marquage.

Les résultats montrent que les spermatogonies en phase de synthèse des RNA lors de la mise en culture (jour 0) présentent une intensité de marquage beaucoup plus faible que les cellules en interphase préméiotique (Fig. 11). L'évolution de l'intensité des synthèses de RNA a pu être suivie pendant toute la durée de cette interphase. On observe que le taux d'incorporation de l'uridine-<sup>3</sup>H augmente dès le début de la phase G<sub>1</sub> (jour 3), atteint un maximum au 5ème jour de culture, puis décroît légèrement pendant la phase S (jour 7). L'entrée de la majorité des spermatocytes en prophase méiotique (9ème jour) s'accompagne d'une diminution brutale de l'incorporation (Fig. 11 et Pl. XXXV, fig. d) qui devient presque nulle à la fin de la spermatogenèse (Pl. XXXV, fig. e et f).

### 3 - Localisation ultrastructurale du marquage nucléaire

En permettant une localisation ultrastructurale des sites d'incorporation du précurseur, l'autoradiographie à haute résolution apporte des précisions sur l'origine intranucléaire des RNA élaborés.

Ainsi, pendant la phase G<sub>1</sub> de l'interphase préméiotique (5ème jour de culture), on observe que l'augmentation de la synthèse des RNA est due surtout à une incorporation nucléolaire très élevée. Les synthèses qui se produisent dans les zones interchromatiniennes

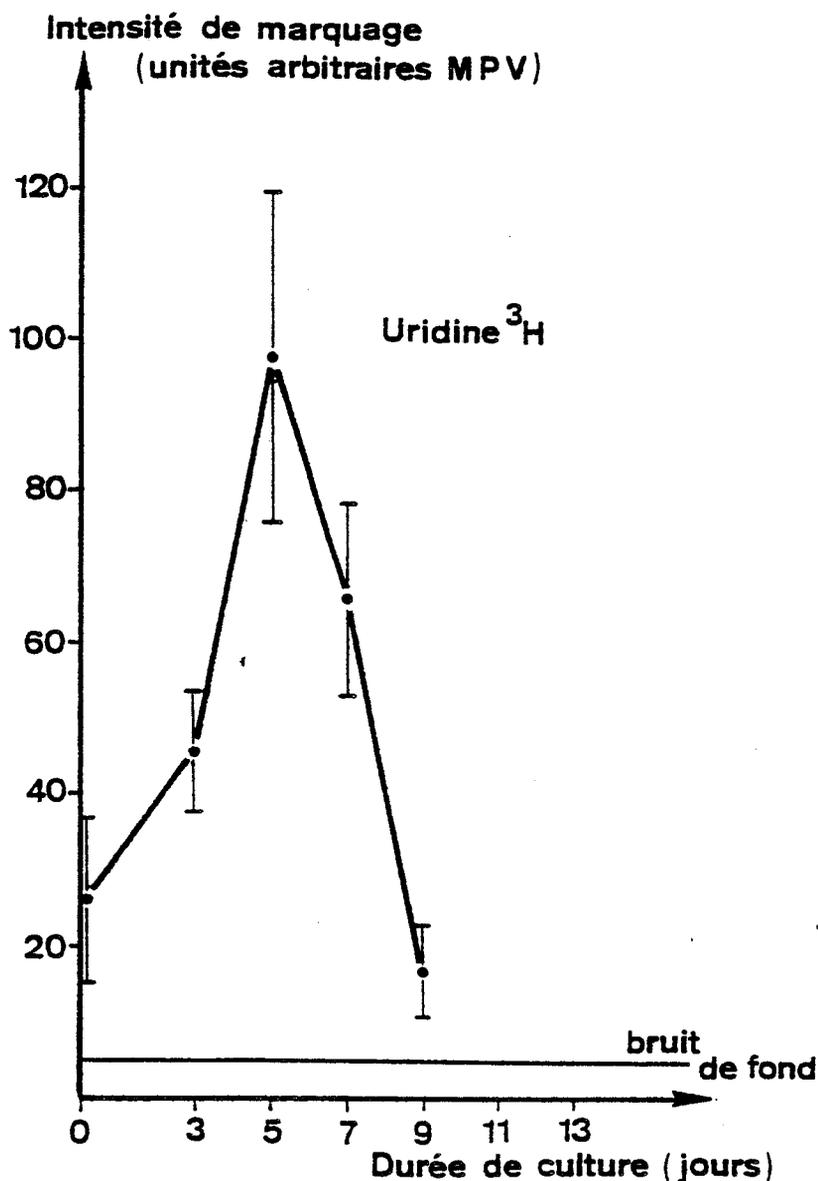


Figure 11 - Evolution de l'intensité de marquage après incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H.

L'intensité de marquage est donnée en unités arbitraires lues sous forme d'intensités électriques sur le galvanomètre du micro-photomètre Leitz MPV (voir matériel et méthodes). Le marquage a été évalué sur des sections de cystes entiers (voir texte) ; les mesures n'ont donc été effectuées que jusqu'au stade où les cystes ne sont pas dissociés (9<sup>ème</sup> jour de culture). Chaque valeur est la moyenne de mesures réalisées sur 15 cystes (ce qui équivaut à plus de 100 sections de cellules) ; l'écart-type correspondant est porté sur le graphique.



sont beaucoup plus modestes (Pl. XXXVI, fig. a). Au 7ème jour, les autoradiogrammes révèlent, comme l'étude morphologique au même stade (voir chapitre V), l'existence de deux catégories de cellules germinales, qui correspondent vraisemblablement aux phases S et G<sub>2</sub> de l'interphase préméiotique (voir paragraphe II-1 de ce chapitre). Les premières (phase S), qui sont les plus fréquemment rencontrées, font encore l'objet, comme au 5ème jour, d'un marquage très élevé avec une prépondérance des synthèses nucléolaires (Pl. XXXVI, fig. b). Dans la seconde population (phase G<sub>2</sub>), l'incorporation de l'uridine-<sup>3</sup>H est nettement plus faible. La diminution du marquage va de pair avec la régression du nucléole (Pl. XXXVI, fig. c).

Dans les spermatocytes en prophase méiotique, on constate que la radioactivité diminue de manière considérable (Pl. XXXVI, fig. d), comme l'indiquait l'autoradiographie en microscopie photomicroscopique. Un marquage non négligeable est néanmoins détectable dans les noyaux des cellules encore groupées en amas mûriforme, notamment au stade pachytène (Pl. XXXVI, fig. d). Dans ce cas, les grains d'argent sont disséminés dans les zones interchromatiniennes, la régression du nucléole étant pratiquement achevée à ce stade. Les étapes ultérieures de la spermatogenèse : dissociation des cystes, divisions de maturation, spermiogenèse (Pl. XXXVI, fig. e), voient l'incorporation de l'uridine devenir pratiquement nulle.

### III - ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE DU DEVENIR DES RNA SYNTHETISES AVANT LES DIVISIONS DE MATURATION

L'existence de synthèses de RNA très intenses pendant l'interphase préméiotique et l'absence quasi complète de ces synthèses au cours des stades méiotiques et post-méiotiques nous ont incité à rechercher si les RNA élaborés pendant les phases précoces de la spermatogenèse sont conservés jusqu'aux stades ultérieurs. Des cellules germinales à divers stades de la spermatogenèse ont été marquées par l'uridine-<sup>3</sup>H dans les mêmes conditions que précédemment. Au terme de la période d'incorporation de 4 heures, les parapodes sont soigneusement lavés dans l'eau de mer puis mis de nouveau en culture jusqu'au moment de la fixation qui survient à différents stades de la méiose et de la spermiogenèse.

## 1 - Devenir des RNA pendant la méiose

### A - Cellules fixées pendant la prophase méiotique

Lorsque le précurseur est incorporé pendant l'interphase préméiotique, on constate qu'au 9ème jour de culture les amas de spermatocytes en prophase sont très marqués (Pl. XXXVII, fig. a et b). La radioactivité est maximale lorsque l'incorporation a été réalisée au 5ème jour de culture (Pl. XXXVII, fig. a). L'autoradiographie à haute résolution montre que les grains d'argent sont disséminés aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme (Pl. XXXVIII, fig. a et b).

### B - Cellules fixées pendant les divisions de maturation

Les cellules fixées à ce stade (11ème jour de culture) peuvent être marquées soit pendant l'interphase préméiotique (3ème-7ème jour), soit pendant la prophase méiotique (9ème jour). Les spermatocytes présentent une radioactivité importante lorsque l'incorporation de l'uridine-<sup>3</sup>H a lieu pendant l'interphase préméiotique (Pl. XXXVII, fig. c). Par contre, ils ne sont que faiblement marqués lorsque l'incorporation est effectuée pendant la prophase (Pl. XXXVII, fig. e).

Il semble par conséquent qu'une certaine quantité de RNA synthétisés pendant l'interphase préméiotique soit conservée pendant la prophase méiotique et les divisions de maturation. En revanche, seule une petite quantité des RNA élaborés pendant la prophase méiotique paraît être conservée pendant les divisions de maturation. La localisation nucléaire d'une partie appréciable des RNA conservés (Pl. XXXVIII, fig. a - c) est à rapprocher de l'existence de RNP associés aux chromosomes méiotiques (voir chapitre V). Les observations autoradiographiques plaident en faveur de l'idée selon laquelle ces RNP seraient synthétisées pendant l'interphase préméiotique, selon un processus analogue à celui de la mitose (MOYNE et GARRIDO, 1976).

## 2 - Devenir des RNA pendant la spermiogenèse

Un marquage significatif est encore décelé au stade spermatide après incorporation du précurseur pendant l'interphase préméiotique (Pl. XXXVII, fig. d) ou la prophase (Pl. XXXVII, fig. e). La radioactivité est néanmoins plus faible qu'aux stades qui précèdent. Il semble par conséquent qu'une proportion importante des RNA conservés soit dégradée pendant la méiose et au début de la spermiogenèse.

L'autoradiographie à haute résolution révèle qu'une grande partie du marquage est localisée au niveau du noyau (Pl. XXXVIII, fig. d). Là encore, la conservation de RNA synthétisés à des stades antérieurs pourrait

expliquer l'existence des RNP nucléaires mis en évidence par la méthode de BERNHARD (voir chapitre V), à un stade où l'autoradiographie témoigne d'un arrêt presque total de la synthèse des RNA (voir paragraphe II de ce chapitre).

### 3 - Contrôles

Les résultats de telles expériences doivent être interprétés avec prudence ; la réutilisation de produits de dégradation des RNA marqués est une possibilité qui doit être envisagée. C'est pourquoi des digestions enzymatiques ont été réalisées pour détecter une éventuelle incorporation de la radioactivité dans le DNA. La digestion par la DNase ne provoque pas une diminution notable du marquage (Pl. XXXVII, fig. f). Par contre, la RNase, seule ou précédée d'une hydrolyse par la protéase, entraîne la disparition presque complète des grains d'argent (Pl. XXXVII, fig. g). L'absence de réutilisation des molécules tritiées dans les RNA nouvellement synthétisés est plus difficile à vérifier. Toutefois l'existence d'un marquage parfois intense (Pl. XXXVII, fig. a - c) à des stades où il a été démontré que la synthèse des RNA est très faible est un argument en faveur de la réalité du processus de stockage des RNA élaborés pendant les stades précoces de la spermatogenèse.

## IV - DISCUSSION

### 1 - Evolution des synthèses de RNA au cours de la spermatogenèse

#### A - Variations du taux de synthèse des RNA

L'étude autoradiographique quantitative des synthèses de RNA pendant la spermatogenèse des *Nereidae* révèle l'existence de variations considérables en fonction du stade considéré. En particulier, des différences très nettes ont été décelées entre les interphases mitotiques de la période de prolifération spermatogoniale et l'interphase préméiotique. Pendant la phase de multiplication spermatogoniale, le taux d'incorporation de l'uridine-<sup>3</sup>H est faible (étude de l'intensité de marquage), et réduit à une période assez brève de chaque cycle mitotique (étude de l'indice de marquage). Par contre, pendant l'interphase qui précède la méiose, les résultats montrent que la synthèse des RNA est très intense durant plusieurs jours. Pendant l'interphase préméiotique, les indices morphologiques (voir chapitre V) d'une augmentation de la synthèse des RNA (développement du nucléole, dispersion accrue de

la chromatine, augmentation de la quantité de RNP extranucléaires) concordent parfaitement avec les données autoradiographiques.

Un tel résultat est en contradiction avec la plupart des études effectuées chez d'autres espèces. L'autoradiographie révèle en effet une diminution des synthèses de RNA pendant l'interphase préméiotique chez la Souris (MONESI, 1964), *Urechis caupo* (DAS, 1968) et le Xénope (KALT, 1979). Seuls TRES et KIERSZENBAUM (1977) signalent que, dans l'espèce humaine, le marquage des spermatogonies et notamment de leurs nucléoles est très variable et vraisemblablement lié aux phases du cycle mitotique.

#### B - Synthèse des différentes classes de RNA

L'autoradiographie à haute résolution permet d'apporter des précisions sur la nature des RNA marqués puisque la localisation des sites d'incorporation (nucléolaire ou extranucléolaire) fournit une indication sur le type de RNA synthétisé. Il semble que chez les *Nereidae*, l'élaboration de certaines classes de RNA soit restreinte à des phases déterminées de la spermatogenèse. Il apparaît en effet que, pendant l'interphase préméiotique, sont synthétisés à la fois du RNA nucléolaire (rRNA) et des RNA d'origine extranucléolaire, vraisemblablement surtout constitués par des hnRNA. En revanche, seuls des RNA extranucléolaires sont élaborés pendant la prophase méiotique. Cette absence complète de synthèses de rRNA au cours de la prophase s'accompagne d'une régression des nucléoles (voir chapitre V). Elle oppose la spermatogenèse des *Nereidae* à l'ensemble des données de la littérature. Les nombreux travaux réalisés à ce stade chez différentes espèces indiquent en effet une augmentation des synthèses de rRNA pendant la prophase méiotique avec un maximum au zygotène (KIERSZENBAUM et TRES, 1974 ; GALDIERI et MONESI, 1974 ; TRES, 1975) ou au pachytène (PARCHMAN et LIN, 1972 ; STEFANINI *et al.*, 1974 ; SÖDERSTRÖM et PARVINEN, 1976a). Par contre, la synthèse des RNA d'origine extranucléolaire mise en évidence notamment pendant le stade pachytène, est un résultat similaire à ceux qui ont été obtenus chez les espèces animales et végétales les plus diverses (HENDERSON, 1964 ; MONESI, 1965 ; DAS, 1965 ; DAS *et al.*, 1965 ; UTAKOJI, 1966 ; BRASIELLO, 1968).

#### C - Conservation des RNA synthétisés

Chez les *Nereidae*, les divisions de maturation et la spermiogenèse sont marquées par un arrêt pratiquement total de la synthèse des RNA. Le fait que les spermatides ne synthétisent pas de quantités appréciables de RNA constitue une caractéristique générale de la spermatogenèse. Certains auteurs affirment que la transcription du génome haploïde des spermatides est inexistante (DAS, 1968 ; BRASIELLO, 1968 ; GOULD-SOMERO et HOLLAND,

1974 ; BROCK, 1977). Il semble néanmoins subsister des synthèses de RNA dans les spermatides jeunes chez les Rongeurs (MONESI, 1964, 1965 ; UTAKOJI, 1966 ; MOORE, 1971 ; KIERSZENBAUM et TRES, 1975 ; SÖDERSTRÖM et PARVINEN, 1976 b ; GEREMIA *et al.*, 1978), les Oiseaux (MEZQUITA et TENG, 1977), les Amphibiens (KALT, 1979) et les Insectes (HENDERSON, 1964 ; MUCKENTHALER, 1964 ; DAS *et al.*, 1965). Toutefois, il est généralement admis que la plus grande partie des RNA nécessaires aux synthèses protéiques de la spermiogenèse est élaborée pendant la prophase méiotique (GOULD-SOMERO et HOLLAND, 1974 ; SÖDERSTRÖM et PARVINEN, 1976b ; BETLACH et ERICKSON, 1976 ; GEREMIA *et al.*, 1977). Les expériences réalisées chez *Nereis diversicolor* suggèrent que les RNA conservés jusqu'aux stades post-méiotiques proviennent essentiellement des synthèses effectuées pendant l'interphase préméiotique. Cette différence peut s'expliquer par le fait que, chez les *Nereidae*, la synthèse des RNA devient plus faible pendant la prophase méiotique, à l'inverse de ce qui se produit chez les autres espèces étudiées.

## 2 - Synthèses préméiotiques de RNA et contrôle hormonal de la différenciation méiotique

L'étude de la synthèse des RNA pendant la spermatogenèse de *Nereis diversicolor* fait ressortir une différence très nette entre les spermatogonies en cours de multiplication et les cellules s'apprêtant à subir la méiose. L'incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H est en effet beaucoup plus élevée pendant l'interphase préméiotique que pendant les cycles mitotiques. Or, les travaux consacrés à la différenciation méiotique, tant dans le règne animal que végétal (revue dans D'AMATO, 1977 ; HOLM, 1977) suggèrent que se déroulent pendant l'interphase préméiotique des processus moléculaires essentiels dans le déterminisme des événements caractéristiques de la méiose (appariement des chromosomes, formation des chiasmas, disjonction des chromosomes homologues). Ainsi, HOTTA *et al.* (1966) ont montré que, contrairement à ce qui se produit au cours des cycles mitotiques, la totalité du DNA n'est pas répliquée pendant l'interphase qui précède la méiose. La répllication d'une faible proportion (0,3 à 0,4 %) du DNA est différée jusqu'au stade zygotène, en concordance avec l'appariement des chromosomes. D'abord établies chez le Lys (HOTTA *et al.*, 1966 ; STERN et HOTTA, 1969), ces données ont été étendues plus récemment aux Mammifères (CHANDLEY, 1978). La synthèse des histones est également un élément de la différenciation de la méiose

qui intervient dès l'interphase préméiotique (SHERIDAN et STERN, 1967). En effet, alors que la synthèse des histones est synchrone de celle du DNA pendant les cycles mitotiques, il n'en est pas de même dans le cas de la méiose. Seulement 75 % des histones sont présentes à la fin de la phase S, leur synthèse n'est achevée que pendant la prophase méiotique (BOGDANOV *et al.*, 1968 ; ANTROPOVA et BOGDANOV, 1970 ; BOGDANOV et ANTROPOVA, 1971 ; BOGDANOV *et al.*, 1973).

En revanche, peu de travaux ont incriminé une augmentation de la synthèse préméiotique des RNA dans le processus de différenciation de la méiose. Seuls, à notre connaissance, ROTH (1973) et AMATO et PAYEN (1978) signalent respectivement une synthèse de RNA anormalement faible chez un mutant améiotique de la Levure de bière et un enrichissement en RNA avant la méiose au cours de la spermatogenèse d'une Ecrevisse. L'hypothèse selon laquelle, au cours de la spermatogenèse des *Nereidae*, l'augmentation des synthèses de RNA joue un rôle important dans la différenciation méiotique, mérite donc d'être examinée. Une telle hypothèse est d'autant plus attrayante que le déroulement de l'interphase préméiotique semble soumis au contrôle de l'hormone cérébrale comme le suggèrent plusieurs faits expérimentaux. Tout d'abord, la suppression de l'action endocrine du cerveau provoque une séquence d'évènements dont le premier est l'augmentation de la synthèse des RNA, laquelle est suivie de la réplication préméiotique du DNA, puis de la méiose. En outre, des expériences d'associations de cerveaux à des parapodes préalablement isolés (DURCHON *et al.*, 1965) ont montré qu'il était possible d'arrêter la différenciation des méiocytes à condition de réintroduire le facteur hormonal avant les synthèses préméiotiques de DNA.

On peut donc se demander : 1) si les différentes étapes de la différenciation méiotique (réplication préméiotique du DNA, prophase, divisions de maturation) sont obligatoirement tributaires d'une augmentation préalable de la synthèse des RNA ; 2) si la régulation hormonale de la différenciation méiotique s'exerce par l'intermédiaire d'un contrôle de la synthèse préméiotique des RNA. Pour tenter de répondre à ces questions, deux séries d'expériences ont été entreprises. En premier lieu, l'évolution de la synthèse des RNA, la réplication du DNA et le déroulement de la méiose ont été examinés après réintroduction de l'action hormonale à différents stades de la spermatogenèse (chapitre VII). Dans un deuxième temps, nous avons recherché si l'action de substances inhibitrices de la synthèse des RNA avait des effets comparables à ceux de la réintroduction de l'activité endocrine cérébrale (chapitre VIII).



## CHAPITRE VII

### EFFETS DE LA RÉINTRODUCTION DE L'ACTION HORMONALE

#### I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Des parapodes isolés sont mis en culture et ainsi soustraits à l'inhibition hormonale du cerveau. Les spermatogonies qu'ils renferment donnent des spermatozoïdes en 12 à 13 jours et constituent les témoins "parapodes isolés". L'action hormonale est réintroduite en associant un prostomium prélevé chez un individu jeune à un parapode primitivement isolé. L'association peut être effectuée soit dès la mise en culture des parapodes (témoin "prostomium"), soit après des durées variables de culture, donc à différentes étapes de la spermatogenèse (Fig. 12). L'évolution des cellules germinales est suivie grâce à l'étude de parapodes fixés périodiquement. L'état cellulaire est déterminé d'un triple point de vue : taux de réplication, intensité de la synthèse des RNA, morphologie ultrastructurale. Dans les deux premiers cas, la fixation est précédée d'une incorporation de thymidine-<sup>3</sup>H ou d'uridine <sup>3</sup>H (Fig. 12), dans les conditions indiquées dans le chapitre VI.

