

50376

1983

155-1

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376

1983

155-1

N° d'ordre 1069

THÈSE

Présentée à l'Université des Sciences et Techniques de Lille
pour obtenir le grade de Docteur de 3ème cycle
en Biologie et Physiologie Animales

par

RAJAA BENIOURI

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA SPERMATOGENÈSE

ET DE SON DÉTERMINISME CHEZ LES MYRIAPODES CHILOPODES



Soutenue le 4 juillet 1983 devant la Commission d'Examen

Président : R. JOLY
Rapporteur : M. DESCAMPS
Examineurs : A. DHAINAUT
P. PERSONNE

SOMMAIRE

	page
INTRODUCTION	1
MATÉRIEL ET TECHNIQUES	2
A - Microscopie photonique	2
B - Microscopie électronique	3
1°) A transmission	3
2°) A balayage	4
CHAPITRE I - ETUDE CYTOLOGIQUE COMPARÉE DES CELLULES GERMINALES MÂLES CHEZ LES MYRIAPODES CHILOPODES	
I - Lithobiomorphes	5
A - Anatomie de l'appareil génital	5
B - Etude cytologique des cellules germinales	5
1°) La croissance spermatocytaire chez <i>L. crassipes</i>	5
2°) Le spermatozoïde	6
3°) Etude en cryofracture de la croissance spermatocytaire chez <i>L. forficatus</i>	7
C - Discussion	8
II - Scolopendromorphes	10
A - Anatomie de l'appareil génital mâle	10
B - Etude cytologique des cellules germinales	10
1°) Spermatogonies et spermatocytes	10
2°) Spermatozoïdes	11
C - Discussion	13
III - Géophilomorphes	14
A - Anatomie de l'appareil génital	14
B - Etude cytologique des cellules germinales	14

1°) Spermatogonies et croissance spermatocytaire chez <i>Necrophloeophagus longicornis</i> , <i>Scolioplanes acuminatus</i> et <i>Haplophilus subterraneus</i> .	14
2°) Spermatozoïdes	16
C - Discussion	19
IV - Discussion	21
A - Croissance spermatocytaire	21
B - Spermatozoïdes	22

CHAPÎTRE II - MISE EN ÉVIDENCE EXPÉRIMENTALE DU RÔLE DES CELLULES DES CLOISONS DE LOGETTES DANS LA PHYSIO- LOGIE TESTICULAIRE.

I - Introduction	25
II - Matériel et techniques	25
III - Résultats	27
A - Rappels anatomiques	27
B - Pénétration de traceurs dans le testicule	27
C - Les jonctions et contacts intercellulaires	28
IV - Discussion	29

CHAPÎTRE III - INFLUENCE DE DIVERSES INTERVENTIONS EXPÉRIMENTALES SUR LA STRUCTURE ET LE MÉTABOLISME DU SPERMATOCYTE

I - Introduction	34
II - Matériel et techniques	34
A - Structure de la membrane	34

B - Corrélation entre taux d'ecdystéroïdes et croissance spermatocytaire	35
III - Résultats	
A - Structure de la membrane	36
1) Terminologie	36
2) Etude de la répartition des PIM	37
B - Corrélation entre taux d'ecdystéroïdes et croissance spermatocytaire	38
IV - Discussion	40

CHAPITRE IV - MISE EN ÉVIDENCE EXPÉRIMENTALE DE L'ACTION
DE DIFFÉRENTS NEUROTRANSMETTEURS SUR LA CROISSANCE
SPERMATOCYTAIRE

I - Introduction	43
II - Matériel et techniques	43
A - Etude autoradiographique	43
B - Etude ultrastructurale	46
III - Résultats	46
A - Série hivernale	46
1) GABA et Picrotoxine	46
2) 5HT et Imipramine	49
3) Dopamine et phénylhydrazine	52
B - Série printanière	52
1) GABA et Picrotoxine	55
2) 5HT et réserpine	55
3) Dopamine et phénylhydrazine	58

IV - Discussion 59

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

I - Etude ultrastructurale des cellules germinales et des gamètes 61

II - Rôle de différents facteurs sur la perméabilité testiculaire
et le métabolisme des spermatocytes 61

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

L'étude de la spermatogenèse a fait l'objet de nombreux travaux dans toutes les classes animales. Chez les Myriapodes Chilopodes les premières observations ont été entreprises par GILSON (1884) et PRENAUT^{MT} (1887). Elles furent poursuivies entre autres auteurs par BOUIN et ses collaborateurs (1899 à 1920), NATH (1925) et GOLANSKI (1929). La spermiogenèse et la structure des spermatozoïdes ont été envisagées par TUZET et MANIER (1951, 1954) et par NATH (1957).

Des études ultrastructurales ont ensuite été effectuées chez différentes espèces de Chilopodes : *Geophilus linearis* Koch. (HORSTMANN, 1968), *Lithobius forficatus* L. (DESCAMPS, 1971, 1972 ; CAMATINI et al., 1974 ; REGER et al., 1980), *Scutigera coleoptrata* L. (CAMATINI et al., 1977), *Himantarium gabrielis* L. (COTELLI et al., 1978), *Scolopendra morsitans* (CAMATINI et al., 1979).

Nous nous sommes proposés dans un premier chapitre, d'étudier la cytologie ultrastructurale des cellules germinales (spermatogonies et spermatoocytes) et des gamètes chez d'autres espèces de Chilopodes afin d'avoir une base solide pour des études physiologiques.

Peu de travaux sont relatifs au déterminisme de la spermatogenèse chez les Myriapodes. Les seules recherches expérimentales, effectuées chez *L. forficatus*, sont dues à DESCAMPS (1974 à 1981). Dans un second chapitre, nous avons envisagé le rôle des cellules des cloisons des logettes testiculaires, cellules de soutien qui peuvent être rapprochées des cellules de Sertoli des Vertébrés et qui n'ont jusqu'alors fait l'objet d'aucune recherche chez les Myriapodes. Leur rôle a été étudié dans les conditions normales et après injection de 20 OH-ecdysone.

L'influence de cette hormone sur le métabolisme spermatocytaire et sur la structure de la membrane a été ensuite envisagée respectivement chez *L. crassipes* et *L. forficatus*. Les corrélations entre le taux d'ecdystéroïdes totaux et l'activité de synthèse ont été précisées.

Dans le dernier chapitre, nous avons étudié l'influence sur la croissance spermatocytaire des neurotransmetteurs qui s'étaient révélés avoir une action sur l'activité électrique cérébrale de *L. forficatus* (DESCAMPS et LASSALLE, 1983).

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Nos recherches ont été effectuées sur des individus des trois ordres de Chilopodes que l'on rencontre dans le nord de la France. Une espèce méditerranéenne *Scolopendra cingulata* Latr. a également été étudiée (Tableau I).

Tableau I : Espèces étudiées

Lithobiomorphes	Scolopendromorphes	Geophilomorphes
<i>Lithobius crassipes</i> L. Koch	<i>Cryptops hortensis</i> Leach	<i>Scoliopterus acuminatus</i> Leach
<i>Lithobius forficatus</i> L.	<i>Cryptops savignyi</i> Leach	<i>Geophilus carpophagus</i> Leach
	<i>Scolopendra cingulata</i> Latr.	<i>Necrophloeophagus longicornis</i> Leach
		<i>Haplophilus subterraneus</i> Leach.

Nos observations ont fait appel aux techniques de la microscopie photonique et de la microscopie électronique.

A - Microscopie photonique

Deux types de fixation ont permis l'étude cytologique :

1°) Fixation de frottis : le testicule et les vésicules séminales sont prélevés, placés dans du Ringer [EPHRUSSI et BEADLE (1936) : eau distillée 1000 CC, NaCl 7,5 g, KCl 0,35 g, Ca Cl₂ 0,21 g], puis écrasés entre lame et lamelle. Les frottis sont disposés dans un récipient saturé de vapeurs de formol (30 mn), puis immergés dans du formol à 4 % (1 heure) selon la méthode employée par WALKER et Mac GREGOR (1968). Ils sont ensuite colorés par l'acide périodique-Schiff (PAS).

2°) Pour l'étude des organes en place, la moitié postérieure de l'animal est fixée par le Bouin-Hollande (sans acide acétique). Ces pièces sont incluses dans la paraffine. Les coupes parasagittales (6 à 7 µm d'épaisseur) sont colorées par les méthodes classiques de l'histologie : hématoxyline de GROAT associée au picro-indigo-carmin, Azan, Trichromique

de MASSON, variante de GABE, fuchisine paraldéhyde de GABE, variante de CLARK (1955), acide périodique Schiff.

B - Microscopie électronique

1°) A transmission

a) Techniques générales

Les testicules et les vésicules séminales sont fixés au glutaraldéhyde (3 % ou 6,25 % selon le cas) dans un tampon monophosphate de Na/diphosphate de Na 0,2 M à pH 7,2, puis post-fixés par l'acide osmique à 1 % dans le même tampon ; ils sont inclus dans l'araldite. Les coupes fines effectuées à l'ultramicrotome Porter Blum ou L.K.B. (Ultratome 4801 A) sont contrastées selon la méthode de REYNOLDS (1963), après une "coloration" par l'acétate d'uranyle en solution alcoolique.

b) Techniques cytochimiques

La mise en évidence des polysaccharides est effectuée par la technique à la thiosemicarbazide (TSC) protéinate d'argent [Méthode de SELIGMAN modifiée par THIERY (1967)]. Plusieurs temps d'incubation dans la TSC ont été employés : 30-40 mn, 24 heures, 72 heures.

c) Cryofracture

Cette étude, réalisée sur des répliques confectionnées dans le laboratoire du Dr G. TORPIER (Unité INSERM n° 167, Institut Pasteur de Lille), ne concerne que le Lithobiomorphe *L. forficatus*.

Les testicules sont fixés au glutaraldéhyde à 6,25 % dans un tampon cacodylate de Na 0,1 M à pH 7,2 ; après rinçage dans ce même tampon les échantillons sont immergés dans le glycérol 30 %. Ils sont ensuite congelés dans l'azote fondant, installés sur des supports en or et fracturés sous vide (10^{-6} torr) à -150°C dans un appareil de cryofracture BALZERS BAF 380.

Les surfaces de fracture sont recouvertes par un ombrage d'environ 2 nm de platine-carbone dirigé sous un angle de 30° . Les répliques sont consolidées par une couche de carbone (20 nm) puis ramenées à la température ambiante, nettoyées dans l'hypochlorite de sodium, lavées à l'eau distillée et montées sur grilles en cuivre.

Les grilles sont examinées au microscope électronique Siemens El miskop-IA, Hitachi HUIIE ou Jeol JEM 100.CX.

2°) A balayage

Cette méthode a été utilisée pour l'étude des spermatozoïdes. Les faisceaux de spermatozoïdes sont prélevés dans le testicule ou dans les vésicules séminales, puis sont fixés par le glutaraldéhyde à 3 % dans un tampon monophosphate de Na/diphosphate de Na 0,2 M à pH 7,2 (3 heures), puis déshydratés. Après lavage, les pièces sont lyophilisées et métallisées sous vide par un mélange platine-paladium. Les préparations sont étudiées au Stereoscan MK II a (Cambridge) ou I.S. I super III A.

Les diverses techniques utilisées pour l'étude expérimentale seront exposées dans les chapitres correspondants.

CHAPITRE I

ETUDE CYTOLOGIQUE COMPAREE DES CELLULES
GERMINALES MALES CHEZ LES MYRIAPODES CHILOPODES

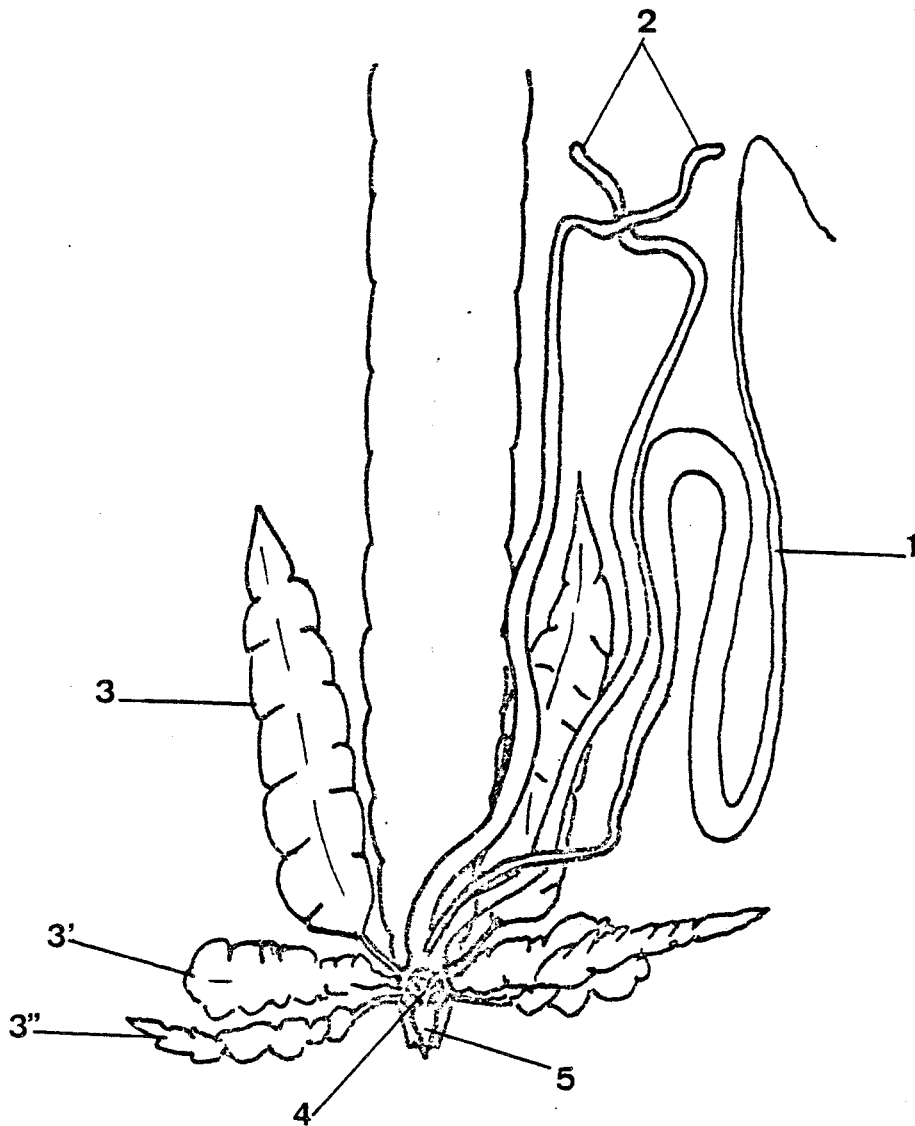


Fig. 1 - *Lithobius* sp : appareil génital mâle, vue dorsale ;
 1 : testicule ; 2 : vésicules séminales ; 3, 3' et 3'' :
 glandes accessoires ; 4 : arcus genitalis ; 5 : ductus
 ejaculatorius.

D'après DEMANGE (1968) modifié.

Nous étudierons successivement les Lithobiomorphes, les Scolopendromorphes et les Geophilomorphes.

I - Lithobiomorphes

A - Anatomie de l'appareil génital

L'étude de l'appareil génital mâle, abordée par FABRE (1855) a été complétée par PRUNESCO (1964) : le testicule, impair, médian, est flanqué d'une paire de vésicules séminales et de trois paires de glandes accessoires (Fig. 1).

B - Etude cytologique des cellules germinales

1°) La croissance spermatocytaire chez *L. crassipes*

La spermatogonie est une cellule d'environ 9 à 10 μm de diamètre (Pl. I, 1 et 2). Le noyau subsphérique est volumineux (4 à 5 μm de diamètre). Le cytoplasme est peu abondant et renferme des mitochondries peu nombreuses et de petite taille (de 0,4 à 0,5 μm) ; leurs crêtes sont transversales et la matrice est dense aux électrons. Le réticulum endoplasmique est réduit.

Au cours de la phase de croissance spermatocytaire, le cytoplasme et le noyau augmentent considérablement de volume. La cellule peut atteindre 60 à 70 μm , le diamètre du noyau 25 à 30 μm , celui du nucléole 6 à 8 μm . La dispersion de la chromatine dans le nucléoplasme augmente avec l'accroissement de taille nucléaire. Le nucléole, tout en augmentant de volume, va présenter des figures de bourgeonnement (Pl. I, 3) qui peuvent devenir très nombreuses (Pl. II, 1). La présence de matériel fibrillogranulaire dans la région périnucléaire (Pl. I, 4) atteste d'un échange nucléocytoplasmique de ribonucléoprotéines (FRANKE, 1970). La taille et le nombre de mitochondries augmentent parallèlement avec l'accroissement cellulaire ; l'espace intracristal se dilate (Pl. II, 1 et 3) et constitue, selon la définition d'ANDRE (1962), la pseudo-matrice dont l'importance va augmenter jusqu'à la fin de la croissance. Les contrastes sont inversés et l'espace matriciel est rejeté à la périphérie de la mitochondrie.

De nombreux dictyosomes apparaissent au cours de la phase de croissance spermatocytaire. En forme de fer à cheval, ils ont une taille très importante (de 3 à 4 μm) (Pl. I, 5) et peuvent comporter jusqu'à 60 saccules.

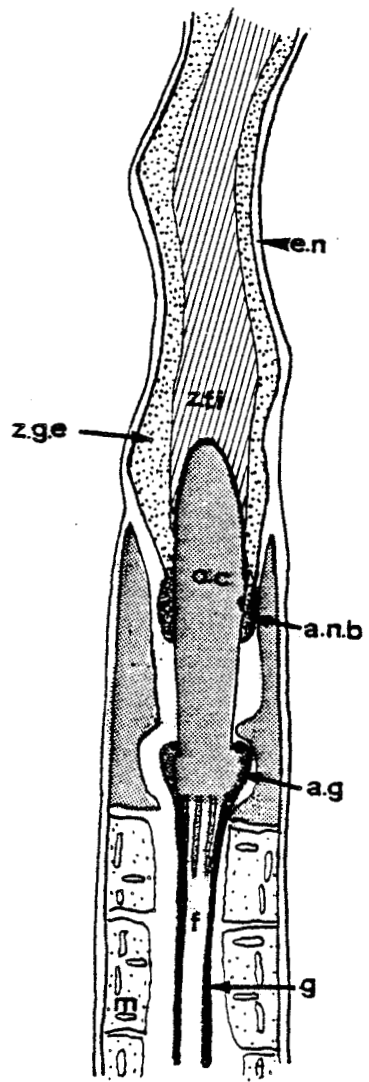


Fig. 2 - Représentation schématique de la zone d'attache du spermatozoïde de *Lithobius*.