#### II - REINTRODUCTION DE L'ACTION HORMONALE PENDANT L'INTERPHASE PREMEIOTIQUE

Les résultats obtenus sont très différents selon la période de l'interphase pendant laquelle l'association avec un prostomium est effectuée.



1 - Avant la phase S prémeiotique

A - Avant l'augmentation de la synthèse des RNA

La réintroduction de l'activité endocrine avant le 3ème jour de culture empêche la production de spermatozoïdes. Les cellules germinales subissent alors une évolution sensiblement identique à celle des témoins "prostomium". Le taux de réplication se maintient pratiquement à une même valeur jusqu'au 11ème jour de culture (Fig. 13 b). Cette valeur est peu différente de celle des spermatogonies prélevées au moment de la mise en culture (jour 0). Le taux de réplication diminue fortement pour des durées de culture relativement longues (15 à 20 jours), mais ne subit jamais l'augmentation caractéristique de la phase S prémeiotique observée au 7ème jour chez les témoins "parapodes isolés" (fig. 13 a).

La morphologie ultrastructurale des noyaux indique également que les cellules des parapodes associés à un prostomium avant le 3ème jour de culture subissent une évolution similaire à celle des témoins "prostomium". Pendant les 7 ou 8 premiers jours, les noyaux conservent l'aspect qu'ils présentent lors de la mise en culture (Pl. XXXIX, fig. a). Puis les cellules subissent des modifications assez difficilement interprétables. Vers le 10ème jour de culture (Pl. XXXIX, fig. b), la morphologie nucléaire rappelle celle des cellules en interphase prémeiotique (noyaux réticulés, de forme sphérique). Mais cette évolution conduit à une organisation inhabituelle (Pl. XXXIX, fig. c) qui n'est observée à aucun stade de la spermatogenèse naturelle. Ainsi, au 20ème jour de culture, la chromatine présente un aspect intermédiaire entre l'état condensé et l'état dispersé, tandis que les espaces interchromatiniens apparaissent relativement denses aux électrons. Ces transformations donnent naissance à des noyaux où les limites des différents constituants sont difficiles à discerner (Pl. XXXIX, fig. c). Aucun indice de l'entrée en méiose n'a été décelé dans de telles cellules.

B - Pendant l'augmentation de la synthèse des RNA

L'association d'un prostomium à partir du 3ème jour de culture ne bloque pas l'entrée en interphase prémeiotique mais modifie très nettement la chronologie de la spermatogenèse. L'étude du taux de réplication (Fig. 13 a et c) montre que la phase S prémeiotique survient avec un retard d'autant plus important que la réintroduction de l'activité hormonale est plus précoce. Ainsi, pour une réassociation parapode-prostomium au 3ème jour, le retard est de 4 à 5 jours. Il n'est plus que de 2 jours pour une réassociation au 5ème jour (Fig. 13 c).

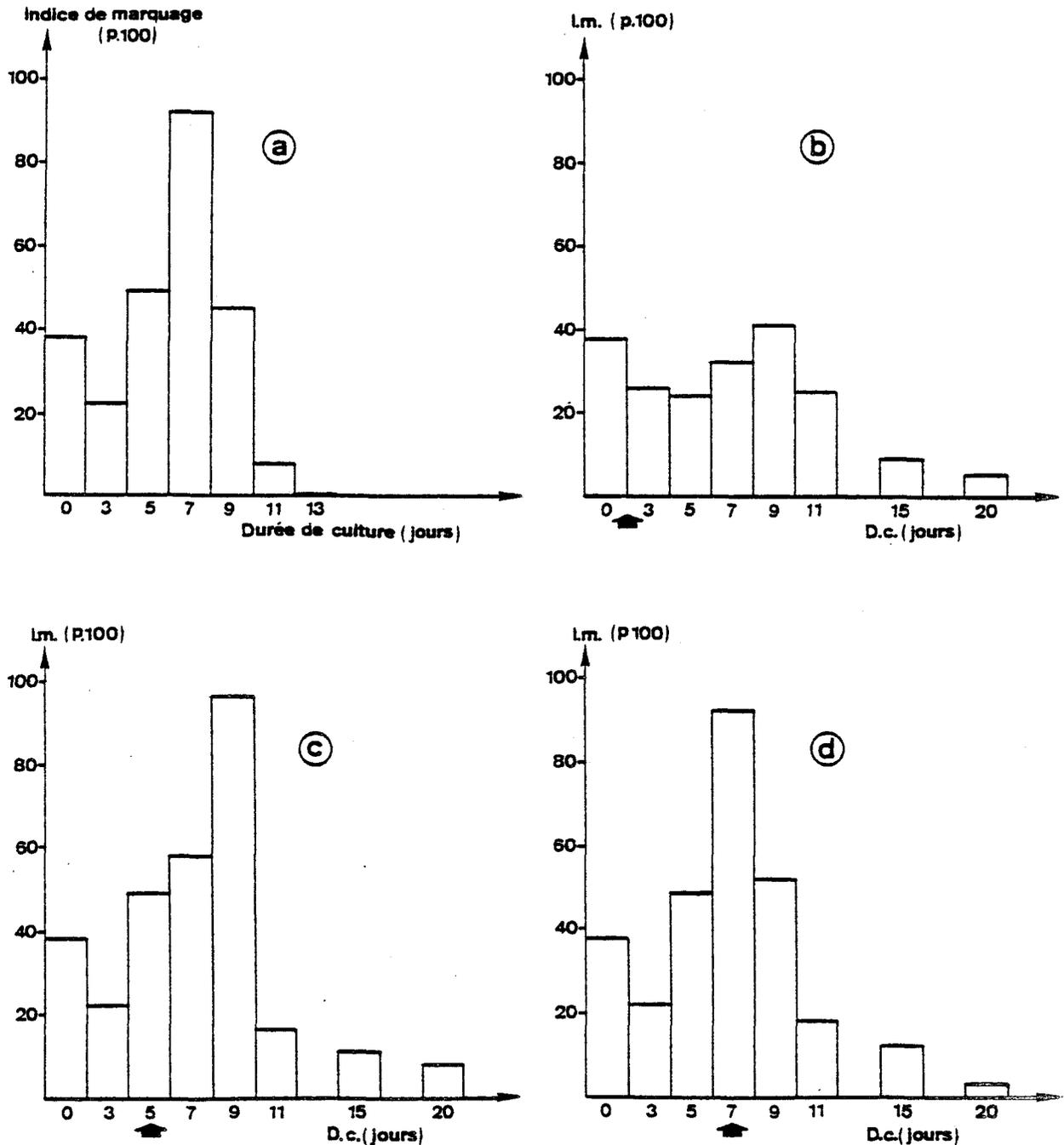


Figure 13 - Effet de la réintroduction de l'action hormonale sur le taux de réplication [Indice de marquage (I.m.) après incorporation de thymidine-<sup>3</sup>H].

Tous les cystes étudiés proviennent de parapodes isolés à partir d'un même animal.

- a - Témoins "parapodes isolés", évoluant en absence de l'activité hormonale pendant toute la durée de la culture (voir figure 9).
- b - Réintroduction de l'activité endocrine au 1er jour de culture (flèche). Le taux de réplication reste sensiblement identique à celui des cellules prélevées au moment de la mise en culture (jour 0). Il diminue à partir du 15ème jour mais ne subit jamais l'augmentation caractéristique de la phase S préméiotique. Les cellules sont encore groupées en cystes au 20ème jour (voir figure 15).
- c - Réintroduction au 5ème jour (flèche). Le maximum atteint par le taux de réplication (phase S préméiotique) est décalé de 2 jours par rapport au témoin (histogramme a). Les cellules ayant subi ce léger décalage sont encore en prophase méiotique au 20ème jour (voir figure 15).
- d - Réintroduction au 7ème jour (flèche). Pas d'effet sur le taux de réplication (comparer avec l'histogramme a). Les cellules de cette série expérimentale sont encore en prophase méiotique au 15ème jour et ne subissent les divisions de maturation qu'au 20ème jour de culture (voir figure 15).



L'étude de l'intensité de marquage après incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H permet de suivre l'évolution de la synthèse des RNA dans de telles conditions expérimentales (Fig. 14). On constate que, pendant les premiers jours qui suivent la réintroduction du facteur hormonal, il se produit une diminution de l'incorporation de l'uridine-<sup>3</sup>H par rapport aux témoins "parapodes isolés". Par contre, alors que chez les témoins la synthèse des RNA cesse pratiquement après le 9ème jour de culture (lors de la dissociation des cystes), les cellules remises en présence du facteur hormonal restent groupées en amas mûri-formes et continuent à être le siège d'une incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H, au moins jusqu'au 15ème jour de culture. L'intensité de marquage, quoique faible, est significative (Fig. 14).

L'observation de ces amas au microscope électronique montre que les noyaux conservent une morphologie caractéristique de l'interphase préméiotique (Pl. XXXIX, fig. d) pendant une durée plus ou moins longue (Fig. 15). Les indices de l'entrée en prophase méiotique sont d'autant plus précoces que l'association parapode-prostomium est plus tardive (Fig. 15). Cette étude ultrastructurale indique en outre que, dans tous les cas, la durée de la prophase est nettement supérieure à celle des témoins "parapodes isolée" (Fig. 15).

En conclusion, il apparaît que la réintroduction de l'inhibition cérébrale pendant l'augmentation de la synthèse des RNA, provoque un léger retard de la phase S préméiotique, un allongement de la durée de l'interphase préméiotique et de la prophase méiotique, accompagnés d'un étalement des synthèses de RNA.

## 2 - Pendant la phase S préméiotique

Lorsque les cellules ont atteint la phase S de l'interphase préméiotique, l'association d'un prostomium est encore capable de modifier le déroulement de la spermatogenèse. Mais cette intervention expérimentale n'altère pas l'histogramme donnant le taux de répllication en fonction de la durée de culture. Ce dernier est pratiquement identique à celui du témoin "parapode isolé" (Fig. 13 a et d).

Par contre, l'examen de la morphologie nucléaire révèle que les premiers indices de l'entrée en prophase méiotique apparaissent avec environ deux jours de retard par rapport aux témoins (Fig. 15 et Pl. XXXIX, fig. e). En d'autres termes, il se produit une légère augmentation de la durée de l'interphase préméiotique, due vraisemblablement à un allongement modéré de la phase G<sub>2</sub>. De plus, comme

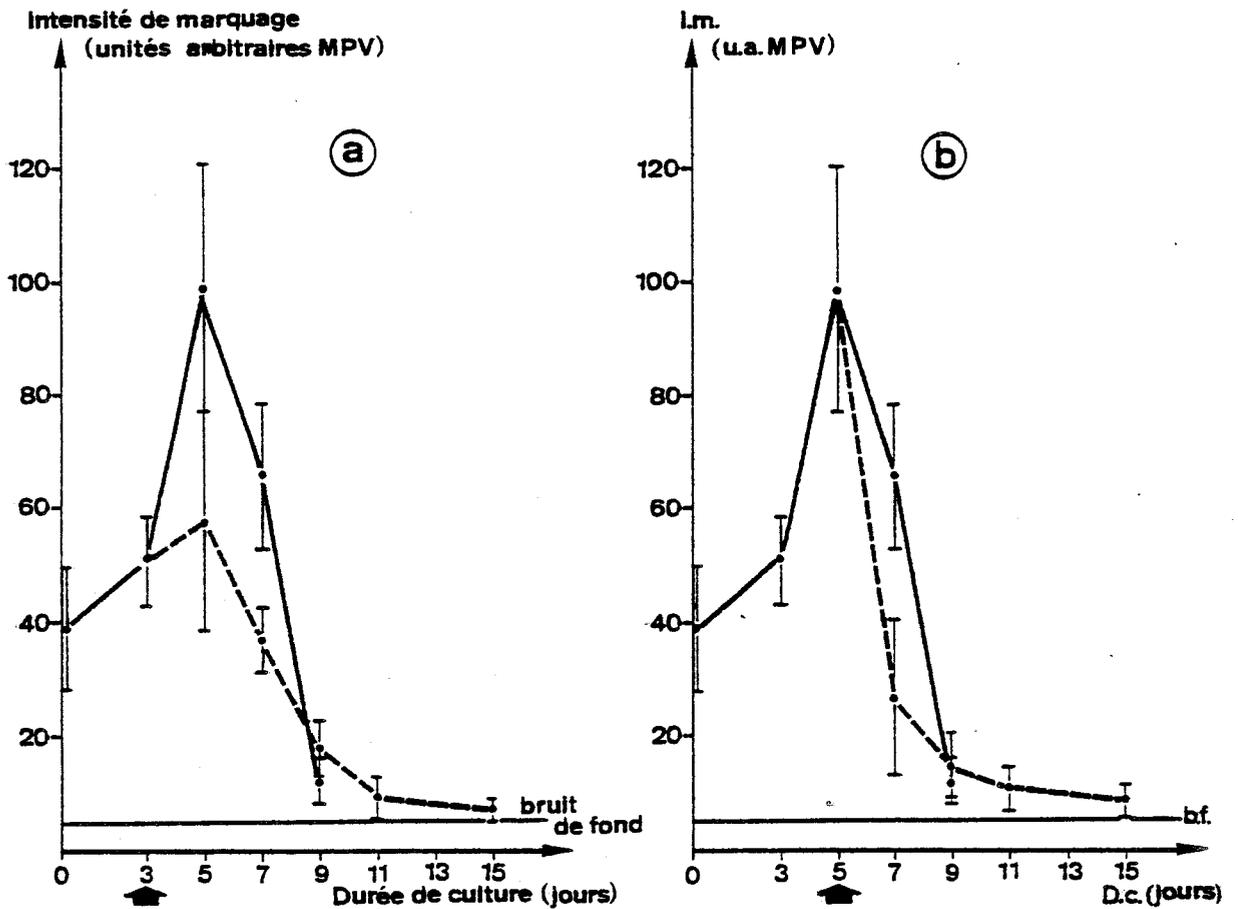


Figure 14 - Effet de la réintroduction de l'action hormonale sur l'intensité de marquage après incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H.  
 ——— intensité de marquage (I.m.) chez les témoins "parapodes isolés" soustraits à l'activité endocrine pendant toute la durée de la culture.  
 - - - intensité de marquage après réintroduction de l'action hormonale (flèche), au 3ème jour (a) ou au 5ème jour (b).  
 Chez les témoins, les mesures ont été interrompues après le 9ème jour par suite de la dissociation des cystes (voir légende de la figure 11). Par contre, la réintroduction de l'action hormonale retardant la dissociation des cystes (voir figure 15), les mesures on pu être poursuivies pour des durées de culture plus longues. Dans ce cas, on constate que l'intensité de marquage est faible mais significative par rapport au bruit de fond.

BUS  
LILLE

dans le cas de la réintroduction de l'action cérébrale aux 3ème et 5ème jours, on constate une augmentation de la durée de la prophase méiotique (Fig. 15). La dissociation des amas mûrifomes (fin de prophase) et les divisions de maturation survenant au 20ème jour de culture, la prophase a donc, dans ce cas, une durée de 9 jours alors qu'elle ne dépasse pas 2 à 3 jours chez les témoins "parapodes isolés".

### III - REINTRODUCTION DE L'ACTION HORMONALE PENDANT LA MEIOSE ET LA SPERMIOGENESE

La réintroduction de l'inhibition cérébrale après le 7ème jour de culture ne modifie pratiquement pas le cours ultérieur de la spermatogénèse (Fig. 15). Lorsque l'intervention expérimentale survient au 9ème jour, seules quelques cellules accusent un retard de 2 à 3 jours sur les témoins (Fig. 15). Il s'agit vraisemblablement de cellules encore en phase S lors de la réassociation parapode-prostomium, étant donné que les synthèses de DNA s'étendent du 5ème au 9ème jour (Fig. 9 et 13 a).

On peut dire que l'action hormonale n'a plus aucun effet lorsqu'elle est réintroduite pendant la prophase méiotique (9ème jour) et *a fortiori* pendant les divisions de maturation ou la spermiogénèse (11ème jour). L'évolution est identique à celle des cellules soustraites à l'inhibition cérébrale pendant toute la durée de la culture (témoin "parapode isolé"). Ces résultats sont conformes aux observations de DURCHON *et al.* (1965).

### IV - DISCUSSION

#### 1 - Réversibilité de la suppression expérimentale de l'action hormonale

DURCHON *et al.* (1965) avaient démontré précédemment que les effets de la levée expérimentale de l'inhibition cérébrale sont réversibles lorsque l'association parapode-prostomium intervient avant la phase S préméiotique. Nos résultats permettent de préciser qu'il est possible d'empêcher la différenciation méiotique et de maintenir les cellules germinales en phase de multiplication spermatogoniale à condition de réintroduire l'action hormonale avant l'augmentation des synthèses préméiotiques de RNA. Le moment à partir duquel la détermination méiotique ("commitment to meiosis") devient

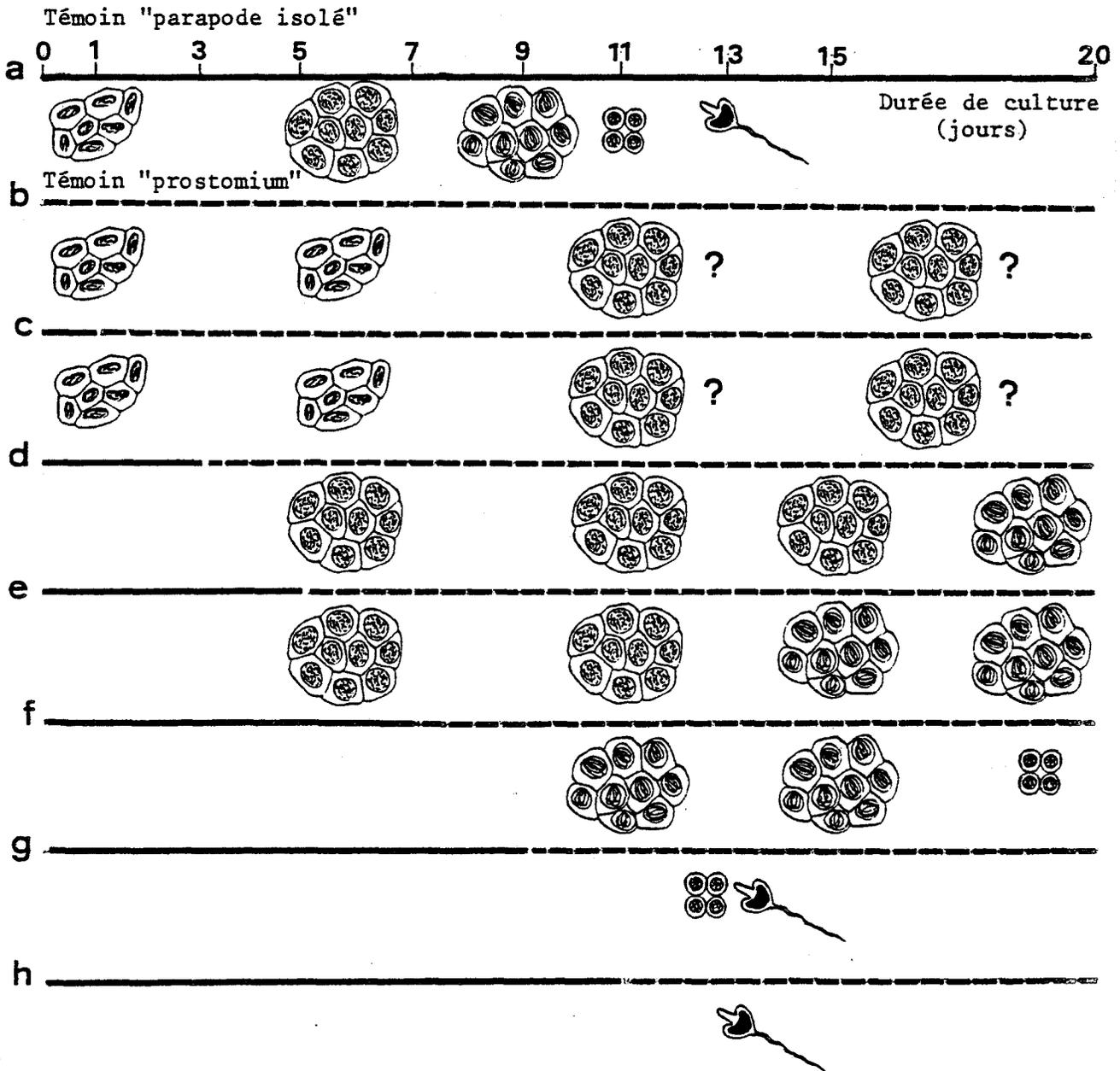
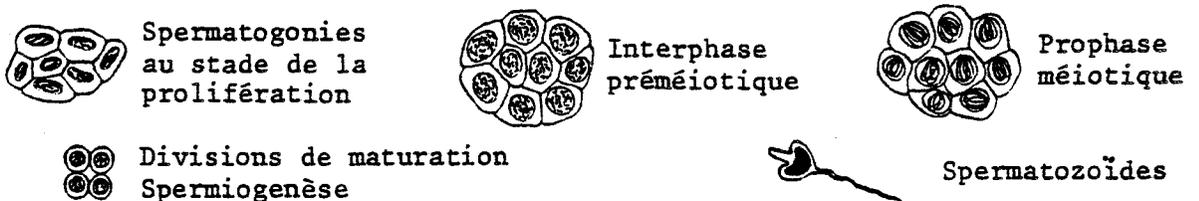


Figure 15 - Effet de la réintroduction de l'action hormonale sur la chronologie de la spermatogenèse. Voir légende de la Figure 12.  
Signification des figurés :



L'évolution ultrastructurale des cellules provenant de parapodes associés à un prostomium avant le 3ème jour de culture (c) est identique à celle des cellules maintenues en présence de l'activité endocrine cérébrale dès le début de la culture (b). La réintroduction de l'action hormonale pendant l'interphase pré-méiotique provoque une augmentation de la durée de cette dernière et de la prophase méiotique (d, e, f). La réintroduction pendant la prophase (g) n'a que peu d'effet (voir texte). Enfin, le déroulement de la spermatogenèse est identique à celui des témoins "parapodes isolés" (a) lorsque la réintroduction est faite pendant les divisions de maturation (h).

BUS  
LILLE

irréversible se situe donc au début de la phase  $G_1$  de l'interphase préméiotique. Cette période critique est beaucoup plus tardive dans des types cellulaires chez lesquels le passage du comportement mitotique au comportement méiotique est contrôlé par des facteurs externes (température, lumière, milieu de culture, etc...). Il est en effet encore possible de faire réintégrer le cycle mitotique jusqu'à la fin de la phase S préméiotique chez des organismes unicellulaires (SIMCHEN *et al.*, 1972 ; FUJISHIMA et HIWATASHI, 1978), pendant la phase  $G_2$  dans les microsporocytes du Lis (STERN et HOTTA, 1968 ; PARCHMAN et ROTH, 1971 ; NINNEMAN et EPEL, 1973) ou même pendant le stade préleptotène lorsqu'il existe (BENNETT et STERN, 1975 ; MAULEON, 1975 ; LUCIANI *et al.*, 1977).

Dès que l'augmentation de la synthèse des RNA est déclenchée, l'action hormonale est incapable de provoquer un retour à la phase de multiplication spermatogoniale. De plus, la réintroduction de l'activité cérébrale est également inapte à bloquer totalement le processus qui conduit à la méiose. Elle n'induit qu'un retard dans le déroulement des différentes étapes de la différenciation méiotique. Au niveau du métabolisme des RNA, on constate de même que la synthèse n'est pas totalement inhibée mais seulement ralentie. Elle se poursuit, bien qu'à un taux très faible, pendant une durée plus longue que chez les témoins (Fig. 14). Tout se passe comme si l'entrée en prophase méiotique ne pouvait avoir lieu qu'après l'accumulation d'une certaine quantité de RNA. La réversibilité de la levée de l'inhibition cérébrale apparaît donc étroitement liée à la possibilité d'empêcher cette accumulation. Réintroduite avant l'augmentation de la synthèse des RNA, l'hormone serait capable de l'inhiber et par conséquent de maintenir les spermatogonies en phase de prolifération. Lorsque la synthèse préméiotique des RNA est enclenchée, le facteur hormonal ne pourrait que ralentir l'accumulation des RNA et retarder, de ce fait, le processus de différenciation méiotique.

## 2 - Contrôle hormonal des différentes étapes de la différenciation méiotique

Dans les expériences de réintroduction de l'action hormonale après le 3ème jour de culture, l'analyse des causes du retard dans le déroulement de la méiose apporte des éléments importants concernant le mécanisme du contrôle hormonal de la différenciation

méiotique. Lorsque l'hormone est réintroduite avant la phase S, on constate que les divisions méiotiques sont différées d'un laps de temps qui englobe non seulement un retard de l'entrée en phase S, mais également une augmentation de la durée de la phase G<sub>2</sub> et de la prophase méiotique. Lorsque l'association d'un prostomium est effectuée pendant la phase S, cette intervention n'a aucune conséquence sur la réplication du DNA mais a encore un effet important sur la durée de la prophase méiotique. Ces résultats font apparaître que la régulation hormonale du déroulement de la prophase est relativement indépendante de son effet sur la réplication préméiotique du DNA. Il est possible que le retard induit dans l'entrée en phase S préméiotique soit la conséquence d'un ralentissement des synthèses de RNA, grâce à un mécanisme de régulation analogue à celui du cycle mitotique. Dans ce cas, il a été en effet démontré que l'entrée en phase S ne peut se faire qu'après une accumulation suffisante de RNA (revue dans PRESCOTT, 1976), et notamment de rRNA (HATFIELD *et al.*, 1973 ; EPIFANOVA *et al.*, 1975 ; DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1979). L'allongement de la phase G<sub>2</sub> préméiotique peut également s'expliquer par analogie avec les connaissances acquises sur le cycle mitotique. On sait en effet qu'une transcription de RNA est nécessaire pendant la phase G<sub>2</sub> (revue dans TOBEY *et al.*, 1971), ces RNA étant vraisemblablement indispensables à la synthèse des protéines du fuseau de division et à la condensation des chromosomes (PRESCOTT, 1976). Il est plausible qu'il en soit de même dans le cas de la méiose chez les *Nereidae*, et que le retard de l'entrée en prophase méiotique soit une conséquence de la diminution des synthèses de RNA provoquée par l'action hormonale.

En revanche, peu de données bibliographiques, à notre connaissance, permettent d'expliquer l'allongement de la durée de la prophase méiotique par un ralentissement de l'accumulation des RNA pendant l'interphase. Cette conséquence de la réintroduction de l'action hormonale apparaît pourtant comme une des plus spécifiques dans le processus de régulation de la différenciation méiotique chez les *Nereidae*. Il importe donc de vérifier si ce résultat de l'action endocrine cérébrale est bien en relation avec une diminution des synthèses préméiotiques de RNA. C'est dans ce but que les effets d'inhibiteurs de la synthèse des RNA ont été étudiés (chapitre VIII).

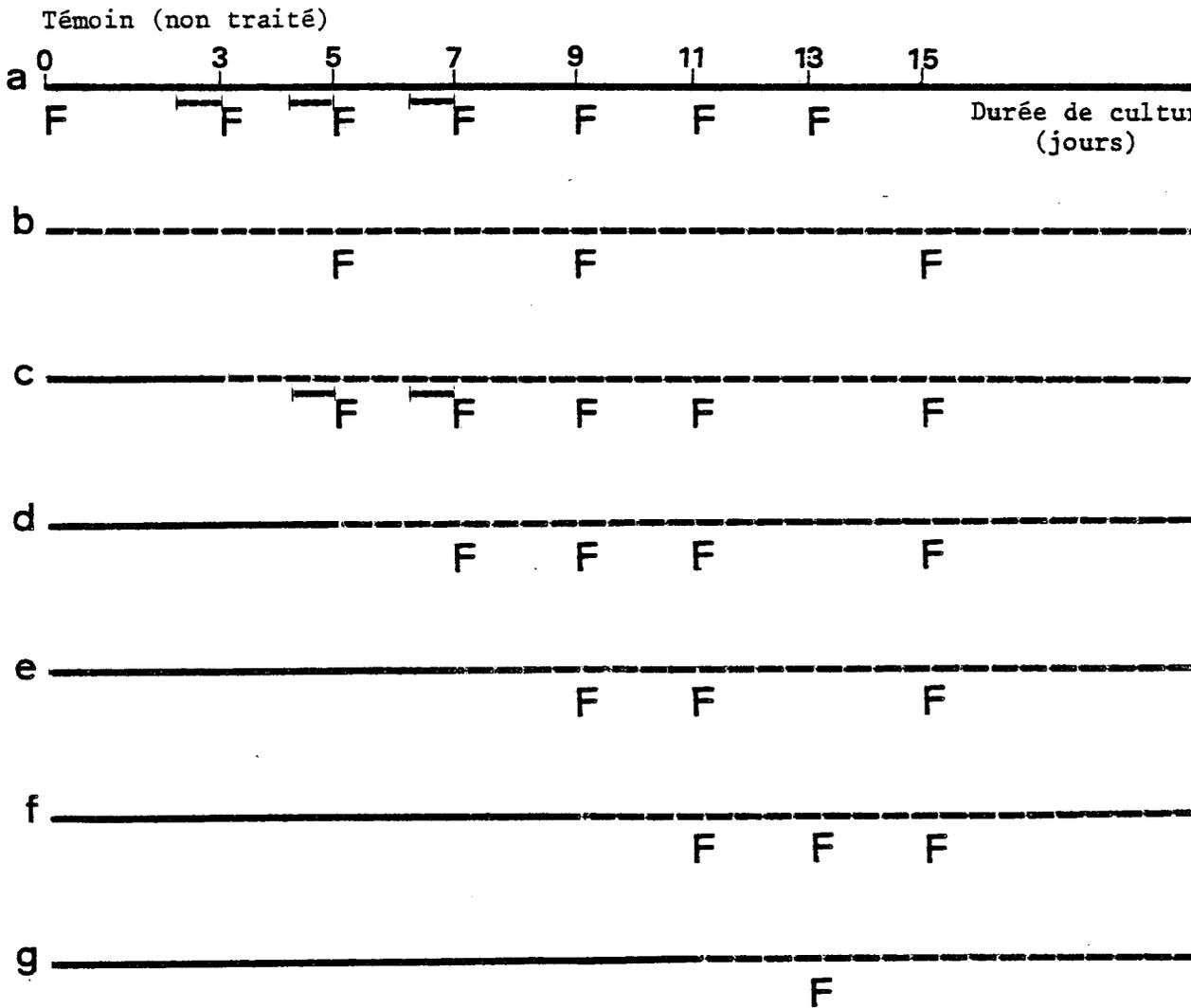


Figure 16 - Action des inhibiteurs de la synthèse des RNA. Diagramme du protocole expérimental.

Des parapodes sont isolés et mis en culture sur milieu normal jusqu'au terme de la spermatogenèse. Ces parapodes renferment des cellules qui ne sont traitées par les inhibiteurs à aucun moment de leur évolution et constituent les témoins de l'expérience (a). D'autres parapodes sont cultivés sur un milieu contenant un des trois inhibiteurs utilisés, soit dès la mise en culture (b), soit après des durées variables de culture sur milieu normal (c, d, e, f, g). Dans chaque série, des explants sont fixés (F) périodiquement. Dans le cas où l'inhibiteur est introduit au 3ème jour de culture, les fixations effectuées aux 5ème et 7ème jours sont précédées d'une incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H pendant 4 heures ( — ).

———— Culture sur milieu normal.  
- - - - - Culture en présence d'un des trois inhibiteurs.



## CHAPITRE VIII

### EFFETS D'INHIBITEURS DE LA SYNTHÈSE DES RNA

#### I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les inhibiteurs (Actinomycine D,  $\alpha$ -Amanitine, Cordycepine) ont été utilisés dans les conditions indiquées dans le chapitre "matériel et méthodes". Les parapodes isolés sont mis en présence de l'une des trois substances, soit dès la mise en culture (jour 0), soit après des temps variés d'évolution (jour 1, 5, 7, etc...), c'est-à-dire à différents stades de la spermatogenèse (Fig. 16). Les parapodes sont cultivés sur le milieu contenant l'inhibiteur jusqu'au moment de la fixation. Celle-ci est effectuée à intervalles réguliers pour examen de l'état des cellules germinales : étude ultrastructurale, étude autoradiographique des synthèses de RNA (Fig. 16). Dans ce dernier cas, la fixation est précédée d'une incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H dans les mêmes conditions que précédemment (voir chapitres VI et VII).

#### II - TAUX D'INHIBITION DES SYNTHÈSES DE RNA

Avant d'examiner l'effet de l'inhibition de la synthèse des RNA sur l'évolution des cellules germinales mâles, il est impératif d'évaluer l'importance de la diminution de ces synthèses après action de chacune des substances inhibitrices. Dans ce but, des parapodes isolés sont cultivés sur le milieu contenant l'un des inhibiteurs, à partir du 3ème jour, c'est-à-dire dès le début de l'augmentation de la synthèse des RNA. L'importance de l'incorporation

de l'uridine-<sup>3</sup>H est ensuite évaluée au 5ème et au 7ème jour de culture, autrement dit après 2 et 4 jours de traitement par l'inhibiteur.

La figure 17 montre que l'intensité de marquage des amas mûrifformes soumis à l'action des inhibiteurs est nettement inférieure à celle des cellules non traitées. La diminution est sensiblement du même ordre de grandeur pour les trois substances utilisées. L'importance exacte de cette diminution est difficile à évaluer. Deux processus sont en effet à considérer :

- 1) l'intensité de la synthèse des RNA évolue en fonction des stades de la spermatogenèse (voir chapitre VI) ;
- 2) la vitesse d'évolution est différente chez les cellules traitées et non traitées puisque les inhibiteurs ralentissent le déroulement de la spermatogenèse (voir paragraphe IV de ce chapitre). Le choix des valeurs à comparer est donc délicat (Fig. 17). Quoiqu'il en soit, il ressort de cette étude que les trois substances provoquent une inhibition très conséquente de la synthèse des RNA dans les cellules germinales mâles des *Nereidae*.

### III - EFFETS DES INHIBITEURS SUR LA MORPHOLOGIE ULTRASTRUCTURALE DU NOYAU

Comparée à celle des témoins, la morphologie nucléaire des cellules traitées subit des modifications de deux ordres. Les unes résultent du retard provoqué dans le déroulement de la spermatogenèse et seront examinées dans le paragraphe suivant. Les autres sont directement liées à l'inhibition de la synthèse des RNA et sont plus ou moins caractéristiques de l'inhibiteur employé. Les observations ont été réalisées sur des cellules en interphase préméiotique traitées dès le début de l'augmentation de la synthèse des RNA (3ème jour de culture) et prélevées tous les deux jours (Fig. 16).

#### 1 - Actinomycine D

L'étude ultrastructurale de cellules exposées pendant deux jours à l'actinomycine D permet d'observer les effets spécifiques de cette substance sur la morphologie des constituants du noyau. Aucune modification n'est décelable au niveau de la chromatine et des espaces interchromatiniens. Par contre, le nucléole subit le processus bien connu de la ségrégation nucléolaire (SCHOEFL, 1964). L'altération de la morphologie du nucléole débute par une régression du *nucleonema*, les parties granulaires de ce dernier ayant tendance à

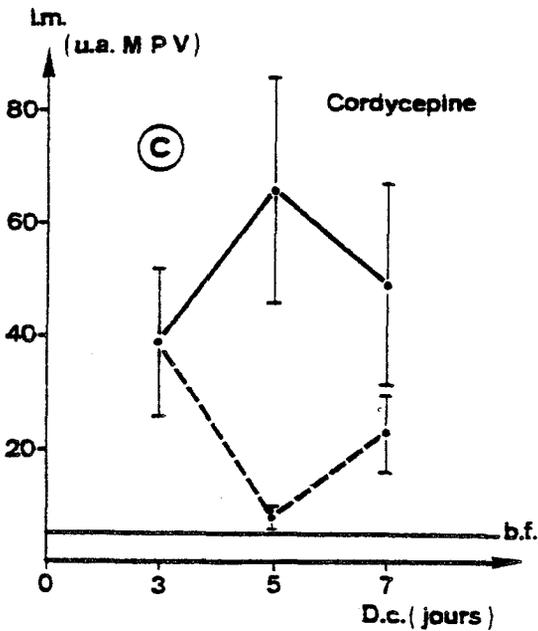
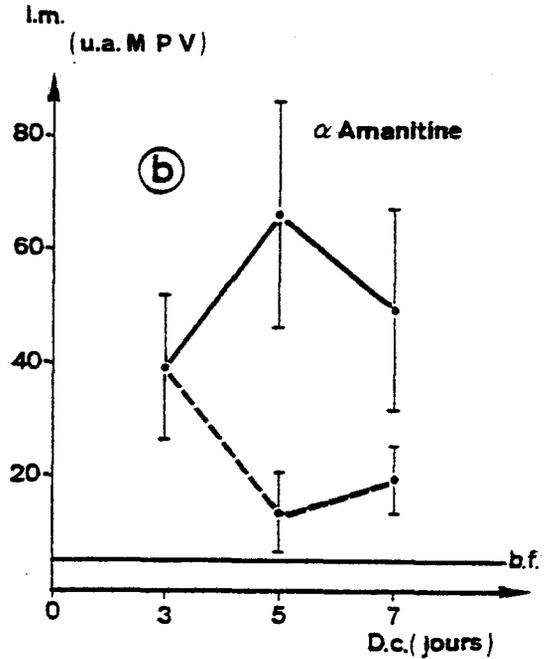
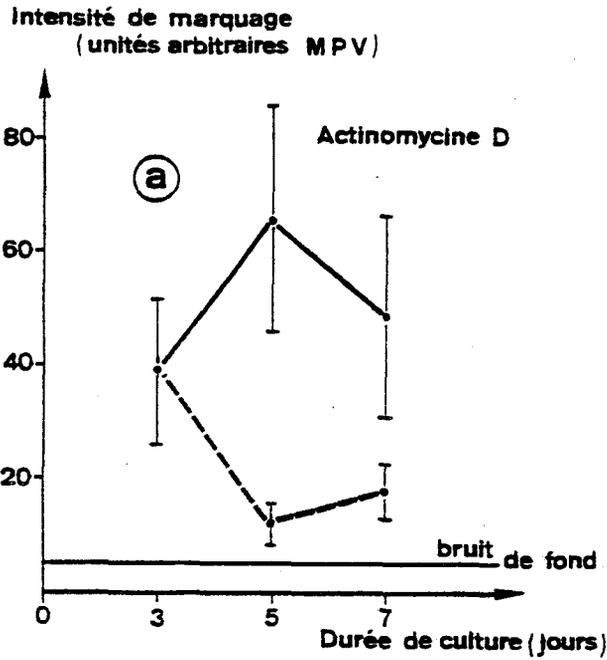


Figure 17 - Effet des inhibiteurs de la synthèse des RNA sur l'intensité de marquage après incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H.

Les inhibiteurs ont été introduits dans le milieu de culture au 3<sup>ème</sup> jour. — intensité de marquage des cellules non traitées. - - intensité de marquage des cellules traitées par l'un des trois inhibiteurs : actinomycine D (a),  $\alpha$ -amanitine (b), cordycepine (c).

La diminution de l'intensité de marquage est très importante mais il est difficile d'en évaluer l'importance avec exactitude (voir texte). Ainsi, après 2 jours de traitement, la diminution est d'environ 80 % par rapport aux cellules non traitées cultivées pendant la même durée (5 jours). Par contre, elle n'est que de 60 % si la comparaison est effectuée par rapport aux cellules non traitées, cultivées pendant seulement 3 jours, dont le stade est vraisemblablement plus proche des cellules traitées, étant donné le retard provoqué par l'inhibiteur (voir figures 18, 19 et 20). De même, la légère augmentation de l'intensité de marquage, constatée après 4 jours de traitement (jour 7), peut s'expliquer non par un affaiblissement de l'inhibition mais par le fait que le stade témoin correspondant soit non le jour 7 mais le jour 5, stade pendant lequel la synthèse des RNA est très élevée.



se désagréger dans le nucléoplasme (Pl. XL, fig. a). Le nucléole devient essentiellement de nature fibrillaire et la ségrégation s'effectue entre un "corps central" relativement peu opaque aux électrons et des "coiffes" denses (Pl. XL, fig. b - d). Cette évolution est donc comparable à celle qui a été décrite dans de nombreux types cellulaires (revue dans SIMARD, 1970 ; BUSCH et SMETANA, 1970).

## 2 - $\alpha$ -Amanitine

L' $\alpha$ -amanitine ne provoque pas de modifications très spectaculaires au niveau de l'organisation ultrastructurale du noyau. Nous n'avons observé aucun des effets signalés par de nombreux auteurs, notamment la dispersion et la ségrégation du nucléole (MARINOZZI et FIUME, 1971 ; PETROV et SEKERIS, 1971 ; KEDINGER et SIMARD, 1974 ; DERENZINI et MOYNE, 1978).

Seuls apparaissent, à côté d'une majorité de cystes qui semblent intacts (Pl. XLIII, fig. a), une faible proportion de cellules dont les noyaux sont en pycnose. Ce processus commence (2<sup>ème</sup> jour de traitement) par une condensation de la chromatine (Pl. XL, fig. e) suivie de la migration de cette dernière à un pôle du noyau (Pl. XL, fig. f). Le nucléole est réduit à une sphère de nature fibrillaire (Pl. XL, fig. g). Après 4 jours d'exposition à l' $\alpha$ -amanitine, la chromatine atteint un état de condensation maximale par suite de la réduction presque totale des espaces interchromatiniens (Pl. XL, fig. h).

Cette dénaturation du noyau est accompagnée de la dissociation des amas mûrifomes et de la régression des divers organites cytoplasmiques. Seuls subsistent les ribosomes (Pl. XL, fig. h). Ce processus aboutit à une phagocytose par les éléocytes présents dans le liquide coelomique.

## 3 - Cordycepine

Des trois inhibiteurs utilisés, la cordycepine est celui qui provoque les altérations nucléaires les plus profondes, dans la totalité des cellules traitées.