Chaque dictyosome est en relation étroite avec le réticulum agranulaire. Les vésicules (environ 90 nm de diamètre) qui se détachent des extrémités des saccules golgiens, sont remplies de matériel dense. Elles correspondent à la forme primaire de la sécrétion golgienne.

Les vésicules de sécrétion se répartissent dans tout le cytoplasme soit régulièrement, soit par paquets.

Une fraction importante de la sécrétion se localise à la périphérie de la cellule (Pl. II, 2). Le réticulum endoplasmique, granulaire ou agranulaire, n'a qu'un développement moyen.

2°) Le spermatozoïde

Les spermatozoïdes de *Lithobius crassipes* sont groupés en longs faisceaux filiformes aussi bien dans le testicule que dans les vésicules séminales (Pl. III, 1). Le spermatozoïde est très long (environ 2 ^{mm}mm). Il se compose d'une tête comprenant le noyau et l'acrosome, et d'une très longue queue.

* Le noyau est spiralé, le pas moyen étant de 3 à 3,5 μm (Pl. III, 2).

La partie axiale du noyau est constituée par des fibrilles longitudinales d'environ 4 ^{mm}mm de diamètre. Cet axe fibrillaire décrit une hélice peu prononcée. Nous avons pu constater, sur certaines coupes, une différence de densité électronique entre les filaments (Pl. III, 5). La présence ou non du matériel granulaire autour de la zone centrale fibrillaire permet de distinguer trois régions dans le noyau :

a) La région postérieure est caractérisée par la présence d'une spire saillante de matériel granulaire. La largeur maximale du noyau est de 0,8 μm (Pl. III, 3).

b) La région ^{mm}moyenne ne montre plus qu'une mince zone granulaire externe (40 à 70 ^{mm}mm). Le diamètre du noyau n'est plus que de 0,32 μm (Pl. III, 4).

c) La région antérieure est dépourvue de matériel granulaire. Le diamètre n'atteint plus que 0,27 μm (Pl. III, 5 et 6).

* La zone d'attache est placée à la partie postérieure du noyau. Elle est constituée par une pièce en forme d'ogive (Pl. IV, 1 ; fig. 2). La partie antérieure de cet organite est entourée d'un bourrelet nucléaire ; sa partie basale est enveloppée par des expansions des gaines flagellaires.

* La queue du spermatozoïde, dont le diamètre est d'environ 1,2 μm , est constituée d'une double hélice mitochondriale entourant une zone cytoplasmique hyaline au centre de laquelle se trouve le flagelle.

Le manchon est constitué de deux hélices principales, elles-mêmes subdivisées en deux hélices secondaires (Pl. IV, 2). Les hélices principales sont réunies par une sorte de ciment dans lequel on peut observer des granules denses (vraisemblablement du glycogène) (Pl. IV, 2).

La liaison entre hélices secondaires est beaucoup plus étroite (Pl. IV, 2) ; il existe une sorte d'imbrication (L_2) entre les mitochondries des deux hélices secondaires. Des ponts transversaux (Pl. IV, 2) renforcent le manchon mitochondrial.

Le flagelle a une structure classique : neuf doublets périphériques et un doublet central. Il est entouré par deux gaines constituées chacune par deux feuillets denses séparés par un feuillet clair. Les deux gaines présentent une striation périodique ; seule celle de la gaine interne est facilement mise en évidence (Pl. IV, 2). On peut observer un système de vésicules dans la lumière du manchon mitochondrial ; il dérive vraisemblablement du réticulum endoplasmique (DESCAMPS, 1976).

La cohésion des faisceaux de spermatozoïdes est assurée par un ensemble de tubules qui, comme chez *Lithobius forficatus* (DESCAMPS, 1972), relie les spermatozoïdes entre eux.

3°) Etude en cryofracture de la croissance spermatocytaire chez *L. forficatus*.

Afin d'aborder l'étude de la membrane du spermatocyte et ses éventuelles variations avec l'âge de la cellule ou sous l'influence de diverses interventions expérimentales, il était indispensable d'étudier la croissance spermatocytaire sur des répliques de cryofracture.

a) Types et stades cellulaires

La distinction entre cellules somatiques (cellules des cloisons de logettes testiculaires) et cellules germinales (spermatogonies et spermatocytes) se fait extrêmement facilement (cf. Pl. IV, 3 ; Pl. VI, 1), les morphologies de ces différents types cellulaires étant très différentes l'une de l'autre.

L'examen du contenu cytoplasmique des cellules germinales permet de corrélérer aisément la morphologie ou l'abondance en organites à un stade

de la croissance spermatocytaire :

- Stade jeune (diamètre inférieur à 50 μm). Les mitochondries sont peu abondantes et le réticulum endoplasmique est souvent caractérisé par des citernes disposées parallèlement les unes aux autres (Pl. IV, 3 et 4).

- De 50 à 80 μm de diamètre. Ces cellules se reconnaissent à l'abondance et à la dimension des mitochondries ainsi qu'aux nombreux dictyosomes (Pl. V, 1 et 2). La structure de ces derniers a pu être précisée : en effet, la fenestration des saccules dessine un système en hexagone centré (Pl. VII, 1). Les pores nucléaires sont également nombreux, en rapport avec l'importance des échanges nucléocytoplasmiques (Pl. VII, 2).

- En fin de croissance (diamètre supérieur à 80 μm). Les mitochondries, sensiblement sphériques, sont nombreuses d'une manière générale le cytoplasme paraît "plein" (Pl. VI, 1 et 2).

b) Jonctions entre cellules adjacentes.

La cryofracture a permis de mettre en évidence, entre le spermatocyte et la cellule de logette adjacente, la présence de jonctions "gap" ; elles sont caractérisées par une très grande densité de particules intramembranaires (PIM) disposées en macula (Pl. VII, 3).

C - Discussion

Nous envisagerons successivement les différentes étapes de la spermatogenèse chez *Lithobius crassipes* et comparerons nos observations avec celles réalisées chez *Lithobius forficatus* (DESCAMPS, 1976).

- Spermatogonies et spermatocytes.

La pauvreté en organites des spermatogonies paraît générale dans toute la lignée animale ; par contre, l'augmentation énorme de volume cytoplasmique au cours de la croissance spermatocytaire semble un caractère constant de la spermatogenèse des Chilopodes.

La structure nucléaire est, chez les deux espèces, caractérisée par la dispersion des grains chromatinien. De même, les nucléoles ont des structures très semblables et présentent de nombreuses figures de bourgeonnement au cours de la phase de croissance cellulaire.

Tout comme chez *L. forficatus*, le chondriome se développe considérablement pendant la croissance spermatocytaire, et la maturation des mitochondries s'effectue par apparition de pseudomatrice dans l'espace

intracristal. Ce type d'évolution mitochondriale est comparable à celui observé et décrit par ANDRE (1960, 1962) dans le spermatoocyte du rat.

Le nombre de dictyosomes augmente également de façon importante. Les saccules sont plus nombreux et la sécrétion golgienne très abondante. Les images observées rappellent celles obtenues chez *L. forficatus* après activation des spermatoocytes, soit par électrostimulation de la *pars intercerebralis* ou ablation des glandes cérébrales (DESCAMPS, 1978) soit par injection de 20-OH ecdysone (DESCAMPS, 1981).

Tous les caractères nucléaires et cytoplasmiques du spermatoocyte de *L. crassipes* tendent à prouver qu'il s'agit d'une cellule à métabolisme de synthèse élevé. Il faut noter que le diamètre du spermatoocyte en fin de croissance (70 μ m) est, compte-tenu de la taille des animaux, comparativement plus grand que chez *L. forficatus*.

- Spermatozoïdes.

D'après les images que nous avons pu observer, la spermiogénèse de *L. crassipes* semble suivre le même schéma que celui décrit chez *L. forficatus* (DESCAMPS, 1976).

Le spermatozoïde de *L. crassipes*, composé selon la classification de FAWCETT (1965) d'une tête, d'une pièce intermédiaire et d'une courte pièce terminale présente de grandes analogies structurales avec celui de *L. forficatus* (DESCAMPS, 1972).

Chez les deux espèces, en effet, le noyau est constitué de deux types distincts de matériel, fibrillaire dans la zone axiale et granulaire dans la zone périphérique.

L'organite de connexion, en forme d'ogive chez les deux espèces, a été assimilé à la plaque basale des spermatozoïdes des Mammifères (HORSTMANN, 1968). La structure générale de la pièce intermédiaire est la même : les gaines flagellaires sont nettement séparées et ont chacune l'aspect d'une membrane unitaire. Le manchon mitochondrial est formé de deux hélices principales, elles-mêmes subdivisées en deux hélices secondaires.

Notre étude met donc en évidence une grande analogie entre les cellules germinales de différents Lithobiomorphes. Cependant, des différences spécifiques existent, portant sur la dimension des cellules ou l'abondance plus ou moins grande des organites ou des sécrétions.

- Cryofracture (*L. forficatus*)

Notre étude en cryofracture a permis de compléter et de préciser les travaux antérieurs de cytologie ultrastructurale (DESCAMPS, 1972), en particulier, en ce qui concerne la configuration spatiale

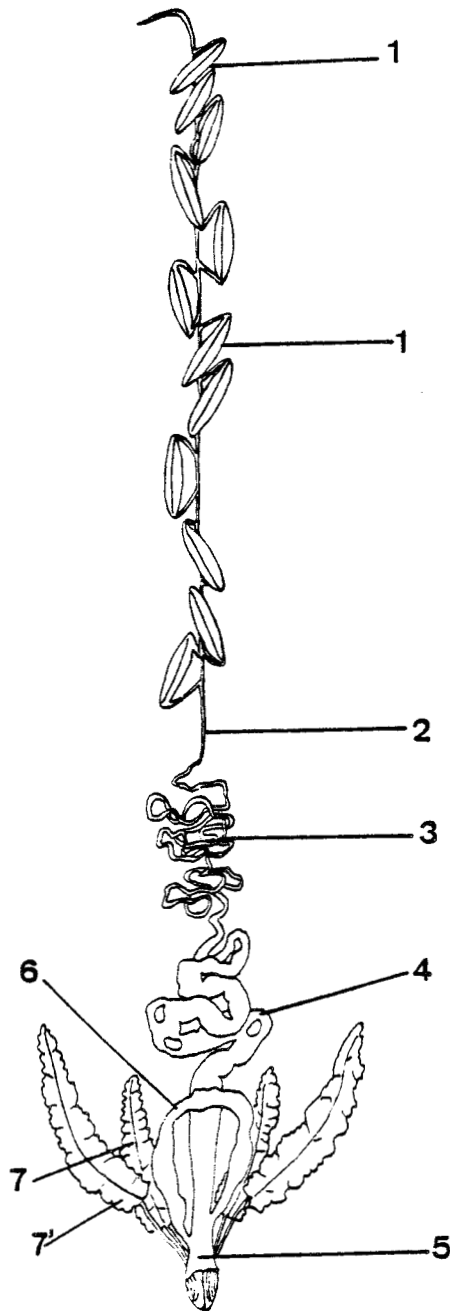


Fig. 3 - Appareil génital mâle de *Scolopendra*

- 1 : testicule ; 2 : canal déférent ; 3 : épидидyme ;
 4 : bourse des spermatophores ; 5 : *ductus ejaculatorius* ;
 6 : vésicule séminale ; 7 et 7' : glandes accessoires.
 D'après FABRE (1855).

et l'organisation des organites cellulaires.

L'existence de jonctions "gap" permettrait aussi de mieux expliquer la quasi-simultanéité des processus spermatogénétiques dans le testicule de *L. forficatus*. En effet, les jonctions "gap" sont constituées de canaux permettant l'échange d'informations entre cellules (ZAMPIGHI *et al.*, 1980). Elles pourraient donc jouer un rôle dans la régulation de la spermatogenèse, permettant les échanges entre cellules des cloisons de logettes et spermatoocytes. Un tel rôle a d'ailleurs été suggéré en ce qui concerne les jonctions "gap" entre cellule du cyste et spermatoocyte chez *Drosophila hydei* (LIEBRICH et SCHROETER, 1982). L'information transmise au spermatoocyte adjacent à la logette serait ensuite véhiculée vers les autres spermatoocytes grâce aux ponts intercellulaires. Ces derniers, peu nombreux mais présents (DESCAMPS, 1971), permettent alors la synchronisation de la différenciation des cellules germinales (FAWCETT, 1961).

En ce qui concerne les gamètes, les images que nous avons pu observer confirment celles de REGER (1980).

II - Scolopendromorphes

A - Anatomie de l'appareil génital mâle

Nous reprendrons la description de FABRE (1855). Les testicules sont au nombre de 24, intimement accolés deux par deux chez *Scolopendra* (Fig. 3), alors qu'ils sont au nombre de 4 chez *Cryptops* (Fig. 4). Chaque testicule en forme d'utricule est relié au canal déférent principal par l'intermédiaire de deux fins conduits. Les utricules testiculaires sont groupés par couples disposés en chaîne longitudinale chez *Scolopendra*, alors que chez les *Cryptops*, ils sont indépendants l'un de l'autre. Le canal principal est suivi d'une portion élargie où se forment les spermatophores. Le conduit génital se termine par un *ductus ejaculatorius* rectiligne. Seul le genre *Scolopendra* présente une vésicule séminale.

B - Etude cytologique des cellules germinales

1°) Spermatogonies et spermatoocytes

Les spermatogonies ont des caractères cytologiques très comparables chez les trois espèces étudiées. Les tailles moyennes des cellules sont très proches (environ 15 X 9 μ m chez les deux *Cryptops* et 12 X 6 μ m chez *S. cingulata*).

Le noyau elliptique et volumineux occupe la majeure partie du volume de la cellule. Le cytoplasme est pauvre en organites (Pl. IX, 1).

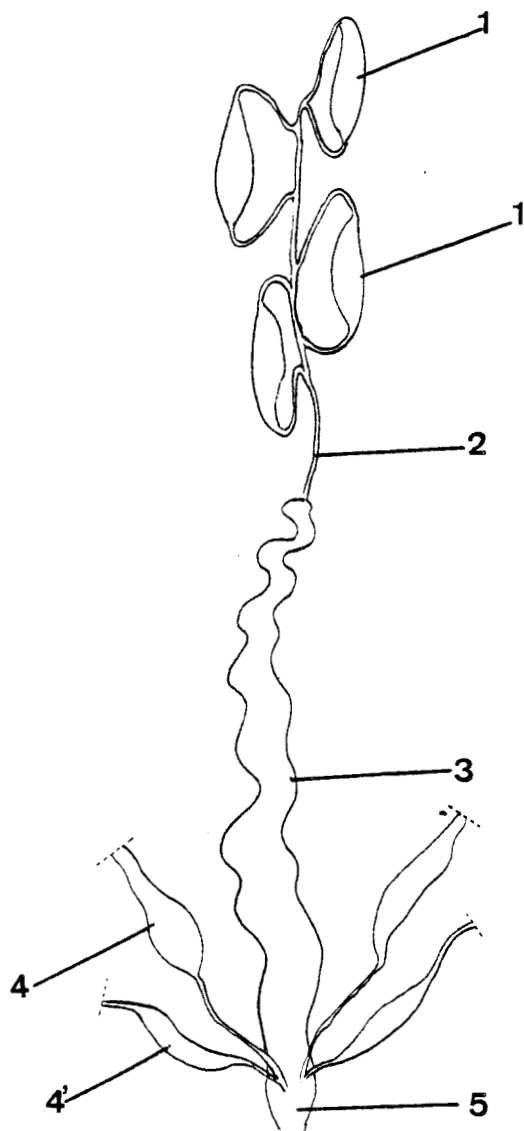


Fig. 4 - Système génital mâle de *Cryptops* :

1 : testicule ; 2 : canal déférent ; 3 : partie élargie
 du canal déférent ; 4 et 4' glandes accessoires ;
 5 : *ductus ejaculatorius*.

D'après FABRE (1855) modifié.

L'étude ultrastructurale des spermatocytes en cours de croissance révèle un volumineux nucléole (Pl. VIII, 1 et 4 ; Pl. IX, 2). D'importants échanges nucléo-cytoplasmiques sont à l'origine des amas fibrillo-granulaires que l'on rencontre dans le cytoplasme (Pl. VIII, 3 ; Pl. IX, 3). Le spermatocyte en fin de croissance peut atteindre 60 μm chez *C. hortensis*, 75 μm chez *C. savignyi* et 40 μm chez *S. cingulata*.

Les mitochondries à crêtes sublongitudinales (Pl. VIII, 1 et 3 ; Pl. IX, 2) subissent d'importantes modifications morphologiques . Au fur et à mesure de la croissance spermatocytaire , la matrice s'éclaircit et l'espace intracristal se dilate fortement (Pl. VIII, 2).

Les ribosomes, très abondants, sont souvent groupés en rosettes ; leur nombre s'accroît avec l'âge de la cellule.

Les dictyosomes n'ont en moyenne qu'une dizaine de saccules. Leur activité sécrétoire semble relativement faible. Le réticulum endoplasmique, de type lisse, n'a qu'un développement moyen (Pl. VIII, 1, 4 ; Pl. IX, 2). Des corps denses vraisemblablement d'origine lysosomiale sont répartis dans tout le cytoplasme ; leur nombre augmente avec la taille du spermatocyte.

Chez *Scolopendra*, des invaginations de la membrane plasmique apparaissent alors que la cellule est encore en début de croissance (25 X 12 μm environ) (Pl. X, 1). Des invaginations successives vont conduire à une augmentation importante de la surface de la membrane plasmique (Pl. X, 2 et 3).

2°) Spermatozoïdes

Seule l'étude du spermatozoïde de *C. hortensis* a été envisagée (Pl. XI, 1).

* L'acrosome, de forme cylindro-conique, long d'environ 1,25 μm coiffe l'apex du noyau et a un diamètre moyen de 0,25 μm . Il est constitué d'un matériel finement granulaire, limité par deux systèmes membranaires : la membrane du spermatozoïde, externe, et la membrane acrosomiale, interne (Pl. XI, 2 et 3). Une structure périodique discrète peut être observée à la périphérie du matériel acrosomial (Pl. XI, 4). Des filaments et des tubules constituent une sorte de manchon externe (Pl. XI, 2, 3 et 4).