Dès le 2<sup>ème</sup> jour d'exposition à cette substance, la plupart des amas mûrifomes renferment des noyaux dont le nucléoplasme est anormalement transparent aux électrons (Pl. XLI, fig. a). Cette morphologie nucléaire semble due à la régression du matériel interchromatinien, selon le processus signalé par PUVION *et al.* (1976),

mais pour des temps d'exposition à l'inhibiteur beaucoup plus courts. Ce phénomène s'amplifie au fur et à mesure de la poursuite du traitement (Pl. XLI, fig. b et c). Au 6ème jour, les noyaux de toutes les cellules sont constitués de mottes de chromatine dispersées dans un nucléoplasme qui apparaît optiquement vide (Pl. XLI, fig. c).

Il se produit également une évolution nucléolaire tout à fait caractéristique. Au 2ème jour de traitement, presque tous les nucléoles observés présentent une forme annulaire (Pl. XLI, fig. a). L'anneau nucléolaire est formé de plages fibrillaires denses et d'un matériel de nature fibrillo-granulaire, moins opaque aux électrons (Pl. XLI, fig. d). La zone centrale délimitée par l'anneau est peu différente du nucléoplasme, contrairement au cas des nucléoles vacuolisés des ovocytes (voir chapitre III). Certaines cellules possèdent des nucléoles ségrévés (Pl. XLI, fig. e et f) pratiquement identiques à ceux qui résultent de l'action de l'actinomycine D. Le nombre de ségrégations nucléolaires augmentant sensiblement avec la durée du traitement par la cordycepine, il est vraisemblable que cette modification de la morphologie nucléolaire constitue un stade postérieur à celui du nucléole annulaire. Cette évolution est comparable à celle qui a été observée dans les cellules végétales (STOCKERT, *et al.*, 1970 ; GIMENEZ-MARTIN *et al.*, 1973).

Parallèlement à ces transformations de la structure du noyau, le cytoplasme subit de profondes altérations. Il perd progressivement la plus grande partie de ses organites (Pl. XLI, fig. b et c) et semble se vider, notamment, de tous ses ribosomes (Pl. XLI, fig. c).

#### IV - EFFETS DES INHIBITEURS SUR LA CHRONOLOGIE DE LA SPERMATOGENESE

Le déroulement de la spermatogenèse est perturbé par l'action des inhibiteurs de la synthèse des RNA, de manière plus ou moins importante selon la substance utilisée et selon le stade à partir duquel intervient l'inhibition. Les résultats obtenus ont été regroupés dans les figures 18, 19 et 20. On voit que les trois substances employées ne provoquent de modifications que lorsqu'elles interviennent avant le 11ème jour, c'est-à-dire avant les divisions de maturation.

##### 1 - Actinomycine D

L'actinomycine D détermine de profondes perturbations dans le déroulement de la spermatogenèse. Toutefois, elle ne bloque pas définitivement ce processus, même lorsqu'elle est utilisée dès la mise en culture des parapodes (jour 0). Dans ces conditions, elle cause un allongement considérable de la durée de l'interphase préméiotique mais n'empêche pas les sper-

matogonies d'évoluer et d'entrer en prophase méiotique (Fig. 18 et Pl. XLII, fig. a et b).

L'addition d'actinomycine D pendant l'interphase préméiotique (jours 3, 5 et 7) détermine un retard de l'apparition des spermatozoïdes, retard d'autant plus important que l'introduction de l'inhibiteur dans le milieu de culture est précoce (Fig. 18). Dans tous les cas, il apparaît que ce délai est essentiellement dû à un étalement de la prophase méiotique (Fig. 18 et Pl. XLII, fig. c et d).

Dès l'entrée des cellules en prophase (jour 9), l'actinomycine D n'a plus aucun effet sur le déroulement chronologique de la spermatogenèse. La production des spermatozoïdes ne subit aucun retard par rapport aux témoins (Fig. 18).

## 2 - $\alpha$ -Amanitine

Lorsqu'elle est employée pendant l'interphase préméiotique, l' $\alpha$ -amanitine cause un allongement très net de la durée de la prophase méiotique (Fig. 19 et Pl. XLIII, fig. a et b). Néanmoins, les retards dus à cet inhibiteur sont plus faibles que ceux provoqués par l'actinomycine D.

En revanche, l'introduction d' $\alpha$ -amanitine pendant la prophase méiotique (jour 9) produit encore, et contrairement à l'actinomycine D, un léger retard (2 jours) de l'apparition des spermatozoïdes (Fig. 19, et Pl. XLIII, fig. c).

## 3 - Cordycepine

Les effets de la cordycepine sont difficilement interprétables par suite des altérations cellulaires considérables qu'elle provoque. Il est en effet parfois difficile de différencier les cellules en interphase préméiotique et les spermatocytes en prophase. Néanmoins, la persistance de cellules groupées en cystes après des durées de culture supérieure à 11 jours (Fig. 20) montre que cette substance est responsable de retards importants dans le déroulement de la spermatogenèse.

Par ailleurs, les graves perturbations de la structure nucléaire n'empêche pas une certaine évolution des cellules germinales puisque des figures de prophase ont été observées (Pl. XLIII, fig. d). Toutefois, contrairement aux cas des deux autres inhibiteurs,

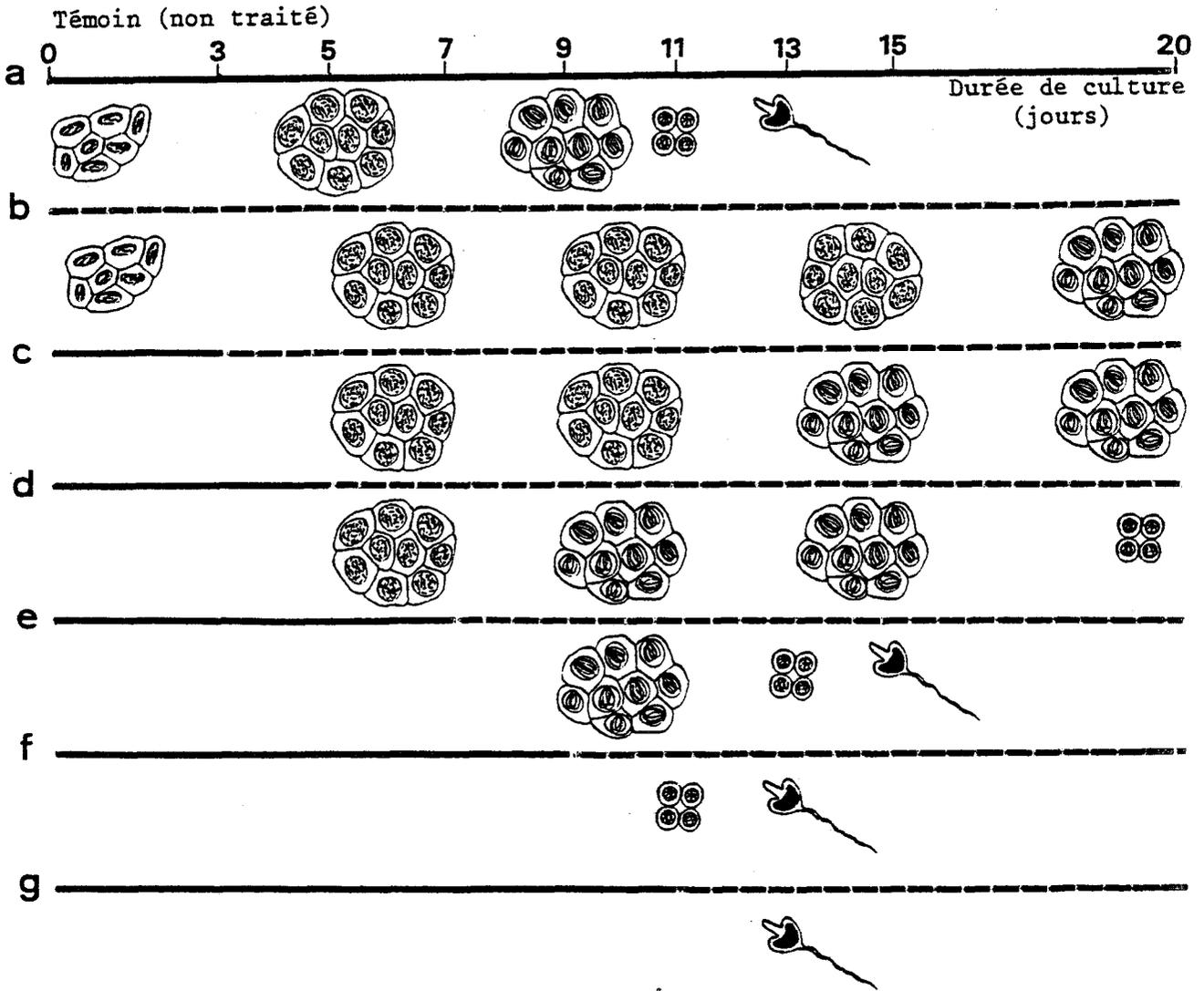


Figure 18 - Effet de l'actinomycine D sur le déroulement chronologique de la spermatogenèse.

———— Culture sur milieu normal.  
———— Culture en présence d'actinomycine D.

Pour la signification des figurés, voir la légende de la figure 15. Ajoutée au milieu dès la mise en culture (b) ou pendant l'interphase préméiotique (c, d, e), l'actinomycine D provoque une augmentation de la durée de l'interphase préméiotique et de la prophase méiotique. L'addition au milieu de culture après l'entrée en prophase (f, g) ne modifie pas la chronologie de la spermatogenèse par rapport à celle des témoins (a).



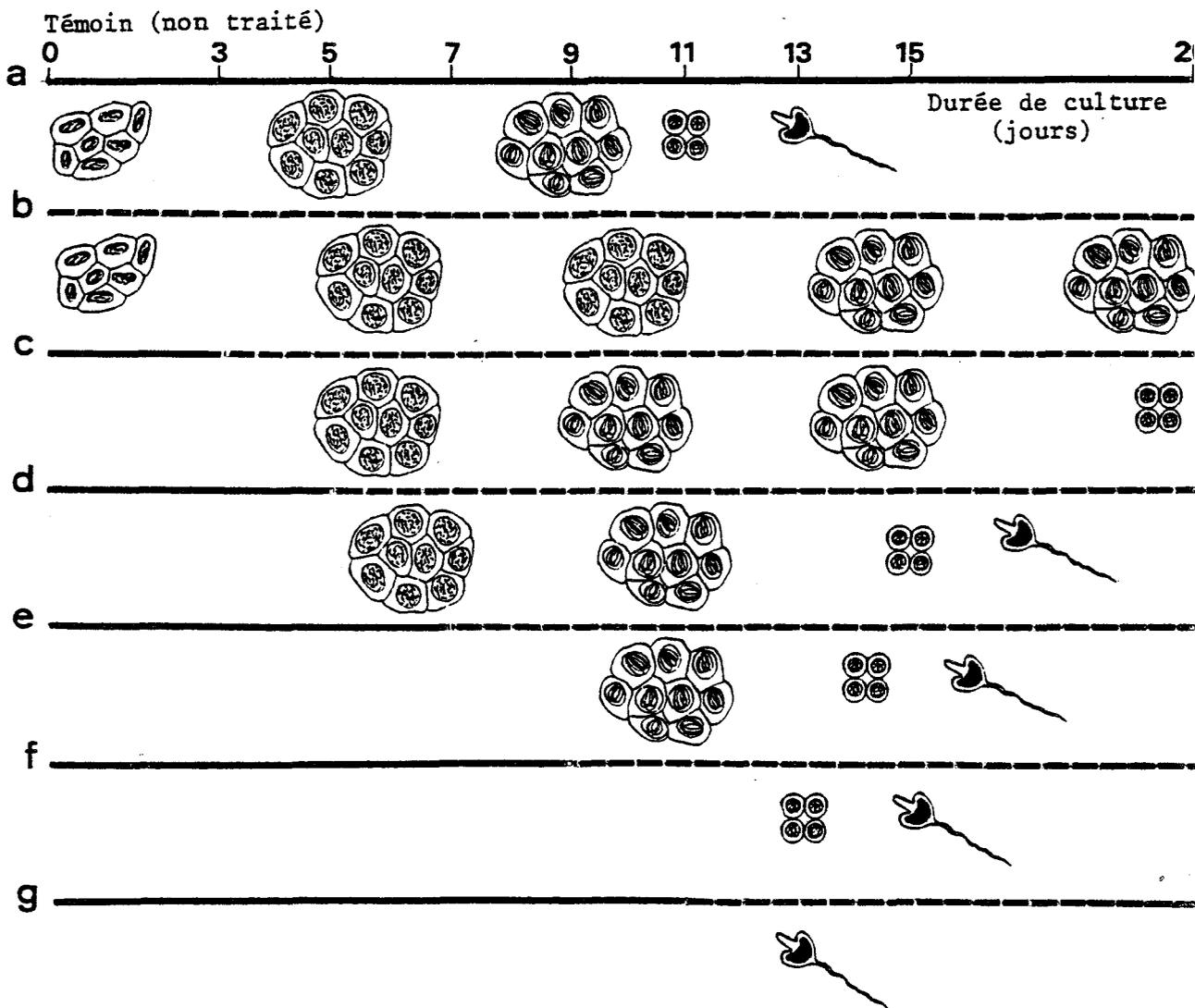


Figure 19 - Effet de l' $\alpha$ -amanitine sur le déroulement chronologique de la spermatogénèse.

———— Culture sur milieu normal.

----- Culture en présence d' $\alpha$ -amanitine.

Pour la signification des figurés, voir la légende de la figure 15.

Ajoutée dès la mise en culture (b) ou pendant l'interphase préméiotique (c; d, e), l' $\alpha$ -amanitine provoque un retard dû essentiellement à l'augmentation de la durée de la prophase méiotique. Ce retard est en général moins important que pour les 2 autres inhibiteurs (voir figures 18 et 20). Ajoutée au milieu de culture pendant la prophase (f), elle détermine un léger retard de la spermatogénèse, contrairement à l'actinomycine D (voir figure 18). Lorsque les divisions de maturation sont en cours (g), l'addition d' $\alpha$ -amanitine ne provoque pas de retard par rapport au témoin (a).



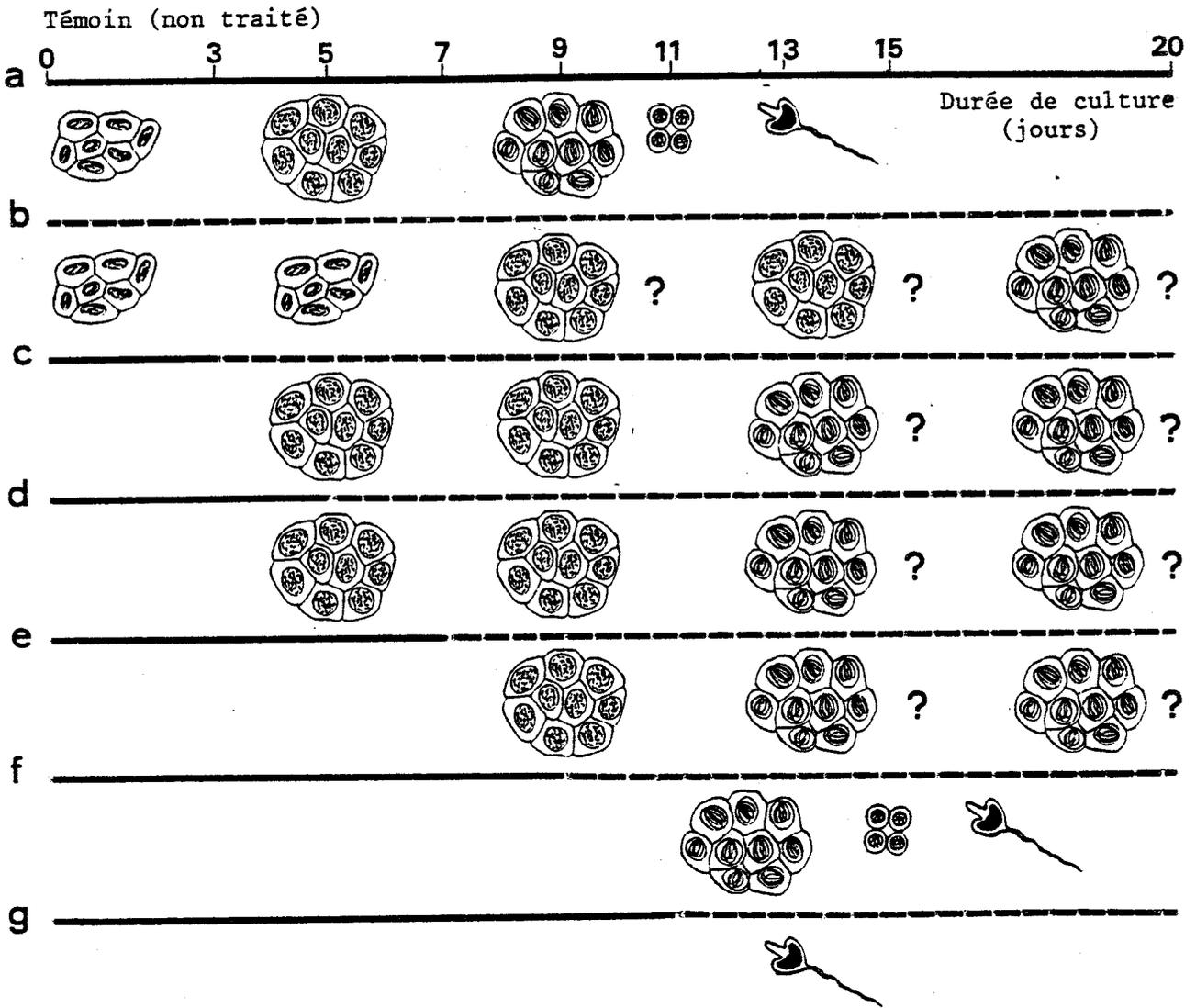


Figure 20 - Effet de la cordycepine sur le déroulement chronologique de la spermatogénèse.

———— Culture sur milieu normal.

- - - - - Culture en présence de cordycepine.

Pour la signification des figurés, voir la légende de la figure 15. Après l'addition de cordycépine dès la mise en culture (b) ou pendant l'interphase préméiotique (c, d, e), des cellules groupées en amas sont encore observées au 20ème jour de culture. Etant donnée l'altération considérable de l'ultrastructure cellulaire, il est difficile de déterminer quel stade précis (interphase préméiotique ou prophase méiotique) ont atteint ces cellules. Ajouté pendant la prophase méiotique (f), l'inhibiteur provoque un léger retard de la spermatogénèse. Il n'a plus d'effet à partir des divisions de maturation (g).

seuls des axes chromosomiques caractéristiques du stade leptotène sont présents (Pl. XLIII, fig. d), à l'exclusion de complexes synaptonématiques. Il semble par conséquent que l'appariement des chromosomes ne s'effectue pas après action de la cordycepine. Les complexes synaptonématiques ne sont observés que lorsque l'inhibiteur intervient plus tardivement (9ème jour de culture), après de début de la prophase méiotique.

## V - DISCUSSION

### 1 - Effets des inhibiteurs de la synthèse des RNA

L'étude de l'action des inhibiteurs de la synthèse des RNA au cours de la spermatogenèse n'a fait l'objet que de travaux ponctuels (MEYER, 1969 ; BARCELLONA et BRINKLEY, 1973 ; GOULD-SOMERO et HOLLAND, 1974) qui contrastent avec la quantité impressionnante de données relatives aux cellules somatiques. Chez les *Nereidae*, l'effet de ces substances à différents stades de la spermatogenèse corrobore les conclusions tirées de l'étude autoradiographique de la synthèse des RNA (voir chapitre VI). Comme chez la *Drosophila* (GOULD-SOMERO et HOLLAND, 1974), l'utilisation des inhibiteurs après la prophase méiotique n'a aucune conséquence sur le déroulement de la spermatogenèse, ce qui confirme que la plupart des RNA nécessaires à la spermiogenèse sont synthétisés avant la méiose.

Les résultats de l'autoradiographie à haute résolution (voir chapitre VI) suggèrent que les différentes classes de RNA ne sont pas synthétisées de manière équivalente à tous les stades de la spermatogenèse. En particulier, la synthèse des rRNA d'origine nucléaire paraît restreinte à l'interphase préméiotique tandis que les RNA extranucléolaires sont élaborés à la fois pendant l'interphase et au début de la prophase méiotique. Les trois inhibiteurs utilisés ayant des effets spécifiques sur les différentes catégories de RNA, nous pouvions nous attendre à obtenir des résultats variables selon la substance employée.

Il est connu que l'actinomycine D à faible dose inhibe préférentiellement la synthèse des rRNA (PERRY, 1963). Il semble que ce soit le cas dans les conditions où nous avons utilisé cette substance chez les *Nereidae*. elle produit une forte inhibition de la synthèse des RNA pendant l'interphase préméiotique (Fig. 17 a), stade pendant lequel les synthèses nucléolaires sont prépondérantes. De plus, l'actinomycine ne provoque de retard dans la chronologie de la spermatoge-

nèse que lorsqu'elle est employée à ce stade (Fig. 18). Elle n'a plus aucun effet pendant la prophase méiotique (Fig. 18), lorsque cesse la synthèse des RNA d'origine nucléolaire.