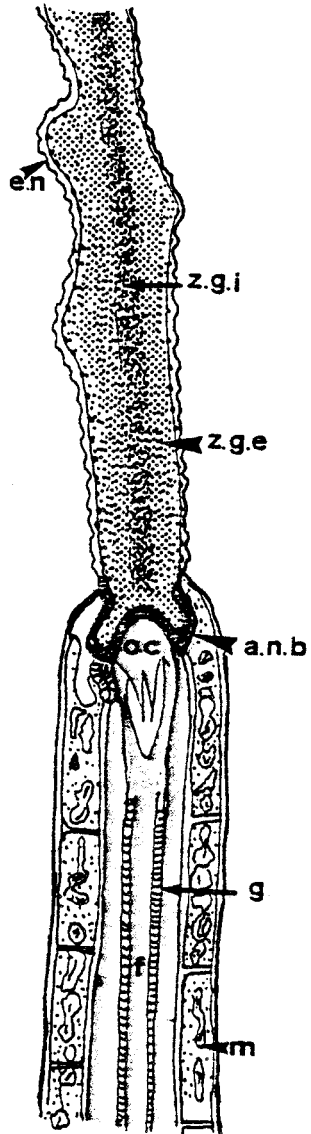


Fig. 5 - Représentation schématique de la zone d'attache du spermatozoïde de *Cryptops*.

* Le noyau est long et mesure 0,2 à 0,3 μm de diamètre. Il présente une spire saillante dont le pas est de 1 μm . La partie axiale du noyau est granulaire, dense aux électrons. La zone externe constituée également de matériel granulaire est cependant moins dense (Pl. XI, 5).

La surface externe de l'enveloppe nucléaire est recouverte d'une sorte de "pavage" polygonal dense aux électrons (Pl. XI, 6).

Un espace relativement important (50 nm) existe entre le noyau et la membrane plasmique. Des évaginations de cette membrane (Pl. XI, 6) réunissent entre eux les spermatozoïdes et constituent un système tubulaire de connexion.

* La zone d'attache comprend la région postérieure différenciée du noyau et les parties antérieures du complexe flagellaire et du manchon caudal (Pl. XI, 8 ; fig. 5). La partie postérieure du noyau présente un renflement annulaire et une cavité centrale hémisphérique qui s'adaptent respectivement au manchon caudal et au dérivé (organite de connexion) (Pl. XI, 7 et 8 ; fig. 5). La liaison est ainsi assurée entre l'ensemble noyau-complexe flagellaire d'une part, et le manchon caudal d'autre part.

* La pièce intermédiaire : le flagelle occupe approximativement le centre du manchon mitochondrial (Pl. XII, 1). Il est entouré par deux gaines présentant des striations obliques qui semblent constituer deux systèmes inverses. Il est à remarquer que suivant le plan de coupe la structure périodique est mise ou non en évidence (Pl. XII, 4).

La paroi interne de la gaine interne est pourvue, entre les doublets, de neuf épaisissements (Pl. XII, 1).

Le manchon mitochondrial a une épaisseur de 0,3 μm environ et est constitué de quatre hélices (Pl. XII, 1). Les espaces entre les hélices renferment une sorte de ciment dans lequel on peut observer du matériel de densité moyenne (Pl. XII, 2).

Les mitochondries hexagonales montrent de place en place des différenciations au niveau de leur affrontement (Pl. XII, 2). Les mitochondries d'une hauteur moyenne de 0,6 μm et de 0,25 μm d'épaisseur, présentent des variations de structure suivant leur place dans la pièce intermédiaire :

1) Un premier type montre une moyenne de onze saccules aplatis, communicant entre eux par un système de tubules. Une coupe passant dans le plan de système tubulaire révèle un aspect en "nid d'abeilles" (Pl. XII, 3).

2) Un second type renferme en moyenne neuf structures denses constituées par les crêtes et la membrane mitochondriale interne. L'espace intermembranaire est, comme dans le cas précédent, occupé par du matériel de densité moyenne (Pl. XII, 5).

* La partie terminale de la queue n'est constituée que par l'axonème et ses gaines. Le flagelle se termine par un appendice ovoïde, rempli de matériel dense (Pl. XI, 9 et 10).

C - Discussion

Selon BLACKMAN (1905), il existerait deux catégories de cellules germinales chez les Scolopendromorphes, micro et macro spermatocytes donnant naissance à deux lignées de gamètes, respectivement micro et macro spermatozoïdes.

Nos observations, en accord avec celles de TUZET et MANIER (1953) concernant *C. trisul^{lca}actus* et celles de CAMATINI et FRANCHI (1979) sur *S. morsitans* n'ont pas permis de retrouver ces deux lignées cellulaires ou ces deux types de spermatozoïdes.

- Spermatogonies et spermatocytes

L'étude ultrastructurale concernant les spermatogonies et spermatocytes chez les trois espèces de Scolopendromorphes a révélé une grande analogie de taille et de morphologie.

La phase de croissance spermatocytaire est marquée par la présence : 1) des figures de bourgeonnement nucléolaire, 2) de matériel fibrillo-granulaire dans le cytoplasme et 3) par une augmentation de la densité en ribosomes.

Les mitochondries à crêtes sublongitudinales ont une maturation comparable à celle décrite chez les Lithobiomorphes.

L'appareil de Golgi sécrète relativement peu, contrairement à ce que l'on peut observer chez les Lithobiomorphes. Malgré cela, le métabolisme de synthèse de la cellule doit être assez élevé, si l'on en juge par l'accroissement de taille (12-15 μm à 50 μm) par l'importance des échanges nucléocytoplasmiques, par le nombre de mitochondries et par la présence chez *Scolopendra* d'une membrane plasmique circonvoluée, ce qui ne peut vraisemblablement être qu'en relation avec une augmentation des échanges entre la cellule et le milieu intérieur.

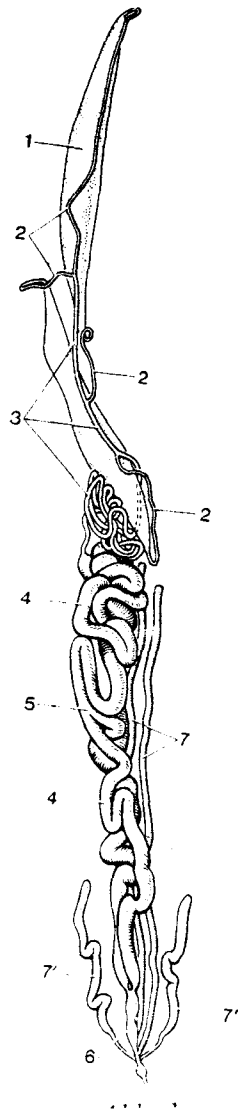


Fig. 6 - Appareil génital mâle d'un Géophilomorphe.

- 1 : testicule ; 2 et 3 : *vas deferens* ;
- 4 : partie épaisse du *vas deferens* ; 5 : bifurcation de la partie épaisse du *vas deferens* en deux tubes ;
- 6 : partie terminale impaire et *ductus ejaculatorius* ;
- 7 et 7' : glandes accessoires.

D'après BREUCKER (1970).



- Spermatozoïdes

Nous nous efforcerons de comparer nos observations, réalisées chez *C. hortensis*, avec celles faites chez *Scolopendra morsitans* (CAMATINI et FRANCHI, 1979).

Ces deux espèces possèdent un gamète filiforme au noyau spiralé. Cependant, chez *S. morsitans*, l'acrosome est très développé (60 à 70 µm de long) et le noyau est homogène.

Du matériel dense extranucléaire est mis en évidence chez les deux espèces avec cependant des différences dans la répartition.

Les zones de liaison sont morphologiquement très comparables chez les deux Scolopendromorphes.

En ce qui concerne la structure caudale l'on retrouve chez les deux espèces, localisés entre les doublets, les neuf épaisissements de la surface interne de la gaine flagellaire. Les principales différences concernent le manchon mitochondrial ; sa structure est plus complexe chez *C. hortensis* que chez *S. morsitans*. Chez cette dernière espèce, les mitochondries ne montrent pas les variations structurales observées chez *C. hortensis*. Les images de l'article de CAMATINI et FRANCHI (1979) n'étant pas d'excellente qualité, nous ne pourrions pas faire de comparaison en ce qui concerne la striation de la gaine, et le nombre de mitochondries qui constituent la section du manchon caudal.

III - Géophilomorphes

A - Anatomie de l'appareil génital

Nous emprunterons la description de l'appareil génital mâle des Géophilomorphes à BREUCKER (1970). Les testicules, au nombre de deux sont réunis entre eux par le *vas deferens*. Ce fin canal, très circonvolé, est suivi d'une partie épaissie qui se divise en deux tubes de même diamètre et aspect que le tube unique dont ils sont issus. Les deux tubes se rejoignent dans la partie postérieure du corps pour former le *ductus ejaculatorius*, où viennent déboucher deux paires de glandes accessoires (Fig. 6)

B - Etude cytologique des cellules germinales

1°) Spermatogonies et croissance spermatocytaire chez *Necrophloeophagus longicornis*, *Scolioptanes acuminatus* et *Haplophilus subterraneus*.

Chez ces trois espèces existe une grande analogie structurale. Les différences portent seulement sur la taille de la cellule et l'abondance relative des organites.

* La spermatogonie peut atteindre environ 9 μm dans sa plus grande dimension chez *N. longicornis* et *H. subterraneus* et 16 μm chez *S. acuminatus*. Le noyau (6 X 2,5 μm en moyenne) présente une chromatine dispersée (Pl. XIII, 1 ; Pl. XV, 1 ; Pl. XVI, 1). Le nucléole mesure environ 1,5 μm de diamètre et semble de type homogène.