L' $\alpha$ -amanitine est considérée comme un inhibiteur spécifique de la RNA polymérase II, donc de la synthèse des RNA de type messager (LINDELL *et al.*, 1970). Or, pendant l'interphase préméiotique, l' $\alpha$ -amanitine semble inhiber la synthèse de toutes les catégories de RNA (Fig. 17 b). Cet effet non spécifique a été signalé dans de nombreux cas (TATA *et al.*, 1972 ; SEKERIS et SCHMID, 1972 ; LEVEY et BRINSTER, 1978 ; VOETS *et al.*, 1979). Il est probablement lié aux doses élevées (100  $\mu$ g/ml) que nous avons été contraint d'utiliser pour obtenir des résultats reproductibles et serait dû à l'inhibition de la synthèse des mRNA nécessaires à la transcription et à la maturation du rRNA (JACOB *et al.*, 1970 ; SCHMID et SEKERIS, 1973 ; VOETS *et al.*, 1979). En revanche, on constate que, lorsque l' $\alpha$ -amanitine est introduite pendant la prophase méiotique, elle provoque, contrairement à l'actinomycine, un retard dans le déroulement de la spermatogenèse (Fig. 19). Cet effet est vraisemblablement en rapport avec son action spécifique sur la synthèse des RNA extranucléolaires, qui sont les seuls à être élaborés à ce stade.

La cordycepine agit au niveau de l'adenylation des hnRNA (DARNELL *et al.*, 1971) mais peut avoir, en fonction de la dose utilisée, une action inhibitrice sur la production de tous les types de RNA (SIEV *et al.*, 1969 ; PENMAN *et al.*, 1970). Les cellules germinales de *N. diversicolor* ont dû être soumises, comme pour l' $\alpha$ -Amanitine, à des concentrations en cordycepine relativement élevées qui semblent entraîner une diminution de la synthèse des différentes classes de RNA (Fig. 17c).

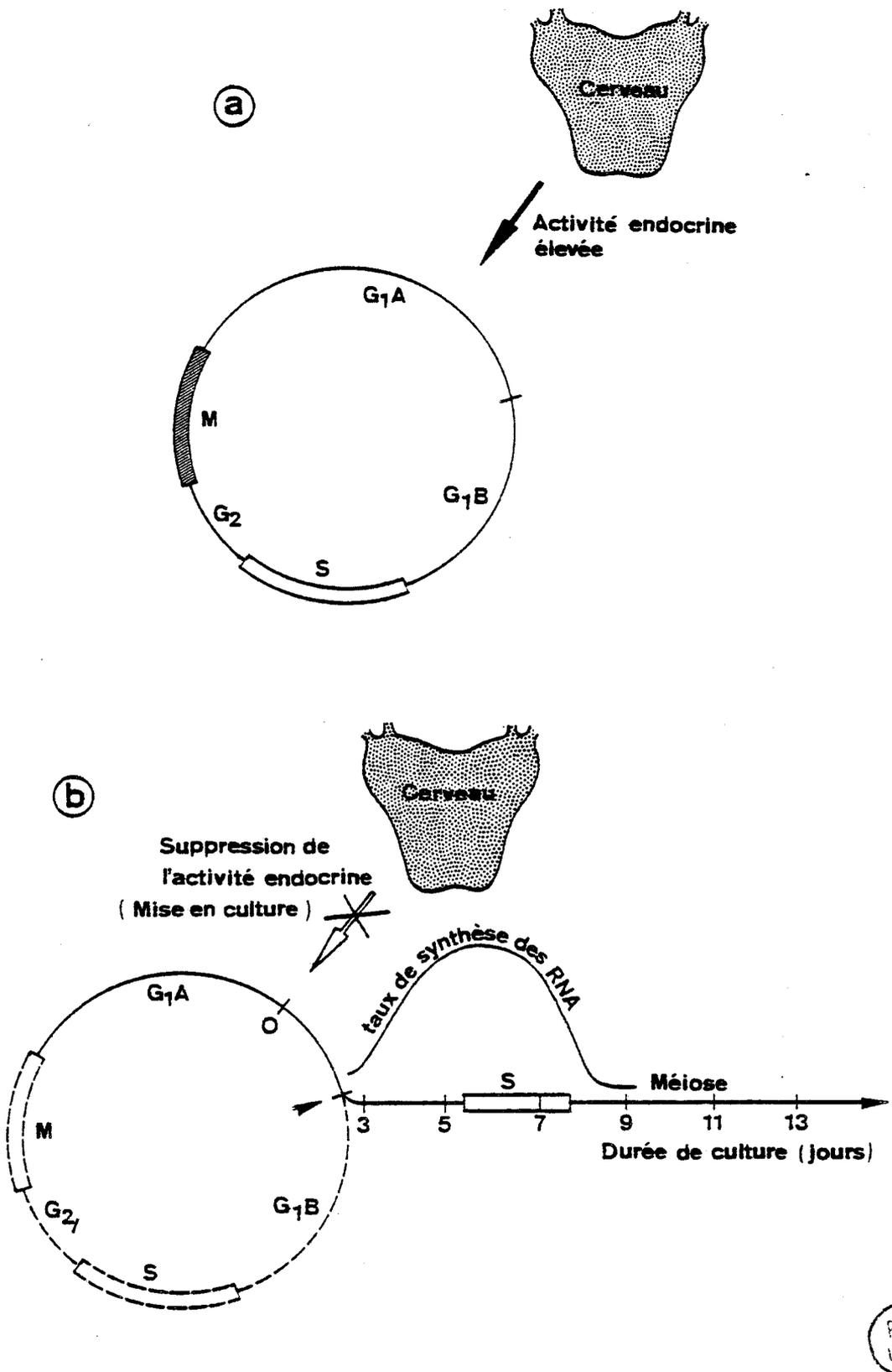
## 2 - Convergence entre les effets de l'inhibition des synthèses de RNA et ceux de l'action endocrine cérébrale

L'addition d'inhibiteurs de la synthèse des RNA à des cultures de parapodes privés d'hormone cérébrale permet, dans certaines conditions, de mimer les effets de l'association d'un prostomium. La convergence des résultats obtenus dans les deux cas est particulièrement manifeste lorsqu'on intervient pendant les synthèses préméiotiques de RNA. A ce stade, l'emploi des inhibiteurs a des effets tout à fait identiques à ceux de la réintroduction de l'hormone sur le délai d'entrée en méiose et sur la durée de la prophase méiotique. Cette similitude est d'autant plus significative que les mesures de l'incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H font apparaître que, dans les conditions où ils ont été utilisés, les inhibiteurs ne provoquent pas un arrêt total de la synthèse des RNA mais une diminution comparable à celle qui est

produit par la réintroduction de l'activité hormonale. L'ensemble de ces résultats apporte donc des arguments en faveur de l'hypothèse émise précédemment, selon laquelle 1) la différenciation méiotique nécessite l'accumulation d'une certaine quantité de RNA pendant l'interphase préméiotique 2) l'hormone cérébrale contrôle les différentes étapes de la différenciations méiotique, et notamment le déroulement de la prophase méiotique, par l'intermédiaire d'une régulation des synthèses préméiotiques de RNA.

En revanche, les inhibiteurs sont incapables de reproduire les effets de l'association d'un prostomium avant le 3ème jour de culture, c'est-à-dire avant l'augmentation de la synthèse des RNA. En effet, même lorsqu'ils agissent dès la mise en culture, ils provoquent un retard de la méiose mais n'empêchent jamais définitivement la différenciation méiotique. Le contrôle hormonal de la différenciation méiotique ne peut donc se réduire à une simple régulation quantitative des synthèses préméiotiques de RNA. Il semble au contraire que l'hormone ait une action très spécifique en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans le passage du stade de la multiplication spermatogoniale au stade de la différenciation méiotique. Par analogie avec le contrôle génétique de la méiose chez des organismes unicellulaires tels que les levures (HIRSCHBERG et SIMCHEN, 1977 ; SHILO *et al.*, 1978), on peut en effet suggérer que le choix entre le comportement mitotique et le comportement méiotique s'effectue parallèlement à la mise en route du programme génétique qui conduit à la division (SHILO *et al.*, 1978). Dans le cas de la spermatogenèse des *Nereidae*, les gènes intervenant dans ce choix seraient sous le contrôle de l'hormone cérébrale.

En outre, il est intéressant de rapprocher nos observations des connaissances actuelles concernant l'existence, au cours du cycle cellulaire, de périodes critiques pendant lesquelles s'effectue la régulation de la prolifération. Certains auteurs divisent la phase  $G_1$  en 2 secteurs :  $G_1A$  et  $G_1B$  (SMITH et MARTIN, 1973), ou la séparent par un "point de restriction" ("R point" de PARDEE, 1974) ou "de départ" ("Start" de HARTWELL, 1974). C'est pendant ces phases critiques :  $G_1A$ , "R point", "Start", que les cellules sont sensibles aux facteurs, tels que les hormones (JIMENEZ DE ASUA, 1977), qui contrôle la prolifération. Ces périodes sont également essentielles dans le processus de différenciation méiotique. Ainsi, chez les levures, le déclenchement



BIIS  
LILLE

Figure 21 - Représentation schématique de l'hypothèse concernant le contrôle hormonal de la spermatogenèse chez les *Nereidae*.

- a - Présence d'une activité endocrine cérébrale élevée. Les spermatogonies sont maintenues en phase de prolifération. Elles traversent les cycles mitotiques successifs tant que le taux hormonal est suffisamment important
- b - Suppression de l'activité endocrine, soit naturellement chez les animaux âgés, soit expérimentalement. Les cellules en phase G<sub>1</sub> A "quittent" le cycle mitotique, se différencient et entrent en méiose. Lorsque la suppression de l'activité endocrine est provoquée par la mise en culture de parapodes isolés, la chronologie de la différenciation méiotique est la suivante : augmentation de la synthèse des RNA à partir du 3<sup>ème</sup> jour de culture, phase S prémeiotique (6<sup>ème</sup>-7<sup>ème</sup> jour) méiose à partir du 8<sup>ème</sup> jour (début de la prophase). Les cellules peuvent, sous l'effet de la réintroduction de l'activité cérébrale, "réintégrer" le cycle mitotique à condition de n'avoir pas atteint un point critique qui se situe au début de l'augmentation de la synthèse des RNA prémeiotique (3<sup>ème</sup> jour de culture). Ce point critique est vraisemblablement peu différent de la limite entre les secteurs G<sub>1</sub> A et G<sub>1</sub> B (index).

de la méiose est étroitement lié au "start" (HIRSCHBERG et SIMCHEN, 1977 ; SHILO *et al.*, 1978). Chez *Tetrahyena*, c'est pendant la phase  $G_1A$  que les cellules sont déterminées soit à se diviser par mitose, soit à entrer en conjugaison et à subir la méiose (WOLFE, 1976). Or nous avons montré l'existence, au cours de la spermatogénèse des *Nereidae*, d'un point critique avant lequel la suppression de l'action hormonale est réversible (voir chapitre VII). Il est donc possible que le cycle spermatogonial présente, en  $G_1$ , une période pendant laquelle s'effectuerait, sous le contrôle de l'hormone cérébrale, le choix entre mitose spermatogoniale et différenciation méiotique.

En conclusion, l'ensemble des données bibliographiques et de nos propres résultats permet de proposer un mécanisme du contrôle hormonal de la spermatogénèse chez les *Nereidae* (Fig. 21). L'hormone cérébrale contrôlerait ce processus à un stade précis : le passage de la phase de prolifération spermatogoniale à la phase de différenciation méiotique. Le cycle spermatogonial présenterait en  $G_1$  une période critique (secteur  $G_1A$  par exemple). Si l'action hormonale s'exerce pendant cette période (Fig. 21 a), le cycle mitotique se poursuit et les spermatogonies subissent une mitose supplémentaire. Si l'activité endocrine est absente (Fig. 21 b), des gènes spécifiques que l'on pourrait qualifier "d'initiateurs de la méiose" se trouveraient dérégulés et stimuleraient la mise en route d'un programme de différenciation comprenant successivement une augmentation de la synthèse des RNA, la réplication du DNA et le déroulement de la méiose.

DISCUSSION GENERALE  
ET  
CONCLUSIONS

## I - EVOLUTION DU NOYAU AU COURS DE LA GAMETOGENESE

Les résultats fournis par les observations morphologiques, la cytochimie et l'étude de la synthèse des acides nucléiques nous apportent un certain nombre de précisions concernant la différenciation des constituants nucléaires au cours de la gamétogenèse des *Nereidae*.

### 1 - Ovogenèse

Pendant la phase de croissance, les ovocytes des *Nereidae* renferment deux types de formations nucléaires : les "granulations nucléoplasmiques" et le nucléole. La dispersion de la chromatine semble atteindre un état extrême, ce qui rend difficile l'interprétation précise des différents constituants extranucléolaires. Néanmoins, l'étude de l'évolution morphologique du noyau réalisée dès le début du stade diplotène révèle que les "granulations nucléoplasmiques" sont issues de la décondensation des chromosomes méiotiques et présentent de nombreuses ressemblances avec le matériel des chromosomes plumeux ou dictyés décrits dans l'ensemble du règne animal (BAL *et al.*, 1969 ; BAKER et FRANCHI, 1967 ; MOTT et CALLAN, 1975). L'étude autoradiographique montre que les "granulations nucléoplasmiques" sont le siège d'une incorporation appréciable d'uridine-<sup>3</sup>H. On peut suggérer, par analogie avec les chromosomes plumeux (PUKKILA, 1975 ; OLD *et al.*, 1977), que les RNA synthétisés au niveau des "granulations nucléoplasmiques" sont de différentes catégories : hnRNA, rRNA 5 S, tRNA.

Le nucléole possède une organisation assez rarement signalée dans le cas des ovocytes. La dualité du constituant fibrillaire observée chez les *Nereidae* conduit à rattacher la structure de cet organite au modèle proposé pour les nucléoles à centres fibrillaires (MIRRE et STAHL, 1978 a et b ; GOESSENS et LEPOINT, 1979). Par ailleurs, nos observations font apparaître que le nucléole ovocytaire subit une évolution morphologique tout à fait remarquable. Les études autoradiographique et biochimique réalisées parallèlement montrent que cette évolution correspond aux variations de l'intensité des synthèses de rRNA 18 et 28 S. Il devient maintenant possible de définir chaque étape de l'ovogenèse des *Nereidae*, non seulement par des caractéristiques cytoplasmiques (prévitellogenèse, vitellogenèse, élaboration des organites corticaux), mais également par un type d'organisation nucléolaire, lié à un taux déterminé de synthèse des RNA ribosomiques.

En ce qui concerne l'évolution de la synthèse de chacun des différents types de RNA, l'ensemble des résultats suggère 1) que chaque

catégorie de RNA n'est pas élaborée avec une intensité constante pendant toute la durée de l'ovogenèse, 2) que les synthèses des diverses classes de RNA ne sont pas synchronisées. En effet, dans les ovocytes jeunes (prévitellogenèse), le taux de synthèse des RNA extranucléolaires est beaucoup plus élevé que celui des RNA nucléolaires. Cette prépondérance s'atténue puis disparaît au fur et à mesure de la croissance ovocytaire. La production des rRNA nucléolaires semble atteindre un maximum pendant la vitellogenèse puis décroît progressivement jusqu'à la fin de l'ovogenèse. Il est donc probable que, conformément à ce qui se produit chez les Vertébrés inférieurs (DENIS, 1977), il n'existe pas de synchronisation entre la synthèse des RNA 4 et 5 S et celle des rRNA 18 et 28 S.

Les résultats obtenus chez les *Nereidae* permettent donc de mieux saisir plusieurs aspects de la différenciation et de l'évolution des formations nucléaires au cours de l'ovogenèse. Toutefois, l'explication précise de certaines observations est encore obscure. C'est ainsi que l'échec de la mise en évidence du DNA à l'échelle ultrastructurale entrave l'interprétation exacte de certains constituants du nucléole et des "granulations nucléoplasmiques". De même, les connaissances sur l'évolution de la synthèse des différentes classes de RNA se trouvent limitées par l'impossibilité d'étudier les ovocytes très jeunes par des méthodes biochimiques. Nous nous proposons d'essayer de combler ces lacunes par la mise en oeuvre de techniques d'hybridation moléculaire *in situ*. Nous espérons ainsi pouvoir localiser avec exactitude les gènes codant divers RNA "stables" (rRNA 18 et 28 S, RNA 4 et 5 S) et obtenir plus de précisions quant aux modalités de l'élaboration de différents types de RNA ovocytaires.

## 2 - Spermatogenèse

La possibilité de provoquer expérimentalement la méiose nous a permis de procéder à une étude détaillée de l'évolution des constituants nucléaires pendant la spermatogenèse. En particulier, pendant l'interphase préméiotique, on observe que la chromatine, le nucléole et les RNP nucléoplasmiques subissent une évolution très caractéristique en fonction des stades G<sub>1</sub>, S et G<sub>2</sub>.

L'étude de la synthèse des RNA fait apparaître un certain nombre de particularités de la spermatogenèse des *Nereidae*. Contrairement aux autres espèces étudiées (MONESI, 1964 ; DAS, 1968 ; KIERSZENBAUM et TRES, 1974 ; KALT, 1979), on constate 1) que la ma-

jeure partie des RNA est élaborée pendant l'interphase préméiotique, 2) que la synthèse des RNA d'origine nucléolaire cesse dès la fin de l'interphase tandis que celle des RNA extranucléolaires se poursuit pendant la prophase méiotique. Par contre, le fait qu'une partie des RNA synthétisés avant les divisions de maturation soit vraisemblablement conservés jusqu'au stade spermatide est en accord avec la plupart des données de la littérature (GOULD-SOMERO et HOLLAND, 1974 ; BETLACH et ERICKSON, 1976 ; SÖDERSTRÖM et PARVINEN, 1976b ; GEREMIA *et al.*, 1977).

Le résultat le plus original fourni par l'étude de la spermatogenèse concerne sans doute la transition de la phase de prolifération spermatogoniale à la phase de différenciation méiotique. L'autoradiographie indique en effet que la synthèse des RNA est beaucoup plus intense pendant l'interphase préméiotique que pendant les cycles mitotiques de multiplication. Contrairement aux synthèses de DNA (STERN et HOTTA, 1977) et d'histones (revue dans D'AMATO, 1977), le taux de synthèse préméiotique des RNA a été rarement impliqué dans le processus de différenciation de la méiose. Nos résultats expérimentaux (réintroduction du facteur hormonal, emploi d'inhibiteurs) montrent très nettement que le ralentissement de la synthèse des RNA entraîne des retards dans le déroulement de la méiose. De nouvelles recherches seront nécessaires pour déterminer le rôle exact de l'augmentation de la synthèse des RNA dans la différenciation méiotique mâle chez les *Nereidae*.

## II - MECANISME DE LA REGULATION HORMONALE

L'ensemble des observations effectuées témoigne de la sensibilité des constituants nucléaires aux variations de l'activité endocrine cérébrale. Ces variations, qu'elles soient naturelles ou expérimentales, déclenchent rapidement des changements qui se traduisent, au niveau moléculaire, par des modifications de la synthèse des RNA.

Au cours de l'ovogenèse, les expériences montrent très nettement que l'hormone cérébrale est nécessaire au stockage des RNA stables. Cependant, il semble que la régulation hormonale n'agisse pas directement sur la transcription de ces RNA mais plutôt à des étapes ultérieures de leur élaboration. Les analyses biochimiques suggèrent notamment que l'hormone intervient au niveau de la maturation du rRNA 45 S. Les connaissances actuelles concernant la production des RNA stables (JACOB *et al.*, 1970 ; SCHMID et SEKERIS, 1973 ; LEVEY et BRINSTER, 1978 ; VOETS *et al.*, 1979) permettent de penser que l'hormone cérébrale des *Nereidae* pourrait stimuler la synthèse de mRNA codant des protéines indispensables à l'élaboration des RNA stables oocytaires.

Pendant la spermatogenèse, l'hormone exerce également un effet incontestable sur les RNA. Les expériences de suppression et de réintroduction de l'activité endocrine cérébrale montrent que la synthèse préméiotique des RNA ne peut se réaliser qu'en absence de l'activité endocrine cérébrale. Toutefois, les effets d'inhibiteurs utilisés dans le but de mimer l'action hormonale suggèrent que cette dernière ne peut pas être réduite à une simple régulation quantitative de la synthèse préméiotique des RNA. Les diverses observations plaident plutôt en faveur d'une action sur les gènes responsables du choix entre le comportement mitotique et le comportement méiotique.

Ces conclusions incitent à penser que l'hormone cérébrale agit spécifiquement sur des gènes bien déterminés, qui diffèrent selon le type cellulaire effecteur : gènes responsables de la maturation des RNA stables (ovocytes), gènes impliqués dans la transition de la phase de prolifération spermatogoniale à la phase de différenciation méiotique (cellules mâles). Ce mécanisme est conforme aux conceptions actuelles concernant les modalités du contrôle de la différenciation cellulaire par les hormones morphogénétiques. La plupart des auteurs considèrent en effet que ces dernières stimulent la synthèse de protéines spécifiques en dérégulant sélectivement les gènes correspondants (O'MALLEY *et al.*, 1979 ; TATA et SMITH, 1979 ; TATA, 1980).

L'étude de l'action hormonale sur les constituants du noyau des cellules germinales permet donc de mieux comprendre certains des effets de l'hormone cérébrale des *Nereidae*. Néanmoins, la diversité et la complexité de son action posent encore des problèmes fondamentaux. Il faut en effet garder présent à l'esprit les faits suivants : 1) cette hormone ne contrôle pas l'expression d'un seul gène (ou d'un seul groupe de gènes) mais l'ensemble du programme de différenciation d'un type cellulaire, 2) le taux hormonal décroît au cours de la réalisation de ce programme. Ainsi, au cours de l'ovogenèse, certains processus nécessitent un taux hormonal élevé (vitellogenèse, accumulation des RNA stables), d'autres un taux plus faible (élaboration des organites corticaux). De même, au cours de la spermatogenèse, la multiplication spermatogoniale s'effectue en présence d'une activité endocrine forte tandis que la différenciation méiotique se déroule en absence du facteur hormonal. On peut supposer, comme PORCHET (1974), qu'il existe "une cascade de dérégulations géniques

liées chacune à une certaine concentration hormonale du milieu intérieur". Mais le mécanisme exact par lequel un gène bien défini est activé par un taux hormonal déterminé pose encore de nombreux problèmes.

RESUME

- Dès le début de la phase de croissance ovocytaire, les chromosomes méiotiques (stade diplotène) subissent une décondensation qui aboutit à des formations appelées "granulations nucléoplasmiques". Ces dernières, qui présentent un certain nombre d'analogies avec les chromosomes plumeux des Amphibiens et les chromosomes dictyés des Mammifères, semblent constituer un état extrême de dispersion du matériel chromosomique.
  
- La morphologie du nucléole ovocytaire n'est pas constante pendant toute la durée de la phase de croissance. Au début de son développement (stades de prévitellogenèse et de vitellogenèse), cet organite est formé de 3 constituants : fibrillaire clair, fibrillaire dense, granulaire. Les résultats de la cytochimie et de l'autoradiographie à haute résolution suggèrent que ce type d'organisation nucléolaire peut être rattaché au modèle proposé (GOESSENS et LEPOINT, 1979) pour les nucléoles à centres fibrillaires.
  
- Le nucléole a été étudié à chacune des étapes de l'ovogenèse. L'organisation caractéristique du stade de vitellogenèse disparaît lors du stade d'élaboration des organites corticaux. En particulier, le cortex granulaire fait place à un constituant fibrillo-granulaire beaucoup moins riche en granules. Le stade de maturité voit les constituants nucléolaires se ségréger en deux hémisphères pour former un amphinucléole.  
Il est donc possible de définir chaque stade de l'ovogenèse non seulement par la nature des synthèses cytoplasmiques (prévitellogenèse, vitellogenèse, élaboration des organites corticaux, maturité), mais également par la structure du nucléole. De plus, la confrontation de l'évolution de cet organite à celle de l'activité endocrine cérébrale montre qu'il existe un synchronisme rigoureux entre les remaniements de l'organisation nucléolaire et les variations du taux hormonal.
  
- L'étude autoradiographique, à haute résolution, de l'incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H révèle l'existence de deux sites de synthèse des RNA ovocytaires : les granulations nucléoplasmiques et le nucléole.

- Dans le cytoplasme, l'étude cinétique de la migration des molécules radioactives montre que les "agrégats cytoplasmiques" sont les premiers sites marqués. Ces formations, proches des "nuages" et du "ciment intermitochondrial" décrits chez d'autres espèces, pourraient être le lieu d'assemblage des ribosomes.
  
- L'étude autoradiographique et biochimique de la synthèse des RNA à chacun des stades de l'ovogenèse fait apparaître que les différentes classes de RNA "stables" (RNA 4 et 5 S, rRNA 18 et 28 S) ne sont pas synthétisés avec la même intensité pendant toute la durée de la croissance ovocytaire.
  
- En particulier, la synthèse des RNA d'origine nucléolaire (rRNA 18 et 28 S) atteint un maximum pendant le stade de vitellogenèse puis décroît progressivement jusqu'à la fin de l'ovogenèse. Il est possible de relier chaque étape de l'évolution morphologique du nucléole à un taux déterminé de synthèse des rRNA. L'organisation nucléolaire typique du stade de vitellogenèse correspond à des synthèses très élevées. Les modifications ultrastructurales observées pendant le stade d'élaboration des organites corticaux sont corrélatives d'une diminution de ces synthèses. Enfin, la ségrégation nucléolaire (amphinucléole) traduit leur arrêt pratiquement total.
  
- Les synthèses des différentes catégories de RNA ne semblent pas synchronisées. Dans les ovocytes jeunes, le taux de synthèse des RNA extranucléolaires est beaucoup plus élevé que celui des RNA nucléolaires. Cette prépondérance s'atténue puis disparaît au fur et à mesure de la croissance ovocytaire.
  
- La suppression expérimentale de l'activité endocrine cérébrale provoque une accélération de l'évolution nucléolaire. Chez *Perinereis cultrifera*, les transformations morphologiques que subit le nucléole dans les conditions expérimentales ne diffèrent pas de celle qui sont observées au

cours de l'ovogenèse naturelle. Par contre, chez *Nereis diversicolor*, le nucléole est l'objet de modifications caractéristiques. On assiste, en particulier, au développement considérable d'une vacuole au centre de l'organite.

- Au niveau moléculaire, on constate que la synthèse des RNA stables diminue très nettement après la suppression expérimentale de l'action hormonale. L'analyse biochimique révèle que la maturation du rRNA précurseur 45 S est altérée.
  
- Ces résultats permettent de proposer une hypothèse concernant le mécanisme de la régulation hormonale de la synthèse des RNA stables ovocytaires chez les *Nereidae*. L'hormone cérébrale aurait un effet stimulateur sur la synthèse de ces RNA mais n'agirait pas sur leur transcription. Elle exercerait son action régulatrice au niveau de la maturation des RNA stables.
  
- Au cours de la spermatogenèse, la suppression de l'activité endocrine provoque le passage de la phase de prolifération spermatogoniale à la phase de différenciation méiotique. La chronologie de la spermatogenèse, après mise en culture de parapodes en absence de cerveau, est la suivante :
  - 3ème jour : premiers indices de l'entrée en interphase préméiotique
  - 7ème jour : phase S préméiotique
  - 9ème jour : prophase méiotique
  - 11ème jour : divisions de maturation
  - 12ème jour : spermiogenèse
  - 13ème jour : spermatozoïdes
  
- L'étude ultrastructurale des divers éléments du noyau (chromatine, nucléole, RNP nucléoplasmiques) fournit un certain nombre de critères qui permettent de distinguer les cellules en interphase préméiotique des spermatogonies en phase de prolifération. En outre, pendant l'interphase préméiotique, une évolution des constituants nucléaires en fonction des phases G<sub>1</sub>, S et G<sub>2</sub> a été mise en évidence.

- Le taux de répliation (indice de marquage après incorporation de thymidine-<sup>3</sup>H) des spermatogonies en phase de prolifération est relativement faible. Ce qui signifie que ces cellules n'entrent pas toutes au même moment en phase S du cycle mitotique. Par contre, il se produit une certaine synchronisation lors de l'entrée en phase S préméiotique puisque le taux de répliation atteint près de 100 % (au 7ème jour de culture) lors du processus de différenciation méiotique induit par la suppression de l'activité endocrine.
  
- L'étude de l'indice de marquage après incorporation d'uridine-<sup>3</sup>H fait apparaître que la suppression de l'action hormonale provoque, comme dans le cas de la répliation du DNA, une augmentation considérable de la proportion de cellules en phase de synthèse des RNA. L'étude de l'intensité de marquage montre que ces synthèses sont plus élevées pendant l'interphase préméiotique que pendant les cycles mitotiques de la phase de prolifération spermatogoniale. L'augmentation de la synthèse des RNA pourrait jouer un rôle dans le passage du comportement mitotique au comportement méiotique.
  
- L'intensité de la synthèse des RNA varie au fur et à mesure du déroulement de la spermatogenèse. Pendant l'interphase préméiotique, les synthèses atteignent un maximum avant la phase S (5ème jour de culture). Puis elles diminuent pour devenir très faibles pendant la prophase méiotique. Elles sont pratiquement inexistantes au cours des divisions de maturation et de la spermiogenèse. La majeure partie des RNA est donc élaborée pendant l'interphase préméiotique. Il est vraisemblable qu'une fraction de ces RNA est conservée jusqu'à la spermiogenèse.
  
- L'autoradiographie à haute résolution donne des indications sur la nature des RNA synthétisés au cours des différents stades de la spermatogenèse. Ainsi, on constate que la synthèse des RNA d'origine nucléolaire (rRNA) cesse dès la fin de l'interphase préméiotique. En revanche, l'élaboration des RNA extranucléolaires (hnRNA ?) se poursuit pendant la prophase méiotique, au moins jusqu'au stade pachytène.

- Les expériences de réintroduction de l'action hormonale à différents stades de la spermatogenèse (association d'un prostomium à un parapode primitivement isolé) permettent de montrer :
  - qu'il est possible d'empêcher la différenciation méiotique à condition d'intervenir avant un point critique (3ème jour de culture), qui correspond au début de l'augmentation des synthèses préméiotiques de RNA.
  - qu'après ce point critique (3ème-7ème jour de culture), l'association d'un prostomium ne provoque qu'un ralentissement du processus de différenciation méiotique.
  - que l'intervention n'a plus aucun effet après le début de la prophase méiotique (9ème jour de culture).
  
- Dans le cas de la réintroduction du facteur hormonal pendant la phase de synthèse préméiotique des RNA (3ème-7ème jour de culture), le ralentissement du processus de différenciation méiotique est dû 1) à un retard de l'entrée en phase S, 2) surtout à une augmentation de la durée de la prophase méiotique. Parallèlement, l'autoradiographie révèle une diminution de l'intensité des synthèses de RNA. Il semble que l'hormone exercerait son action régulatrice de la différenciation méiotique par l'intermédiaire d'un contrôle de la synthèse préméiotique des RNA.
  
- L'action d'inhibiteurs de la synthèse des RNA (Actinomycine D,  $\alpha$ -Amanitine, Cordycepine)
  - provoque des altérations nucléaires typiques telles que la ségrégation nucléolaire,
  - entraîne une diminution de la synthèse des RNA pouvant atteindre 80 %.
  
- Les inhibiteurs ont été ajoutés au milieu de culture à différentes étapes de la spermatogenèse. Les résultats obtenus montrent que ces substances miment certains des effets de l'hormone cérébrale. Elles permettent, notamment, de retarder la différenciation méiotique. Par contre, même employées dès la mise en culture, elles sont incapables, contrairement à la réintroduction du facteur hormonal, de bloquer la différenciation méiotique. Le contrôle hormonal de ce processus ne peut donc se réduire à une simple régulation quantitative des synthèses préméiotiques de RNA.

■ Les divers résultats expérimentaux (réintroduction du facteur hormonal, action des inhibiteurs) suggèrent que l'hormone cérébrale contrôle la spermatogenèse pendant une période critique (au cours de la phase G<sub>1</sub>) du cycle cellulaire. Elle agirait en exerçant son action sur l'expression de gènes responsables du choix entre le comportement mitotique (phase de prolifération spermatogoniale) et le comportement méiotique (phase de différenciation des spermatocytes).

## BIBLIOGRAPHIE

## A

- ADAMSTONE F.B. et TAYLOR A.B., 1972 - Nucleolar reorganization in epithelial cells of the jejunum of the rat. *J. Morphol.*, 136, 131-152.
- ALFERT M. et GESCHWIND I.I., 1953 - A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 39, 991-999.
- AMATO G.D. et PAYEN G.G., 1978 - Mise en évidence du contrôle endocrine des différentes étapes de la spermatogenèse chez l'écrevisse *Pontastacus leptodactylus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823), Crustacé, Décapode, Reptantia. *Gen. comp. Endocrinol.*, 36, 487-496.
- ANDRE J. et ROUILLER C., 1957 - L'ultrastructure de la membrane nucléaire des ovocytes de l'Araignée (*Tegeneria domestica* Clark). *Proc. Europ. Electron Microsc. Stockholm, 1956*, F. Sjöstrand et J. Rhodin ed., Acad. Press, N.Y., 162-164.
- ANTEUNIS A., POUCHELET M., ROBINEAUX R. et VIAL M., 1973 - Ultrastructure des acides nucléiques et en particulier de l'ADN nucléolaire des cellules L 929 après coloration par la 3-3' diaminobenzidine (DAB) oxydée. *C. R. Acad. Sci.*, 277, 1169-1171.
- ANTROPOVA E.N. et BOGDANOV Y. F., 1970 - Cytophotometry of DNA and histone in meiosis of *Pyrrhocoris apterus*. *Exptl Cell Res.*, 60, 40-44.
- AZEVEDO C. et COÏMBRA A., 1980 - Evolution of nucleoli in the course of oogenesis in a viviparous Teleost (*Xiphophorus helleri*). *Biol. Cellulaire*, 38, 43-48.

## B

- BAKER T.G. et FRANCHI L.L., 1967 - The structure of the chromosomes in human primordial oocytes. *Chromosoma*, 22, 358-377.
- BAL A.K., JUBINVILLE E. et COUSINEAU G.H., 1969 - Nuclear activity during oogenesis in sea urchins. II. Fine structural changes and patterns of RNA synthesis during meiotic prophase of *Arbacia punctulata* oocytes. *Z. Zellforsch.*, 100, 180-188.
- BARCELLONA W.J. et BRINKLEY B.R., 1973 - Effects of actinomycin D on spermatogenesis in the Chinese Hamster. *Biol. Reprod.*, 8, 335-349.

- BARCKHAUSEN R. et ROSENSTOCK G., 1973 - Feinstrukturelle Untersuchungen zum Vorkommen von "Riesenvakuolen" in Nucleoli verletzter Parenchymzellen aus der Knolle von *Solanum tuberosum* L. Biochem. Physiol. Pflanz., 164, 327-337.
- BARNETT R.J. et SELIGMANN A.M., 1952 - Histochemical demonstration of protein bound sulphhydryl groups. Science, 116, 323-327.
- BASS N.R. et BRAFIELD A.E., 1972 - The life-cycle of the Polychaete *Nereis virens*. J. mar. biol. ass. U.K., 52, 701-726.
- BAULIEU E.E., WIRA C.R., MILGROM E. et RAYNAUD-JAMMET C., 1972 - Ribonucleic acid synthesis and oestradiol action in the uterus. Acta Endocrinol., Suppl. 168, 396-419.
- BAUMEISTER H.G., 1973 - Lampbrush chromosomes and RNA synthesis during early oogenesis of *Brachydanio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). Z. Zellforsch., 145, 145-150.
- BENNETT M.D. et STERN H., 1975 - The time and duration of preleptotene chromosome condensation stage in *Lilium* hybrid cv. Black Beauty. Proc. R. Soc. Lond. B., 188, 477-493.
- BERNHARD W., 1969 - A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct. Res., 27, 250-265.
- BERNHARD W., FRAYSSINET C., LAFARGE C. et LEBRETON E., 1965 - Lésions nucléolaires précoces provoquées par l'aflatoxine dans les cellules hépatiques du rat. C. R. Acad. Sci., 261, 1785-1788.
- BERTOOUT M., 1972 - Développement d'une vacuole nucléolaire dans l'ovocyte de *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète) après suppression de l'action endocrine du cerveau. C. R. Acad. Sci., 275, 2683-2686.
- BERTOOUT M., 1976 - Spermatogenèse de *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète). 1. Evolution du cytoplasme et élaboration de l'acrosome. J. Microscopie Biol. Cell., 25, 87-94.
- BERTOOUT M., CANER F., DHAINAUT A. et KREMBEL J., 1981 - Development of the nuclear structure and metabolism during oogenesis of *Perinereis cultrifera* (Annelida Polychaeta). J. Invert. Reprod., 3, 121-132.
- BERTOOUT M. et DHAINAUT A., 1971 - Etude cytochimique et autoradiographique de l'ovogenèse de *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète), dans les conditions naturelles et en l'absence d'hormone cérébrale. Gen. comp. Endocrinol., 17, 371-387.

- BETLACH C.J. et ERICKSON R.P., 1976 - 28 S and 18 S ribonucleic acid from mammalian spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, 198, 49-56.
- BLOOM S.E. et GOODPASTURE C., 1976 - An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Hum. Genet.*, 34, 199-206.
- BOCQUET-VEDRINE J., 1980 - Modifications ultrastructurales du nucleole induites par un stimulus hormonal 20-hydroxyecdysone au niveau de l'épithélium d'un Crustacé. *C. R. Acad. Sci.*, 290, 477-479.
- BOGDANOV Y.F. et ANTROPOVA E.N., 1971 - Delayed termination of nuclear histone doubling after premeiotic DNA synthesis in *Triturus vulgaris* male meiosis. *Chromosoma*, 35, 353-373.
- BOGDANOV Y.F., LIAPONOVA N.A., SHERUDILO A.I. et ANTROPOVA E.N., 1968 - Uncoupling of DNA and histone synthesis prior to prophase I of meiosis in the cricket *Grillus (Acheta) domesticus* L. *Exptl Cell Res.*, 52, 59-70.
- BOGDANOV Y.F., STROKOV A.A. et REZNICKOVA S.A., 1973 - Histone synthesis during meiotic prophase in *Lilium*. *Chromosoma*, 43, 237-245.
- BOLOGNARI A., LICATA A. et RICCA M.B., 1976 - Primary nucleolus and amphinucleoli in oocytes of *Patella coerulea* L. (Mollusca Gastropoda). *Experientia*, 32, 1008-1009.
- BOTTKE W., 1973 a - Zur Ultrastruktur des Ovars von *Viviparus contectus* (Millet, 1813) (Gastropoda, Prosobranchia). II. Die Oocyten. *Z. Zellforsch.*, 138, 239-260.
- BOTTKE W., 1973 b - Lampenbürsten Chromosomen und Amphinukleolen in Oocytenkernen der Schnecke *Bithynia tentaculata* L. *Chromosoma*, 42, 175-190.
- BOURGEOIS C.A., HERNANDEZ-VERDUN D., HUBERT J. et BOUTEILLE M., 1979 - Silver staining of NORs in electron microscopy. *Exptl Cell Res.*, 123, 449-452.
- BRASIELLO A., 1968 - Autoradiographic study of ribonucleic acid synthesis during spermatogenesis of *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda). *Exptl Cell Res.*, 53, 252-260.
- BRÄUER R., GERSCH M. et BAUMANN E., 1976 - Specific action of activation factor I on RNA synthesis in prothoracic glands in insects. *J. Insect Physiol.*, 22, 147-152.
- BROCK W.A., 1977 - Evidence against gene expression after meiosis in the male mouse. *J. Exp. Zool.*, 202, 69-80.

- BROWN D.D. et LITTNA E., 1966 - Synthesis and accumulation of DNA-like RNA during embryogenesis of *Xenopus laevis*. J. Mol. Biol., 20, 81-94.
- BURGLÉN J.M., 1974 - Quelques précisions techniques concernant l'emploi de la coloration régressive à l'EDTA. J. Microscopie, 21, 193-196.
- BURNS E.R. et SOLOFF B.L., 1972 - Nucleolar vacuoles in cells cultured from lung and peritoneum of *Diemiotylus viridescens*. Tissue and Cell, 4, 63-71.
- BUSCH H. et SMETANA K., 1970 - The nucleolus. Academic Press, New-York.
- BUYS C.H.C.M. et OSINGA J., 1980 - Abundance of protein bound sulfhydryl and disulfide groups at chromosomal nucleolus organizing regions. A cytochemical study on the selective silver staining of NORs. Chromosoma, 77, 1-12.
- BYSKOV A.G. et SAXEN L., 1976 - Induction of meiosis in fetal mouse testis *in vitro*. Develop. Biol., 52, 193-200.

## C

- CANER F., BERTOUT M., KREMBEL J. et DHAINAUT A., sous presse - Action of the brain hormone on the synthesis of "stable" oocyte RNA in *Nereidae* (Annelida Polychaeta).
- CHANDLEY A.C., 1978 - Morphological and biochemical aspects of mammalian meiosis. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 18, 359-365.
- CHEN M.J., 1954 - The cultivation in fluid medium of organized liver, pancreas and other tissues of foetals rats. Exptl Cell. Res., 7, 518-529.
- CHEVAILLIER P., 1974 - Recherches sur le complexe synaptonématique. I. Mise en évidence des constituants nucléoprotéiques du complexe synaptonématique par la méthode de Bernhard. J. Microscopie, 19, 147-154.
- CHOUINARD L.A., 1966 - Nucleolar architecture in root meristematic cells of *Allium cepa*. Nat. Cancer Inst. Monogr., 23, 125-143.
- CHOUINARD L.A., 1971 - A light- and electron-microscope study of the nucleolus during growth of the oocyte in the prepubertal mouse. J. Cell Sci., 9, 637-665.

- CHOUINARD L.A., 1975 - A light- and electron-microscope study of the oocyte nucleus during development of the antral follicle in the prepubertal mouse. *J. Cell Sci.*, 17, 589-616.
- CLARK R.B. et RUSTON R.J.G., 1963 a - The influence of brain extirpation on oogenesis in the Polychaete *Nereis diversicolor*. *Gen. comp. Endocrinol.*, 3, 529-541.
- CLARK R.B. et RUSTON R.J.G., 1963 b - Time of release and action of a hormone influencing regeneration in the Polychaete *Nereis diversicolor*. *Gen. comp. Endocrinol.*, 3, 542-553.
- CLEROT J.-C., 1968 - Mise en évidence par cytochimie ultrastructurale de l'émission de protéines par le noyau d'auxocytes de Batraciens. *J. Microscopie*, 7, 973-992.
- CLEROT J.-C., 1976 - Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons Téléostéens Cyprinidés. I. Etude ultrastructurale. *J. Ultrastruct. Res.*, 54, 461-475.
- CLEROT J.-C., 1979 - Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons Téléostéens Cyprinidés. II. Etude autoradiographique à haute résolution de l'incorporation de phénylalanine-<sup>3</sup>H et d'uridine-<sup>3</sup>H. *Exptl Cell. Res.*, 120, 237-244.
- COGLIATI R. et GAUTIER A., 1973 - Mise en évidence de l'ADN et des polysaccharides à l'aide d'un nouveau réactif "de type Schiff". *C. R. Acad. Sci.*, 276, 3041-3044.
- CSABA G., 1977 - Hormonal regulation : morphogenetic and adaptative systems. *Biol. Rev.*, 52, 295-303.