Chez *N. longicornis*, dès le début de la phase d'accroissement cellulaire, une importante quantité de matériel fibrillo-granulaire est émise vers le cytoplasme au travers des pores nucléaires (Pl. XIII, 1). Le cytoplasme renferme peu de réticulum endoplasmique granulaire (Pl. XIII, 1 ; Pl. XV, 2 ; Pl. XVI, 2). Les ribosomes, généralement libres, sont relativement abondants. Les mitochondries sont assez peu nombreuses et petites (0,15 à 0,4 μm). Elles possèdent des crêtes longitudinales.

* Phase d'accroissement spermatocytaire

La dispersion de la chromatine dans le nucléoplasme augmente avec l'accroissement de ^{la} taille nucléaire. Le nucléole, compact et homogène chez *N. longicornis* et *H. subterraneus* (Pl. XIII, 2 ; Pl. XVI, 2), est vacuolisé chez *S. acuminatus* (Pl. XV, 2 et 3).

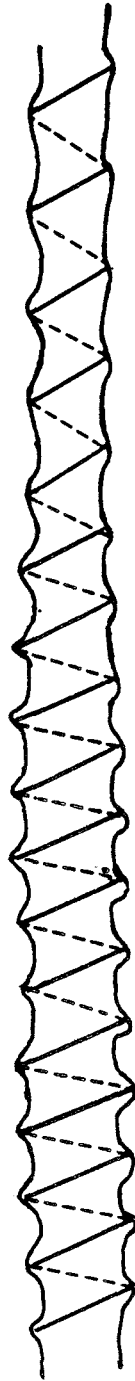
Dans le cytoplasme, la densité en ribosomes augmente particulièrement chez *S. acuminatus* (Pl. XV, 5) et *H. subterraneus* (Pl. XVI, 3).

Le réticulum endoplasmique est beaucoup plus abondant surtout dans la région périnucléaire où les lamelles sont disposées parallèlement les unes aux autres (Pl. XIV, 1 ; Pl. XV, 4).

Chez *N. longicornis*, des amas de matériel fibrillo-granulaire peuvent occuper une partie du cytoplasme compris entre les lamelles réticulaires périnucléaires (Pl. XIV, 2 et 3). Des amas extrêmement importants peuvent également se former ailleurs dans le cytoplasme ; des formations annulaires correspondant vraisemblablement, d'après les images observées, à des coupes à différents niveaux dans des sphères creuses (Pl. XIV, 4), semblent s'y différencier.

Dans un spermatocyte en cours de croissance, les mitochondries sont plus nombreuses et plus allongées que dans le cytoplasme gonial (0,6 à 1 μm) (Pl. XIV, 1, Pl. XV, 3, Pl. XVI, 3). La longueur et le nombre de mitochondries augmentent avec l'âge de la cellule.

Les dictyosomes (10 à 12 saccules) apparaissent au cours de la croissance cellulaire. Leur sécrétion semble peu abondante (Pl. XIV, 1 ; Pl. XV, 5).



BUS
LILLE

Fig. 7 - Répartition de la spire de matériel granulaire dans la partie postérieure du noyau chez *Necrophloeophagus longicornis*. Schéma fait d'après une photo de microscopie électronique à balayage.

2°) Spermatozoïdes

Nous envisagerons successivement les différents constituants du gamète chez *N. longicornis*, *H. subterraneus* et *S. acuminatus*.

Chez les Geophilomorphes, les spermatozoïdes sont enroulés sur eux-mêmes lorsqu'ils sont prélevés dans la partie renflée du *vas deferens* (Pl. XVII, 1).

Le gamète est long (environ 3 mm) et présente la structure classique des spermatozoïdes des Chilopodes : une tête (noyau, acrosome) et une queue (zone d'attache, pièce intermédiaire, pièce terminale).

Necrophloeophagus longicornis

* Acrosome : Le spermatozoïde montre un très court acrosome d'environ 1,1 μm de longueur sur 0,2 à 0,3 μm de large (Pl. XVII, 2 et 3).

* Noyau : Si l'on ne tient pas compte des spires saillantes, son diamètre augmente régulièrement depuis la partie antérieure (0,15 μm) vers la partie postérieure (0,35 μm) ; la zone centrale est moins dense aux électrons (Pl. XVIII, 6).

Les images de microscopie électronique à balayage (Pl. XVII, 3) et la géométrie de la répartition de la spire saillante montrent qu'une seule spire de matériel granulaire parcourt le noyau (Fig. 7).

Les caractéristiques géométriques de cette spire varient d'une extrémité du noyau à l'autre (Pl. XVII, 3, 4 et 5). La membrane plasmique est séparée de l'enveloppe nucléaire par une distance de 30 à 40 nm, mais suit la structure.

* Zone d'attache : la partie basale du noyau, après un rétrécissement, s'élargit en une cupule dont la cavité est tournée vers le centriole ; cette cavité reçoit l'organite de connexion (Pl. XVII, 7 ; Fig. 8). La partie la plus antérieure du manchon caudal s'adapte autour de ces structures (Pl. XVII, 5 et 7).

* Pièce intermédiaire : Son épaisseur varie de 0,5 μm dans ses parties moyenne et postérieure. Elle est constituée sur toute sa longueur d'un flagelle et d'un manchon mitochondrial. L'axonème décrit une spirale à l'intérieur de la queue. De ce fait, il est toujours excentrique (Pl. XVII, 8). Le flagelle a une structure classique (9 + 2) et est entouré par une gaine striée (Pl. XVIII, 1 et 6). Entre les doublets, la gaine présente à sa surface interne 9 épaisissements. Le volume cytoplasmique qui

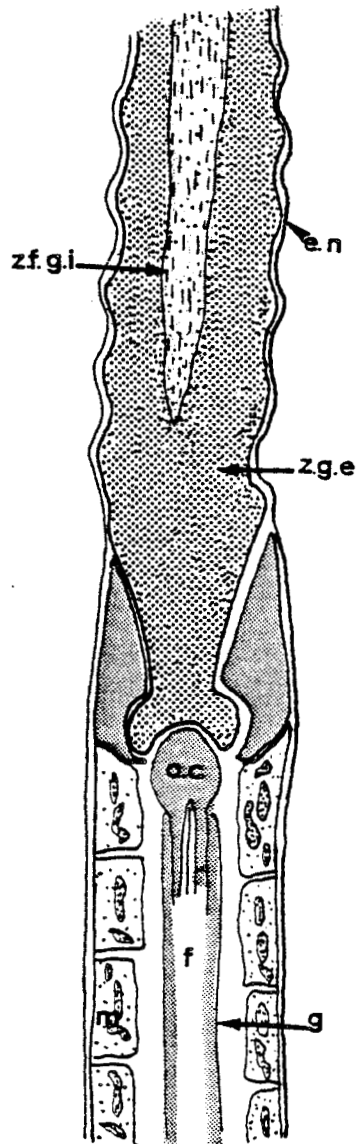


Fig. 8 - Représentation schématique de la zone d'attache du spermatozoïde chez *N. longicornis*.

entoure le flagelle (compartiment flagellaire) renferme du matériel granulaire assez dense aux électrons (Pl. XVIII 2, C2) ou quasi-hyalin (id, C3). Cet espace périaxial est entouré, à son tour, par un manteau mitochondrial dont l'aspect est différent selon les niveaux (Pl. XVIII, 1).

Quatre mitochondries constituent la circonférence de ce manchon caudal (Pl. XVII, 8). Leur épaisseur est irrégulière, conséquence de la position excentrée du flagelle.

Le manchon mitochondrial délimite des cavités intercommunicantes dans lesquelles on peut reconnaître des granules denses (environ 50 nm de diamètre). La technique de SELIGMAN modifiée par THIERY révèle que ces granules sont de nature polysaccharidique et plus précisément glycogénique (Pl. XXII, 3). Ce sont des particules α de glycogène suivant la nomenclature de DROCHMANS (1962). La cavité principale constitue un véritable compartiment à glycogène (Pl. XVIII, 2, C1 ; Pl. XXI, 3) et décrit une hélice. On peut y reconnaître des microtubules longitudinaux. Les ponts transversaux qui assurent la relation entre les hélices (Pl. XVII, 9 ; Pl. XVIII, 3) sont d'origine mitochondriale.

La morphologie des mitochondries varie suivant leur position dans la pièce intermédiaire. Immédiatement sous la zone d'attache, elles ont une hauteur de 0,5 μm (Pl. XVIII, 1) et présentent, en coupe, un saccule longitudinal, aux formes assez irrégulières, rempli de matériel dense. Le second type de morphologie mitochondriale caractérise les parties moyennes et terminales de la pièce intermédiaire. Les mitochondries ont une hauteur moyenne de 0,25 μm et renferment une formation délimitée par la membrane interne. Les crêtes flexueuses baignent dans une matrice dense. De part et d'autre de ce compartiment matriciel, deux formations obliques ont reçu le nom d' "appendices" par HORSTMANN (1968) (Pl. XVIII, 4). Il semble qu'il y ait relation entre ces "appendices" et la matrice (Pl. XVIII, 3 et 4).

Entre chaque mitochondrie se trouve une lame de matériel dense (Pl. XVIII, 5) dont l'apparence rappelle, à l'échelle de l'organite, la morphologie d'une jonction septée.

* Pièce terminale : La régularité dans la disposition et la structure des mitochondries se perd dans la partie terminale du manchon. Par contre, la partie axiale conserve sa structure. Le manchon est obtenu par une formation différenciée ("complexe de clôture", COTELLI et al, 1978). (Pl. XVIII, 6).