## D

- D'AMATO F., 1977 - Nuclear cytology in relation to development. Cambridge University Press, Cambridge.
- DARNELL J.E., PHILIPSON L., WALL R. et ADESNIK M., 1971 - Polyadenylic acid sequences : role in conversion of nuclear RNA into messenger RNA. *Science*, 174, 507-510.
- DARZYNKIEWICZ Z., EVENSON D., STAIANOCOICO L., SHARPLESS T. et MELAMED M.R., 1979 - Relationship between RNA content and progression of lymphocytes through S-Phase of cell cycle. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76, 358-362.

- DAS N.K., 1965 - Inactivation of the nucleolar apparatus during meiotic prophase in corn anthers. *Exptl Cell. Res.*, 40, 360-364.
- DAS N.K., 1968 - Developmental features and synthetic patterns of male germ cells of *Urechis caupo*. *Roux' Archiv.*, 161, 325-335.
- DAS N.K., 1976 - Cytochemical and biochemical analysis of development of *Urechis* oocytes. *Amer. Zool.*, 16, 345-362.
- DAS N.K., SIEGEL E.P. et ALFERT M., 1965 - Synthetic activities during spermatogenesis in the locust. *J. Cell Biol.*, 25, 387-395.
- DAVIDSON E.H., 1968 - Gene activity in early development. Academic Press, New York.
- DAVIS F.C. et WILT F.H., 1972 - RNA synthesis during oogenesis in the Echiuroid worm *Urechis caupo*. *Develop. Biol.*, 27, 1-12.
- DEFRETIN R. et WISSOCQ J.-C., 1974 - Le spermatozoïde de *Nereis irrorata* Malmgren (Annélide Polychète). *J. Ultrastruct. Res.*, 47, 196-213.
- DENIS H., 1977 - Accumulation du RNA dans les oocytes des Vertébrés inférieurs. *Biol. Cellulaire*, 28, 87-92.
- DERENZINI M., 1979 - Fine structure of chromatin as visualized in thin sections with the Gautier selective stain for DNA. *J. Ultrastruct. Res.*, 69, 239-248.
- DERENZINI M. et MOYNE G., 1978 - The nucleolar origin of certain perichromatin-like granules : a study with  $\alpha$ -amanitin. *J. Ultrastruct. Res.*, 62, 213-219.
- DHAINAUT A., 1964 a - Etude, en culture organotypique, de l'influence de l'hormone cérébrale des Néréidiens sur les synthèses de DNA au cours de la spermatogenèse. *C. R. Acad. Sci.*, 259, 461-464.
- DHAINAUT A., 1964 b - Contribution à l'étude du métabolisme de l'ARN par incorporation de  $^3\text{H}$ -uracile, au cours de l'ovogenèse chez *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète). *Bull. Soc. Zool. France*, 89, 408-413.
- DHAINAUT A., 1967 - Etude de la vitellogenèse chez *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète) par autoradiographie à haute résolution. *C. R. Acad. Sci.*, 265, 434-436.
- DHAINAUT A., 1968 - Etude par autoradiographie à haute résolution de l'élaboration des mucopolysaccharides acides au cours de l'ovogenèse de *Nereis pelagica* (Annélide Polychète). *J. Microscopie*, 7, 1075-1080.

- DHAINAUT A., 1969 a - Origine et structure des formations mucopolysaccharidiques de la zone corticale de l'ovocyte de *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète). J. Microscopie, 8, 69-86.
- DHAINAUT A., 1969 b - Etude ultrastructurale et cytochimique de la formation des inclusions intranucléaires dans les ovocytes de l'Annélide *Nereis diversicolor* O.F. Müller. Z. Zellforsch., 96, 75-86.
- DHAINAUT A., 1970 a - Contribution à l'étude de la gamétogenèse des Néréidiens (Annélides Polychètes) dans les conditions naturelles et en l'absence d'hormone cérébrale. Thèse Doct. Etat, Université de Lille.
- DHAINAUT A., 1970 b - Etude en microscopie électronique et par autoradiographie à haute résolution des extrusions nucléaires au cours de l'ovogenèse de *Nereis pelagica* (Annélide Polychète). J. Microscopie, 9, 99-118.
- DHAINAUT A., 1972 - Evolution nucléolaire au cours de l'ovogenèse de *N. pelagica* (Annélide Polychète). I. Etude morphologique. J. Microscopie, 13, 67-84.
- DHAINAUT A., 1976 - Contrôle hormonal de la biosynthèse des glycoconjugués chez l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète). II. Etude autoradiographique. In "Actualité sur les hormones d'Invertébrés", C.N.R.S., Paris, 85-98.
- DHAINAUT A. et PORCHET M., 1967 - Evolution ovocytaire en l'absence d'hormone cérébrale chez *Perinereis cultrifera* Grube (Annélide Polychète). C. R. Acad. Sci., 264, 2807-2810.
- DHAINAUT A. et PORCHET M., 1977 a - Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. II. Etude autoradiographique des ovocytes jeunes. Biol. Cellulaire, 28, 233-240.
- DHAINAUT A. et PORCHET M., 1977 b - Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. III. Etude autoradiographique des ovocytes submatures. Biol. Cellulaire, 28, 241-250.
- DUMSER J.B. et DAVEY K.G., 1975 - The *Rhodnius* testis : hormones, differentiation of the germ cells, and duration of the molting cycle. Canad. J. Zool., 53, 1673-1681.
- DURCHON M., 1948 - Epitoque expérimentale chez deux Polychètes : *Perinereis cultrifera* et *Nereis irrorata*. C. R. Acad. Sci. 227, 157-158.

- DURCHON M., 1952 - Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les Annélides Polychètes : l'épitoquie et la stolonisation. *Ann. Sci. Nat., Zool.*, 14, 119-206.
- DURCHON M., 1956 - Influence du cerveau sur les processus de régénération caudale chez les Néréidiens. *Arch. Zool. exp. gén.*, 94, 1-9.
- DURCHON M., BOILLY B. et DHAINAUT A., 1965 - Recherches en culture organotypique sur l'action de l'hormone cérébrale des Néréidiens (Annélides Polychètes). *C. R. Soc. Biol.*, 159, 106-113.
- DURCHON M. et DHAINAUT A., 1964 - Influence de l'hormone cérébrale des Néréidiens sur la croissance des ovocytes. Etude en culture organotypique. *C. R. Acad. Sci.*, 259, 917-919.
- DURCHON M. et PORCHET M., 1970 - Dosage de l'activité endocrine cérébrale au cours du cycle génital femelle chez *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète). *C. R. Acad. Sci.*, 270, 1689-1691.
- DURCHON M. et PORCHET M., 1971 - Premières données quantitatives sur l'activité endocrine du cerveau des Néréidiens au cours de leur cycle sexuel. *Gen. comp. Endocrinol.*, 16, 555-565.
- DURCHON M. et SCHALLER F., 1963 - Application de la méthode de culture organotypique aux recherches endocrinologiques chez les Annélides Polychètes. *C. R. Acad. Sci.*, 256, 5616-5617.
- DURYEE W.R., 1969 - Dependence of tumor formation in frogs on abnormal nucleolar function. *In "Biology of Amphibian Tumors"* M. Mizell ed., Springer Verlag, Berlin, 82-100.

## E

- EDDY E.M., 1975 - Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.*, 43, 229-280.
- EDDY E.M. et ITO S., 1971 - Fine structural and radioautographic observations on dense perinuclear cytoplasmic material in Tadpole oocytes. *J. Cell Biol.*, 49, 90-108.

- EPIFANOVA O.I., ABULADZE M.K., ZOSIMOUSKAYA A.I., 1975 - Effects of low concentrations of actinomycin D on the initiation of DNA synthesis in rapidly proliferating and stimulated cell cultures. *Exptl Cell. Res.*, 92, 23-30.
- ERDELSKA O., 1973 - Nukleolarvakuolen in den Zellen des Embryosackes von *Jasione montana* L. *Protoplasma*, 76, 123-128.
- ESPONDA P. et GIMENEZ-MARTIN G., 1972 - The attachment of the synaptonemal complex to the nuclear envelope. An ultrastructural and cytochemical analysis. *Chromosoma*, 38, 405-417.
- ESPONDA P. et STOCKERT J.C., 1971 - Localization of RNA in the synaptonemal complex. *J. Ultrastruct. Res.*, 35, 411-417.
- ESPONDA P. et STOCKERT J.C., 1972 - Evolution of the synaptonemal complex in *Helix aspersa* spermatocytes. *Chromosoma*, 36, 150-157.

## F

- FAKAN S. et NOBIS P., 1978 - Ultrastructural localization of transcription sites and RNA distribution. *Exptl Cell. Res.*, 113, 327-337.
- FAKAN S. et PUVION E., 1980 - The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int. Rev. Cytol.*, 65, 255-300.
- FRANCHI L.L., MANDL A.M. et ZUCKERMAN S., 1962 - The development of the ovary and the process of oogenesis. In "The ovary". S. Zuckerman, A.M. Mandl et P. Eckstein, ed., Academic Press, N.Y., vol. 1, 1-88.
- FUJISHIMA M. et HIWATASHI K., 1978 - Transplantation of germ nucleus in *Paramoecium caudatum*. I. Nuclei in the pre-meiotic S phase can enter into mitotic cycle. *Exptl Cell. Res.*, 111, 468-471.
- FURTADO A., 1979 - The hormonal control of mitosis and meiosis during oogenesis in a blood-sucking bug *Panstrongylus megistus*. *J. Insect Physiol.*, 25, 561-570.

## G

- GABE M., 1968 - Techniques histologiques. Masson et Cie, Paris.

- GALDIERI M. et MONESI V., 1974 - Ribosomal RNA in mouse spermatocytes. Exptl Cell. Res., 85, 287-295.
- GEREMIA R., BOITANI C., CONTI M. et MONESI V., 1977 - RNA synthesis in spermatocytes and spermatids and preservation of meiotic RNA during spermiogenesis in the mouse. Cell. diff., 5, 343-355.
- GEREMIA R., D'AGOSTINO A. et MONESI V., 1978 - Biochemical evidence of haploid gene activity in spermatogenesis of the mouse. Exptl Cell. Res., 111, 23-30.
- GEUSKENS M., 1974 - <sup>3</sup>H-Actinomycin D binding to DNA localized in ultra-thin sections of plastic-embedded biological materials. J. Ultrastruct. Res., 47, 179-195.
- GIMENEZ-MARTIN G., RISUENO M.-C., FERNANDEZ-GOMEZ M.E. et AHMADIAN P., 1975 - Effect of cordycepin on the fine structure of interphase nucleoli in plant cells. Cytobiol., 7, 181-192.
- GIRARD J., JOST A. et DUPOUY J.-P., 1968 - Modifications précoces des hépatocytes de foetus de rat décapités, sous l'influence du cortisol. C. R. Acad. Sci., 267, 857-859.
- GOESSENS G., 1973 - Les "centres fibrillaires" des nucléoles de cellules tumorales d'Ehrlich. C. R. Acad. Sci., 277, 325-327.
- GOESSENS G., 1976 - High resolution autoradiographic studies of Ehrlich tumor cell nucleoli. Nucleolar labelling after [<sup>3</sup>H] actinomycin D binding to DNA or after [<sup>3</sup>H] TdR or [<sup>3</sup>H] uridine incorporation in nucleic acids. Exptl Cell. Res., 100, 88-94.
- GOESSENS G., 1979 - Localization of nucleolus-organizing regions in interphase cells. Cell Tiss. Res., 200, 159-161.
- GOESSENS G. et LEPOINT A., 1979 - The nucleolus-organizing regions (NOR's) : recent data and hypotheses. Biol. Cellulaire, 35, 211-220.
- GONTCHAROFF M. et RAO B., 1972 - Dependence of the nucleolar structure on DNA and RNA synthesis. Chromosoma, 38, 441-457.
- GORDON M., KOHORN E.I., GORE B.Z. et RICE S.I., 1973 - Effect of post-ovulatory oestrogens on the fine structure of the epithelial cell in human endometrium. J. Reprod. Fertil., 34, 375-378.
- GOULD M.-C. et SCHROEDER P.C., 1969 - Studies on oogenesis in the polychaete annelid *Nereis grubei* Kinberg. I. Some aspects of RNA synthesis. Biol. Bull., 136, 216-225.

- GOULD-SOMERO M. et HOLLAND L., 1974 - The timing of RNA synthesis for spermiogenesis in organ culture of *Drosophila melanogaster* testes. Roux' Archiv, 174, 133-148.
- GOULD-SOMERO M. et HOLLAND L., 1975 - Oocyte differentiation in *Urechis caupo* (Echiura) : a fine structural study. J. Morphol., 147, 475-505.
- GROSS P.R., MALKIN L.K. et HUBBARD M., 1965 - Synthesis of RNA during oogenesis in the sea urchin. J. Molec. Biol., 13, 463-481.
- GURDON J.B., 1974 - The control of gene expression in animal development. Clarendon Press, Oxford.

## H

- HARDIN J.H., SPICER S.S. et MALANOS G.E., 1970 - Quantitation of the ultrastructural components of nucleoli of rat trigeminal ganglia. J. Ultrastruct. Res., 32, 274-283.
- HARTWELL L.H., 1974 - *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. Bacteriol. Rev., 38, 164-198.
- HATFIELD J.M.R., DENDY P.P., MEYSKENS F. et RICKINSON A.B., 1973 - Importance of the nucleolus in the initiation of DNA synthesis in mammalian cells. Exptl Cell. Res., 78, 214-224.
- HEINIGER H.J., COCA A. et FEINENDEGEN L.E., 1971 - Effect of ACTH on the nucleolar size of adrenal cortical cells and of liver cells. An electron microscopy study using a quantitative biometrical method. Virchows Arch. Abt B, Zellpathol., 9, 260-270.
- HENDERSON S.A., 1964 - RNA synthesis during male meiosis and spermiogenesis. Chromosoma, 15, 345-366.
- HERNANDEZ-VERDUN D., HUBERT J., BOURGEOIS C. et BOUTEILLE M., 1978 - Identification ultrastructurale de l'organisateur nucléolaire par la technique à l'argent. C. R. Acad. Sci., 287, 1421-1424.
- HIRSCHEBERG J. et SIMCHEN G., 1977 - Commitment to the mitotic cell cycle in yeast in relation to meiosis. Exptl Cell. Res., 105, 245-252.
- HOLLAND N.D. et GIESE A.C., 1965 - An autoradiographic investigation of the gonads of the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*). Biol. Bull., 128, 241-258.
- HOLM P.B., 1977 - The premeiotic DNA replication of euchromatin and heterochromatin in *Lilium longiflorum*. Carlsberg Res. Com., 42, 249-282.

- HOTTA Y., ITO M. et STERN H., 1966 - Synthesis of DNA during meiosis. Proc. Nat. Acad. Sci., 56, 1184-1191.
- HUBBELL H.R., ROTHBLUM L.I. et HSU T.C., 1979 - Identification of a silver binding protein associated with the cytological silver staining of actively transcribing nucleolar regions. Cell. Biol. Intern. Rep., 3, 615-622.
- HUBERT J., 1970 - Etude cytologique et cytochimique des cellules germinales des reptiles au cours de développement embryonnaire et après la naissance. Z. Zellforsch., 107, 249-264.
- HUBERT J., 1973 - Ultrastructural study of the nucleolus during the diplotene stage in the oocytes of the lizard *Lacerta vivipara* Jacquin. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Expér., 61, 325-338.
- HUBERT J., 1975 - Données préliminaires sur les "centres fibrillaires" du nucléole de certaines cellules du follicule ovarien d'un Léopard : *Lacerta muralis* Laur., C. R. Acad. Sci., 281, 271-273.
- HUBERT J. et ANDRIVON C., 1972 - Etude par la méthode autoradiographique des synthèses d'ARN, d'ADN et de protéines dans les gonocytes de l'embryon du Léopard vivipare. C. R. Acad. Sci., 274, 1383-1386.

## J

- JACOB S.T., MUECKE W., SAJEDEL E.M. et MUNRO H.N., 1970 - Evidence for extranucleolar control of RNA synthesis in the nucleolus. Biochem. Biophys. Res. Comm., 40, 334-342.
- JEZEQUEL A.M., SHREEVE M.M. et STEINER J.W., 1967 - Segregation of nucleolar components in mycoplasma-infected cells. Lab. Invest., 16, 287-304.
- JIMENEZ DE ASUA L., O'FARRELL M., BENNETT D., CLINGAN D. et RUDLAND P., 1977 - Interaction of two hormones and their effect on observed rate of initiation of DNA synthesis in 3T3 cells. Nature, 265, 151-153.
- JOHNSON J.M., 1969 - A study of nucleolar vacuoles in cultured tobacco cells using radioautography, actinomycin D and electron microscopy. J. Cell Biol., 43, 197-206.

## K

- KALT M.R., 1973 - Ultrastructural observations on the germ line of *Xenopus laevis*. Z. Zellforsch., 138, 41-62.
- KALT M.R., 1979 - *In vitro* synthesis of RNA by *Xenopus* spermatogenic cells. I. Evidence for polyadenylated and non-polyadenylated RNA synthesis in different cell populations. J. Exp. Zool., 208, 77-96.
- KEDINGER C. et SIMARD R., 1974 - The action of  $\alpha$ -amanitin on RNA synthesis in Chinese Hamster ovary cells : ultrastructural and biochemical studies. J. Cell Biol., 63, 831-842.
- KIELBOWNA L. et KOSCIELSKI B., 1974 - A cytochemical and autoradiographic study of oocyte nucleoli in *Limnea stagnalis* L., Cell Tiss. Res., 152; 103-111.
- KIERSZENBAUM A.L. et TRES L.L., 1974 - Nucleolar and perichromosomal RNA synthesis during meiotic prophase in the mouse testis. J. Cell Biol., 60, 39-53.
- KIERSZENBAUM A.L. et TRES L., 1975 - Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. J. Cell Biol., 65, 258-270.
- KNIBIEHLER B., NAVARRO A., MIRRE C. et STAHL A., 1977 - Localization of ribosomal cistrons in the quail oocyte during meiotic prophase I. Exptl Cell. Res., 110, 153-158.
- KOHORN E.I., RICE S.I., HEMPERLY S. et GORDON M., 1972 - The relation of the structure of pro-gestational steroids to nucleolar differentiation in human endometrium. J. Clin. Endocrinol. Metabol., 34, 257-264.
- KOPRIWA B.M. et LEBLOND C.P., 1962 - Improvements in the coating technique of radioautography. J. Histochem. Cytochem., 10, 269-284.
- KORDAN H.A., 1969 - Nucleolar changes in non-growing and growing Lemon fruit explants (*Citrus limon* L.). Experientia, 25, 517-518.

## L

- LANE N.J., 1967 - Spheroidal and ring nucleoli in amphibian oocytes. Patterns of uridine incorporation and fine structural features. J. Cell Biol. 35, 421-434.

- LARRA F. et DROZ B., 1970 - Techniques radioautographiques et leur application à l'étude du renouvellement des constituants cellulaires. J. Microscopie, 9, 845-880.
- LEVEY I.L. et BRINSTER R.L., 1978 - Effects of  $\alpha$ -amanitin in RNA synthesis by mouse embryos in culture. J. Exp. Zool., 203, 351-360.
- LIAO S., 1975 - Cellular receptors and mechanisms of action of steroid hormones. Int. Rev. Cytol., 41, 87-172.
- LINDELL T.J., WEINBERG F., MORRIS P., ROEDER R.G. et RUTTER W.J., 1970 - Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by  $\alpha$ -amanitin. Science, 447-449.
- LUCIANI J.M., DE VICTOR M. et STAHL A., 1977 - Preleptotene chromosome condensation stage in human foetal and neonatal testes. J. embryol. exp. morphol., 38, 175-186.

## M

- MAIRY M. et DENIS H., 1971 - Recherches biochimiques sur l'oogenèse. I. Synthèse et accumulation du RNA pendant l'oogenèse du crapaud sud-africain *Xenopus laevis*. Develop. Biol., 24, 143-165.
- MALCOLM D.B. et SOMMERVILLE J., 1974 - The structure of chromosome-derived ribonucleoprotein in oocytes of *Triturus cristatus carnifex* (Laurenti). Chromosoma, 48, 137-158.
- MANCUSO V., 1972 - Ultrastructural aspects of the nucleus of *Ciona intestinalis* oocyte. Acta Embryol. exper., 1, 93-106.
- MARINOZZI V. et BERNHARD W., 1963 - Présence dans le nucléole de deux types de ribonucléoprotéines morphologiquement distinctes. Exptl Cell. Res., 32, 595-598.
- MARINOZZI V. et FIUME L., 1971 - Effects of  $\alpha$ -amanitin on mouse and rat liver cell nuclei. Exptl Cell. Res., 67, 311-322.
- MAULEON P., 1973 - Modification expérimentale de l'apparition et de l'évolution de la prophase méiotique dans l'ovaire d'embryon de brebis. Ann. Biol. ani. Bioch. Biophys., 13, 89-102.
- MAULEON P., 1975 - Importance des différentes périodes ovogénétiques dans la gonade femelle d'embryon de brebis ; contrôle du changement de comportement mitotique en méiotique. Ann. Biol. ani. Bioch. Biophys., 15, 725-738.