Fig. 9 - Répartition géométrique des spires de matériel granulaire autour du noyau du spermatozoïde chez *H. subterraneus*



Haplophilus subterraneus

* Acrosome : Chez cette espèce seuls nous sont connus le diamètre, 0,3 μm , et la structure fine du matériel acrosomial (Pl. XIX, 1). Suivant le plan de coupe, le contenu de l'acrosome montre une distribution en couches concentriques, ou prend un aspect pseudocristallin.

* Noyau : Son diamètre moyen décroît régulièrement de 0,9 à 0,5 μm de l'arrière vers l'avant. Comme chez *N. longicornis*, le noyau présente deux zones bien définies : (Pl. XIX, 2, 3 et 4) la zone interne, moyennement dense aux électrons, est de nature fibrillaire. Les fibrilles ont un diamètre de 20 nm. La zone externe, granulaire, est constituée par trois spires saillantes, ainsi que le prouvent les caractéristiques de la répartition géométrique des bourrelets saillants sur l'axe nucléaire (Fig. 9). Le pas de la spire augmente de l'arrière (2,5 μm) vers l'avant (3,2 μm).

* Zone d'attache : L'organite de connexion de forme ogivale est inséré dans le noyau (Pl. XIX, 4 et 5 ; fig. 10). Une manchette de matériel cytoplasmique homogène s'accroche à l'anneau basal et l'entoure.

* Pièce intermédiaire : Son diamètre, de 0,7 μm dans sa partie antérieure s'élargit peu à peu pour atteindre 1,1 μm . Le flagelle est entouré d'une gaine épaisse (50 à 60 μm dans la partie antérieure, (Pl. XX, 3), 30 nm dans la partie postérieure Pl. XX, 4). Cette gaine présente une striation périodique dont l'angle d'obliquité par rapport au grand axe du spermatozoïde se situe entre 60 et 70° (Pl. XX, 2). La structure périodique est constituée d'une alternance de bandes sombres (13 nm d'épaisseur) et de bandes claires (6,4 nm).

En coupe transversale la gaine flagellaire montre 9 épaisissements, correspondant à l'espace entre les doublets (Pl. XX, 3).

Autour du complexe flagellaire se trouve un compartiment cytoplasmique hyalin entouré lui-même par un manchon mitochondrial présentant la même complexité de structure observée chez *N. longicornis*.

Le manchon mitochondrial est constitué par des empilements successifs de 4 éléments qui délimitent entre eux des cavités intercommunicantes, occupées ou non par des particules denses, vraisemblablement du glycogène α .

La structure des mitochondries est très voisine de celle constatée chez *N. longicornis* (Pl. XX, 1, 4 et 5).

* Pièce terminale : Le spermatozoïde se termine, comme chez *N. longicornis*, par un "complexe de clôture", ensemble de structures ressemblant à un bouchon hérissé d'une chevelure de tubules, qui vient obstruer le

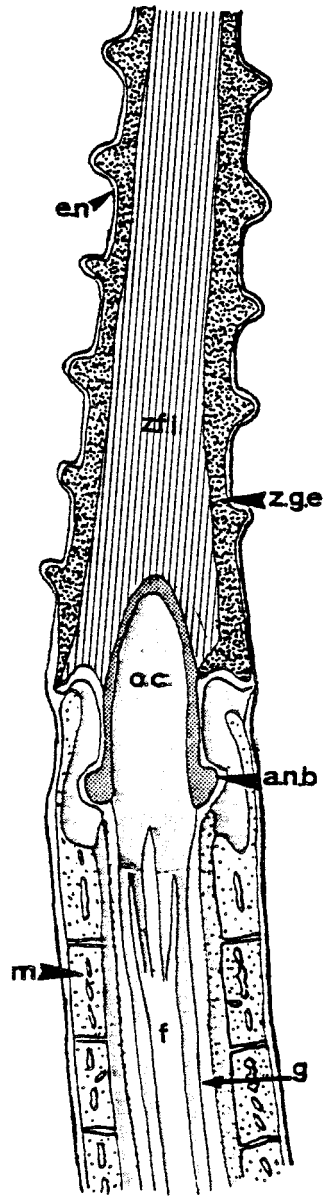


Fig. 10 - Représentation schématique de la zone d'attache du spermatozoïde chez *H. subterraneus*.

manchon mitochondrial (Pl. XX, 6).

Scolioplanes acuminatus

Le spermatozoïde de cette espèce montre une considérable ressemblance de structure avec ceux de *N. longicornis* et *H. subterraneus*. Cependant dans cette description, nous essayerons de mettre l'accent sur les particularités structurales qui différencient cette espèce des deux autres.

La tête est constituée d'un acrosome complexe par sa forme, plus long que celui de *N. longicornis* (environ 10 μm de longueur pour 0,8 μm de diamètre; Pl. XXI, 2) et d'un noyau spiralé d'environ 30 μm de longueur (Pl. XXI, 1).

Les grandes différences résident surtout dans la structure de la pièce intermédiaire : le compartiment flagellaire, hyalin, est rectiligne ; un compartiment à glycogène (Pl. XXII, 4) s'enroule en spirale autour de lui (Pl. XXI, 3).

Comme chez les deux autres espèces, la morphologie structurale du manchon mitochondrial varie suivant les zones (Pl. XXI, 3 à 8). Les mitochondries de la partie la plus postérieure de la pièce intermédiaire présentent des crêtes rectilignes (Pl. XXI, 3 et 6) réparties selon une séquence 1 - 3 - 1. Les mitochondries sont en relation par des "plis de jonction" (Pl. XXI, 6). Des particules de glycogène occupent les espaces délimités par ces plis.

Geophilus carpophagus

Cette étude très fragmentaire, n'a porté que sur la morphologie du spermatozoïde en microscopie électronique à balayage.

La tête du spermatozoïde est constituée d'un acrosome effilé de 3 μm de longueur portant une structure spirale saillante à sa partie postérieure (Pl. XXII, 1 et 2) et d'un noyau présentant lui aussi une spire saillante autour d'un axe rectiligne central (Pl. XXII, 1).

C - Discussion

Spermatogonies et croissance spermatocytaire.

Les seules données ultrastructurales des spermatogonies et spermatocytes de Géophilomorphes concernent *N. longicornis*, *S. acuminatus* et *H. subterraneus*. Une grande analogie de taille existe entre les spermatogonies et spermatocytes des trois espèces, respectivement 9 à 16 μm et environ 50 μm .

Les spermatogonies pauvres en organites, comme c'est le cas chez les Lithobiomorphes et Scolopendromorphes, subissent un accroissement énorme. Corrélativement, l'abondance relative en organites augmente de façon importante vraisemblablement en relation avec le volume des synthèses réalisées dans la cellule. L'activité sécrétoire des dictyosomes semble moins importante chez

que

les Lithobiomorphes. Le cytoplasme des spermatocytes renferme d'importants amas de reticulum endoplasmique avec une répartition périnucléaire prépondérante chez *N. longicornis*.

Des amas de matériel fibrillogranulaire peuvent être observés dans les espaces entre les lamelles réticulaires chez *N. longicornis*, phénomène que nous n'avons jamais observé dans les spermatocytes de Lithobiomorphes et Scolopendromorphes.

Le métabolisme de synthèse semble nettement moins important que celui des Lithobiomorphes.

Spermatozoïdes

Les résultats obtenus par l'étude ultrastructurale des spermatozoïdes chez *N. longicornis*, *H. subterraneus* et *S. acuminatus* peuvent être comparés avec ceux obtenus chez *Geophilus linearis* (HORSTMANN, 1968) et *Himantarium gabrielis* (COTELLI et al, 1978). Tous les Géophilomorphes possèdent un spermatozoïde de grande longueur (de l'ordre de 3 mm).

L'acrosome, à longueur et forme variables suivant les espèces, coiffe le noyau dans sa partie antérieure. Deux zones nucléaires sont nettement distinctes : une zone externe granulaire enroulée en spire saillante autour de la zone centrale rectiligne de nature fibrillaire (*G. linearis*, *H. gabrielis* et *H. subterraneus*) ou fibrille granulaire (*N. longicornis*). Le nombre de spires granulaires, trois chez *H. subterraneus* et *H. gabrielis* n'est que de deux chez *G. linearis*. Une seule spire est présente chez *N. longicornis* et *G. carpophagus*.

L'organite de connexion a une forme hémisphérique chez *N. longicornis* tandis que chez les trois autres espèces il a une forme ogivale qui rappelle celle que l'on peut observer chez *L. forficatus* (DESCAMPS, 1972).

Le manchon caudal et la structure finale de la pièce intermédiaire sont des structures plus complexes chez *N. longicornis*, *S. acuminatus*, *H. subterraneus* et *G. linearis* que chez *H. gabrielis*.

L'axonème a une position excentrée et n'est pourvu que d'une seule gaine striée chez *N. longicornis*, *S. acuminatus* et *H. gabrielis* ; il est subaxial et entouré par un épais cylindre strié chez *G. linearis* (dénommé "streifenzyylinder" par HORSTMANN, 1968) et chez *H. subterraneus*.

Chez les cinq espèces ayant fait l'objet d'études, neuf épaisissements sont visibles sur la paroi interne de la gaine, en alternance avec les doublets.