- MAYOR H.D., HAMPTON J.C. et ROSARIO B., 1961 - A simple method for removing the resin from epoxy embedded tissue. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 909-910.
- MAZABRAUD A., WEGNEZ M. et DENIS H., 1975 - Biochemical research on oogenesis RNA accumulation in the oocytes of Teleosts. *Develop. Biol.*, 44, 326-332.
- MEYER G.F., 1969 - Experimental studies on spermiogenesis in *Drosophila*. *Genetics suppl.* 61, 79-92.
- MEZQUITA C. et TENG C.S., 1977 - Studies on sex-organ development changes in nuclear and chromatin composition and genomic activity during spermatogenesis in the maturing rooster testis. *Biochem. J.*, 164, 99-112.
- MILLER F. et PALADE G.E., 1964 - Lytic activities in renal protein absorption droplets. An electron microscopical cytochemical study. *J. Cell Biol.*, 30, 519-552.
- MILLER O.L. Jr, 1966 - Structure and composition of peripheral nucleoli of Salamander oocytes. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 23, 53-66.
- MILLONIG G., BOSCO M. et GIAMBERTONE L., 1968 - Fine structure analysis of oogenesis in Sea Urchins. *J. Exp. Zool.*, 169, 293-314.
- MIRRE C. et STAHL A., 1978 a - Peripheral RNA synthesis of fibrillar centre in nucleoli of japanese quail oocytes and somatic cells. *J. Ultrastruct. Res.*, 64, 377-387.
- MIRRE C. et STAHL A., 1978 b - Ultrastructure and activity of the nucleolar organizer in the mouse oocyte during meiotic prophase. *J. Cell Sci.*, 31, 79-100.
- MONESI V., 1964 - Ribonucleic acid synthesis during mitosis and meiosis in the mouse testis. *J. Cell Biol.*, 22, 521-532.
- MONESI V., 1965 - Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse. RNA and Protein. *Exptl Cell. Res.*, 39, 197-224.
- MONNERON A. et BERNHARD W., 1969 - Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.*, 27, 266-288.
- MONNERON A. et MOULE Y., 1969 - Critical evaluation of specificity in electron microscopical radioautography in animal tissues. *Exptl Cell. Res.*, 56, 179-193.
- MOORE G.P.M., 1971 - DNA-dependent RNA synthesis in fixed cells during spermatogenesis in the mouse. *Exptl Cell. Res.*, 68, 462-465.

- MORENO DIAZ DE LA ESPINA S., RISUENO M.C., FERNANDEZ-GOMEZ M.E. et TANDLER C.J., 1976 - Ultrastructural study of the nucleolar cycle in meristematic cells of *Allium cepa*. J. Microscopie Biol. Cell., 25, 265-278.
- MOTT M.R. et CALLAN H.G., 1975 - An electron-microscope study of the lampbrush chromosomes of the newt *Triturus cristatus*. J. Cell Sci., 17, 241-261.
- MOYNE G., 1973 - Feulgen-derived techniques for electron microscopical cytochemistry of DNA. J. Ultrastruct. Res., 45, 102-123.
- MOYNE G., BERTAUX O. et PUVION E., 1975 - The nucleus of *Euglena*. I. An ultracytochemical study of the nucleic acids and nucleoproteins of synchronized *Euglena gracilis* Z. J. Ultrastruct. Res., 52, 362-376.
- MOYNE G., GARRIDO J. et BERNHARD W., 1974 - Localisation ultrastructurale de ribonucléoprotéines au niveau de chromosomes mitotiques. C. R. Acad. Sci., 178, 1385-1388.
- MOYNE G. et GARRIDO J., 1976 - Ultrastructural evidence of mitotic perichromosomal ribonucleoproteins in hamster cells. Exptl Cell. Res., 98, 237-247.
- MUCKENTHALER F.A., 1964 - Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in the grasshopper, *Melanopus differentialis*. Exptl Cell. Res., 35, 531-547.

## N

- NEBEL B.R. et COULON E.M., 1962 - Enzyme effects on pachytene chromosomes of the male pigeon evaluated with the electron microscope. Chromosoma, 13, 292-299.
- NICOLETTE J.A. et BABLER M., 1974 - The role of protein in the estrogen-stimulated *in vitro* RNA synthesis of isolated rat uterine nucleoli. Arch. Biochem. Biophys., 163, 263-305.
- NINNEMANN H. et EPEL B., 1973 - Inhibition of cell division by blue light. Exptl Cell. Res., 79, 318-326.

- OLD R.W., CALLAN H.G. et GROSS K.W., 1977 - Localization of histone gene transcripts in newt lampbrush chromosomes by *in situ* hybridization. J. Cell Sci., 27, 57-80.
- OLERT J., SAWATZKI G., KLING H. et GEBAUER J., 1979 - Cytological and histochemical studies on the mechanism of the selective silver staining of nucleolus organizer regions (NORs). Histochem., 60, 91-100.
- O'MALLEY B.W., ROOP D.R., LAI E.C., NORDSTROM J.L., CATTERALL J.F., SWANECK G.E., COLBERT D.A., TSAI M.-J., DUGAICZYK A. et WOO S.L.C., 1979 - The ovalbumin gene : organization, structure, transcription, and regulation. Recent Progress in hormone research, 35, 1-46.

## P

- PANNESE E., 1963 - Investigations on the ultrastructural changes of the spinal ganglion neurons in the course of axon regeneration and cell hypertrophy. I. Changes during axon regeneration. Z. Zellforsch., 60, 711-740.
- PAPSIDERO L.D. et BRASELTON J.P., 1973 - Ultrastructural localization of ribonucleoprotein on mitotic chromosomes of *Cyperus altermifolius*. Cytobiol., 8, 118-129.
- PARCHMAN L.G. et LIN K.C., 1972 - Nucleolar RNA synthesis during meiosis of lily microsporocytes. Nature New Biol., 239, 235-237.
- PARCHMAN L.G. et ROTH T.F., 1971 - Pachytene synaptonemal complexes and meiotic achiasmatic chromosomes. Chromosoma, 33, 129-145.
- PARDEE A.B., 1974 - A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 1286-1290.
- PENMAN S., ROSBASH M. et PENMAN M., 1970 - Messenger and heterogeneous nuclear RNA in HeLa cells : differential inhibition by cordycepin. Proc. Nat. Acad. Sci., 67, 1878-1885.
- PERRY R.P., 1963 - Selective effects of actinomycin D in the intracellular distribution of RNA synthesis in tissue culture cells. Exptl Cell. Res., 29, 400-406.
- PERRY R.P., 1965 - The nucleolus and the synthesis of ribosomes. Nat. Cancer Inst. Monogr. 18, 325-340.
- PETROV P. et SEKERIS C.E., 1971 - Early action of  $\alpha$ -amanitin on extranucleolar ribonucleoproteins, as revealed by electron microscopic observation. Exptl Cell. Res., 69, 393-401.

- PIATIGORSKY J. et TYLER A., 1967 - Radioactive labeling of RNAs of sea urchin eggs during oogenesis. Biol. Bull., 133, 229-244.
- PORCHET M., 1972 - Variation de l'activité endocrine des cerveaux en fonction de l'espèce, de sexe et du cycle vital chez quelques Néréidiens (Annélides Polychètes). Gen. comp. Endocrinol., 18, 276-283.
- PORCHET M., 1974 - Activité endocrine cérébrale chez les *Nereidae*. Données quantitatives, influence sur la teneur en glucides des ovocytes et du liquide coelomique, mécanisme régulateur de la sécrétion hormonale. Thèse Doct. Etat, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- PORCHET M., SPIK G. et DHAINAUT A., 1977 - Evolution des constituants glucidiques de l'ovocyte de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète) dans les conditions naturelles. I. Etude biochimique. Biol. Cellulaire, 28, 225-232.
- POUCHELET M. et ANTEUNIS A., 1979 - Nucleolar fibrillar centre and oxidized Diaminobenzidine staining. Biol. Cellulaire, 35, 133-136.
- POUCHELET M., GANSMÜLLER A., ANTEUNIS A. et ROBINEAUX R., 1975 - Mise en évidence en microscopie électronique, dans les noyaux interphasiques des cellules L 929, de filaments de DNA associés aux zones fibrillaires RNA des nucléoles. C. R. Acad. Sci., 280, 2461-2463.
- PRESCOTT D.M., 1976 - Reproduction of eukaryotic cells. Academic Press, New York.
- PUKKILA P.J., 1975 - Identification of the lampbrush loops which transcribe 5 S ribosomal RNA in *Notophthalmus (Triturus) viridescens*. Chromosoma, 53, 71-89.
- PUVION E., MOYNE G. et BERNHARD W., 1976 - Action of 3' deoxyadenosine (Cordycepin) on the nuclear ribonucleoproteins of isolated liver cells. J. Microscopie Biol. Cell., 25, 17-32.

## R

- RAVEN C.P., 1961 - Oogenesis : the storage of developmental information. Pergamon Press, London.
- RECHER L., WHITESCARVER J. et BRIGGS L., 1969 - The fine structure of a nucleolar constituent. J. Ultrastruct. Res., 29, 1-15.

- REVERBERI G., 1972 - The fine structure of the ovaric egg of *Dentalium*. *Acta Embryol. Exp.*, 1, 135-136.
- REYNOLDS E.S., 1963 - The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 208-213.
- RISUENO C., FERNANDEZ-GOMEZ E. et GIMENEZ-MARTIN G., 1973 - Nucleoli under the electron microscope by silver impregnation. *Mikroskopie*, 29, 292-299.
- RIVELIS C., PREPIN J., VIGIER B. et JOST A., 1976 - Prophase méiotique dans les cellules germinales de l'ébauche ovarienne de rat cultivée *in vitro* en milieu an hormonal. *C. R. Acad. Sci.*, 282, 1429-1432.
- ROSE R.J., SETTERFIELD G. et FOWCKE L.C., 1972 - Activation of nucleoli in tuber slices and the function of nucleolar vacuoles. *Exptl Cell Res.*, 71, 1-16.
- ROTH T., 1973 - Replication during meiosis : Identification of gene functions required for premeiotic DNA synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70, 3087-3091.
- RUE G. et BIERNE J., 1978 - Effet du facteur cérébral gonado-inhibiteur sur le métabolisme des cellules sexualisées germinales et somatiques du Némertien *Lineus ruber* Müller. *C. R. Acad. Sci.*, 286, 293-296.
- RUTHMANN A., 1964 - Zellwachstum und RNS-synthese im Nährzellverband von *Ophiotrocha puerilis*. *Z. Zellforsch.*, 63, 816-829.

S

- SALPETER M.M. et BACHMANN L., 1964 - Autoradiography with the electron microscope. A procedure for improving resolution, sensitivity, and contrast. *J. Cell Biol.*, 22, 469-477.
- SCHEER U., TRENDELENBURG M.F. et FRANKE W.W., 1976 - Regulation of transcription of genes of ribosomal RNA during amphibian oogenesis. A biochemical and morphological study. *J. Cell Biol.*, 69, 465-489.
- SCHJEIDE O.A., NICHOLLS T. et GRAHAM G., 1972 - Annulate lamellae and chromatoid bodies in the testes of a cyprinid fish (*Pimephales notatus*). *Z. Zellforsch.*, 129, 1-10.
- SCHMID W. et SEKERIS E., 1973 - Possible involvement of nuclear DNA-like RNA in the control of ribosomal RNA synthesis. *Biochem. Biophys. Acta*, 312, 549-554.
- SCHOEFL G.I., 1964 - The effect of actinomycin D on the fine structure of the nucleolus. *J. Ultrastruct. Res.*, 10, 224-243.

- SCHWARZACHER H.G., MIKELSAAR A.V. et SCHNEDL W., 1978 - The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions : electron and light microscopic studies on human cells in interphase, mitosis and meiosis. *Cytogenet. Cell Genet.*, 20, 24-39.
- SEKERIS C.E. et SCHMID W., 1972 - Action of  $\alpha$ -amanitin *in vivo* and *in vitro*. *FEBS Lett.* 27, 41-45.
- SHEID B., 1978 - Morphological effects of estrogen on female rat liver nucleolus. *Experientia*, 34, 877-878.
- SHERIDAN W.F. et STERN H., 1967 - Histones of meiosis. *Exptl Cell. Res.*, 45, 323-335.
- SHILO V., SIMCHEN G. et SHILO B., 1978 - Initiation of meiosis in cell cycle initiation mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Exptl Cell Res.*, 112, 241-248.
- SIEV M., WEINBERG B. et PENMAN S., 1969 - The selective interruption of nucleolar RNA synthesis in HeLa cells by cordycepin. *J. Cell Biol.*, 41, 510-520.
- SIMARD R., 1970 - The Nucleus : Action of chemical and physical agents. *Int. Rev. Cytol.*, 28, 169-212.
- SIMCHEN G., PINON R. et SALTS Y., 1972 - Premeiotic DNA synthesis, readiness and commitment. *Exptl Cell. Res.*, 75, 207-218.
- SINA J.F. et CHIN B., 1978 - Cadmium modification of nucleolar ultra-structure and RNA synthesis in *Physarum polycephalum*. *Toxicol. applied Pharma.* 43, 449-460.
- SIRTORI C. et BOSISIO-BESTETTI M., 1967 - Nucleolar changes in KB tumor cells infected with *Herpes Simplex* virus. *Cancer Res.*, 27, 367-376.
- SMETANA K. et BUSCH H., 1966 - Studies on staining and localization of acidic nuclear protein in the Walker 256 Carcinoma. *Cancer Res.*, 26, 331-337.
- SMETANA K., FREIREICH E.J. et BUSCH H., 1968 - Chromatin structures in ring-shaped nucleoli of human lymphocytes. *Exptl Cell. Res.*, 52, 112-128.
- SMITH J.A. et MARTIN L., 1973 - Do cells cycle ? *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70, 1263-1267.
- SÖDERSTRÖM K.O. et PARVINEN M., 1976 a - RNA synthesis in different stages of rat seminiferous epithelial cycle. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 5, 181-199.

- SÖDERSTRÖM K.O. et PARVINEN M., 1976 b - Incorporation of [<sup>3</sup>H]uridine by the chromatoid body during rat spermatogenesis. *J. Cell Biol.*, 70, 239-246.
- SOUDEK D., 1960 - The correlation between the growth of the cell and nucleolar secretion in *Basidiobolus ranasum* eidam. *Exptl Cell. Res.*, 20, 447-452.
- STEFANINI M., DEMARTINO C., D'AGOSTINO A., AGRESTINI A. et MONESI V., 1974 - Nucleolar activity of rat primary spermatocytes. *Exptl Cell. Res.*, 86, 166-170.
- STERN H. et HOTTA Y., 1968 - Biochemical studies of male gametogenesis in Liliaceous plants. *Current Topics Develop. Biol.*, 3, 37-63.
- STERN H. et HOTTA Y., 1969 - Biochemistry of meiosis. *In* : "Handbook of Molecular Cytology". A. Lima De Faria ed., North Holland Publ. Comp., Amsterdam, 520-539.
- STERN H. et HOTTA Y., 1977 - Biochemistry of meiosis. *Phil. Trans. Roy. Soc. London, ser. B, Biol. Sci.*, 277, 277-294.
- STOCKERT J.C., FERNANDEZ-GOMEZ M.E., SOGO J.M. et LOPEZ-SAEZ J.F., 1970 - Nucleolar segregation by adenosin 3'-deoxyriboside (Cordycepin) in root-tip cells of *Allium cepa*. *Exptl Cell. Res.*, 59, 85-89.

T

- TATA J.R., 1970 - Regulation of protein synthesis by growth and developmental hormones. *In* : "Biochemical action of hormones". G. Litwack ed., Acad. Press, N.Y., Vol. 1, 83-133.
- TATA J.R., 1980 - The action of growth and developmental hormones. *Biol. Rev.*, 55, 285-319.
- TATA J.R., HAMILTON M.J. et SHIELDS D., 1972 - Effects of  $\alpha$ -amanitin *in vivo* on RNA polymerase and nuclear RNA synthesis. *Nature*, 238, 161-164.
- TATA J.R. et SMITH D.F., 1979 - Vitellogenesis. Versatile model for hormonal regulation of gene expression. *Recent progress in hormone Res.*, 35, 47-96.
- TERAO K., SAKAKIBARA Y., YAMAZAKI M. et MIYAKI K., 1971 - Annular nucleolus in hepatocyte of chicken embryo induced by Aflatoxin B<sub>1</sub>. *Exptl Cell. Res.*, 66, 81-89.

- THIERY J.-P., 1967 - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie*, 6, 987-1018.
- THOMAS C., 1972 - Correlation between ultrastructural aspect of nucleoli and inhibition of ribosomal RNA synthesis in *Xenopus laevis* oocytes. *Exptl Cell. Res.*, 74, 547-551.
- TOBEY R.A., PETERSEN D.F. et ANDERSON E.C., 1971 - Biochemistry of G<sub>2</sub> and mitosis. *In* : "The cell cycle and cancer" R. Baserga ed., Dekker, NY, 309-353.
- TOURY R., CLEROT J.-C. et ANDRE J., 1977 - Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons Téléostéens Cyprinidés. IV. Analyse biochimique des constituants du "ciment" intermitochondrial isolé. *Biol. Cellulaire*, 30, 225-232.
- TRES L.L., 1975 - Nucleolar RNA synthesis of meiotic prophase spermatocytes in the human testis. *Chromosoma*, 53, 141-152.
- TRES L.L. et KIERSZENBAUM A.L., 1977 - Premeiotic and meiotic prophase RNA synthesis in human testes. *In* : "Testis in normal and infertile men" P. Troen et H.R. Nankin eds, Raven Press, NY, 9-24.
- TURKINGTON R.W., 1972 - Multiple hormonal interactions. The mammary gland. *In* "Biochemical actions of hormones", G. Litwack ed., Acad. Press, N.Y., Vol. 2, 55-80.

## U

- UTAKOJI T., 1966 - Chronology of nucleic acid synthesis in meiosis of the male Chinese Hamster. *Exptl Cell. Res.*, 42, 585-596.

## V

- VAN GANSEN P., 1979 - Le vieillissement cellulaire *in vitro*. *Année Biol.*, 18, 147-177.
- VAN GANSEN P. et SCHRAM A., 1972 - Evolution of the nucleoli during oogenesis in *Xenopus laevis* studied by electron microscopy. *J. Cell Sci.*, 10, 339-367.

- VAN GANSEN P., THOMAS C. et SCHRAM A., 1976 - Nucleolar activity and RNA metabolism in previtellogenic and vitellogenic oocytes of *Xenopus laevis*. *Exptl Cell Res.*, 98, 111-119.
- VAZQUEZ-NIN G. et BERNHARD W., 1971 - Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. *J. Ultrastruct. Tes.*, 36, 842-860.
- VOETS R., LAGROU A., HILDERSON H., VANDESSEL G. et DIERIK W., 1979 - RNA synthesis in isolated bovine thyroid nuclei and nucleoli :  $\alpha$ -amanitin effect, a hint to the existence of a specific regulatory system. *Hoppe Seyler's Zeit. Physiol. Chem.*, 360, 1271-1284.

## W

- WATSON M.L., 1962 - Observations on a granule associated with chromatin in the nuclei of cells of rat and mouse. *J. Cell Biol.*, 13, 162-167.
- WEAKLEY B.S., 1971 - Basic protein and ribonucleic acid in the cytoplasm of the ovarian oocyte in the golden Hamster. *Z. Zellforsch.*, 112, 69-84.
- WEGNEZ M., DENIS H., MAZABRAUD A. et CLEROT J.-C., 1978 - Biochemical research on oogenesis. RNA accumulation during oogenesis of the dogfish *Scyliorhinus caniculus*. *Develop. Biol.*, 62, 99-111.
- WEISS M. et MEYER J., 1972 - Comparison of the effects of Cox Sackievirus A9 and of Actinomycin D on the nucleolar ultrastructure of monkey kidney cells. *J. Ultrastruct. Res.*, 38, 411-419.
- WESTERGAARD M. et VON WETTSTEIN D., 1970 - Studies on the mechanism of crossing over. IV. The molecular organization of the synaptonemal complex in *Neotiella* (Cooke) *succardo* (Ascomycetes). *C. R. Trav. Lab. Carlsberg* 37, 239-268.
- WILCOKSON J., 1973 - The use of sodium perchlorate in deproteinization during the preparation of nucleic acids. *Biochem. J.*, 135, 559-561.
- WISSE E. et TATES A.D., 1968 - A gold latensification-elon ascorbic acid developer for Ilford L 4 emulsion. *Electron Microscop. Proc. 4th Europ. Reg. Conf.*, Rome, 465-466.

- WOLFF E. et HAFFEN K., 1952 - Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires *in vitro*. Texas Rep. Biol. Med., 10, 463-472.
- WOLFE J., 1976 - G<sub>1</sub> arrest and the division/conjugation decision in *Tetrahymena*. Develop. Biol., 54, 116-126.

Y

- YAMAMOTO K., 1966 - The origin and significance of the amphinucleolus. Studies on the ovocytes in *Limax flavus*. J. Nora. Red. Ass., 17; 497-535.