Autre caractère commun, le manchon mitochondrial présente une morphologie structurale différente selon la région de la pièce intermédiaire concernée : plus hautes et moins épaisses sous la zone d'attache, les mitochondries sont plus aplaties et plus larges dans les zones moyenne et postérieure.

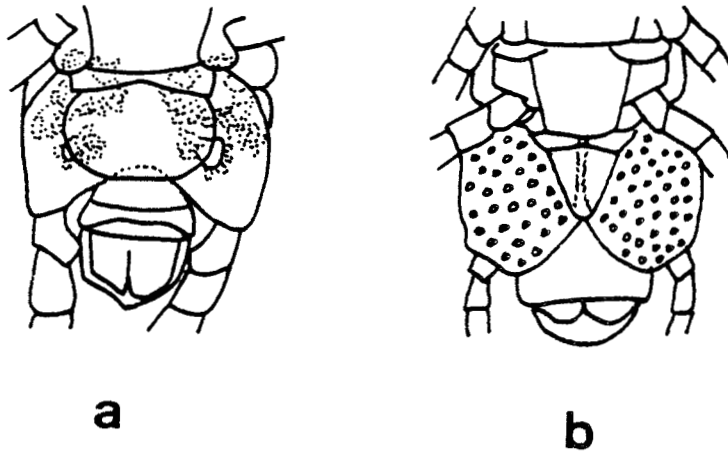


Fig. 11 - Disposition des pores coxaux chez :

a) *Geophilus linearis* b) *Haplophilus subterraneus*

On remarque que chez *G. linearis* les glandes coxales débouchent dans quelques dépressions d'assez grandes dimensions et ne sont visibles que par transparence alors que chez *H. subterraneus* elles s'ouvrent individuellement à la surface des hanches des pattes postérieures.

Chez *N. longicornis* et *H. subterraneus* le manchon mitochondrial montre une grande ressemblance morphologique des constituants principaux avec celui de *G. linearis* (HORSTMANN, 1968). Chez les deux autres espèces, les différences essentielles portent sur la structure interne des mitochondries.

Enfin, le dernier point commun entre les différentes espèces étudiées est la présence de cavités intercommunicantes remplies de granules denses présentant les caractéristiques cytochimiques et morphologiques du glycogène α .

La partie terminale de la queue est constituée, au moins chez quatre espèces (*G. linearis*, *H. gabrielis*, *N. longicornis* et *H. subterraneus*) par un "complexe de clôture" (COTELLI et al, 1978) dont les structures sont proches les unes des autres.

En résumé, il semble qu'une grande ressemblance existe entre les gamètes des différents Géophilomorphes, avec cependant des variations spécifiques. Ces variations paraissent cependant minimales, voire inexistantes entre les images que nous avons obtenues chez *H. subterraneus* et celles publiées par HORSTMANN (1968) concernant *G. linearis*. Ces deux espèces appartiennent cependant à des familles différentes (Himantariidae pour *H. subterraneus*, Geophilidae pour *G. linearis*) et ne peuvent guère être confondues lors de la détermination compte tenu des caractères utilisés (Fig. 11).

IV - Discussion

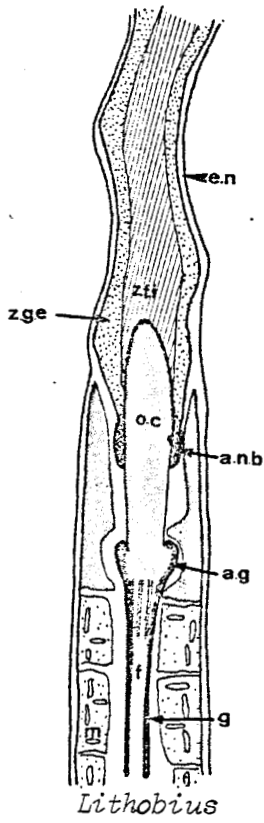
Nous avons pu montrer dans cette étude de la cytologie comparée de la spermatogenèse chez les Myriapodes Chilopodes qu'une grande constance morphologique existait dans la structure des cellules germinales.

Les résultats fournis par les techniques de la microscopie photomicroscopique et électronique nous apportent un certain nombre de précisions concernant la différenciation des constituants cellulaires et leur évolution au cours de la spermatogenèse chez les Chilopodes.

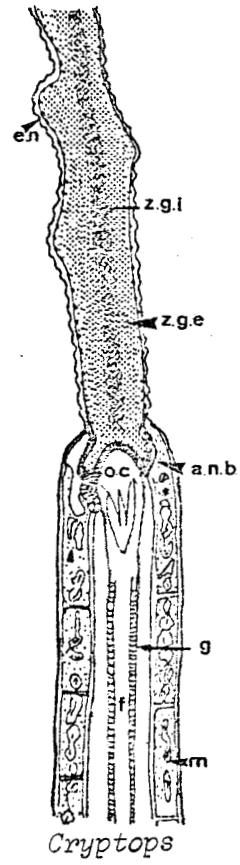
A - Croissance spermatocytaire

Chez tous les Chilopodes étudiés, la spermatogonie (relativement) petite, est pauvre en organites ; c'est d'ailleurs un caractère constant dans toute la lignée animale.

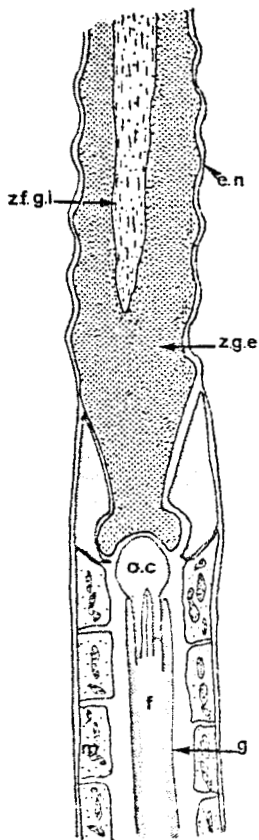
Une croissance spermatocytaire très importante caractérise les Chilopodes : le diamètre du spermatocyte en fin de croissance est en moyenne 3 fois celui de la spermatogonie. La présence de spermatocytes géants ("Like egg cell", NATH, 1925) n'a été signalée par ailleurs que chez *Aphodius* et quelques autres Coléoptères (VIRKKI, 1951, 1956).



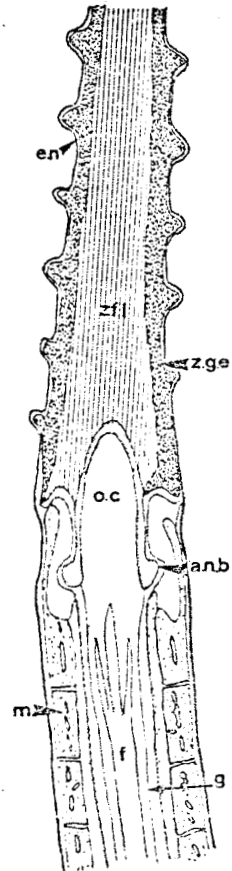
Lithobius



Cryptops



N. longicornis



H. subterraneus

BUS
LILLE

Fig. 12 - Structure de la zone d'attache des spermatozoïdes.
Schémas récapitulatifs.

Le métabolisme de synthèse semble donc nettement plus élevé que celui décrit dans d'autres spermatogenèses. Il est en rapport avec la grande activité nucléaire, l'importance des échanges nucléo-cytoplasmiques, l'intense multiplication des mitochondries et des dictyosomes.

Des différences existent néanmoins entre ordres ou entre espèces et portent sur l'abondance relative du réticulum endoplasmique, sa disposition (essentiellement périnucléaire chez les Géophilomorphes), la sécrétion plus ou moins abondante de l'appareil de Golgi ou sur la disposition des crêtes mitochondriales. Quant à la maturation des mitochondries, elle est comparable chez toutes les espèces étudiées et se fait par dilatation de l'espèce intracrystal.

B - Spermatozoïdes

Une remarquable homogénéité de structure se rencontre dans les quatre ordres de Chilopodes : Lithobiomorphes, Scolopendromorphes, Geophilomorphes et Scutigéromorphes ; dans tous les cas, le noyau se compose d'une tête (noyau, acrosome) et d'une queue (pièce intermédiaire, courte pièce terminale). Les gamètes de ces différents ordres présentent cependant des différences structurales :

- la forme et la longueur de l'acrosome varient suivant les espèces ; il mesure en effet de 60 à 70 μm chez *Scolopendra morsitans* (CAMATINI et al, 1979) et n'atteint plus que 1,5 à 7 μm chez les autres espèces.

- les noyaux de toutes les espèces étudiées possèdent approximativement la même structure : une zone externe granulaire, saillante et spiralisée, entoure une zone centrale fibrillaire (*H. subterraneus* ; *G. linearis* : HORSTMANN, 1968 ; *L. forficatus* : DESCAMPS, 1972 ; *L. crassipes*) ou fibrillo-granulaire (*N. longicornis*) ou granulaire (*C. hortensis*). Notons que chez *S. morsitans* le noyau semble homogène (CAMATINI et al, 1979).

La présence de matériel dense extranucléaire n'est observable que chez les Scolopendromorphes.

- Au sein de la zone d'attache, les variations portent sur la structure de l'organite de connexion (Fig. 12).

Il est en forme d'ogive chez *H. subterraneus*, *G. linearis* (HORSTMANN, 1968), *L. forficatus* (DESCAMPS, 1972) *L. crassipes* et *H. gabrielis* (COTELLI et al, 1978) alors que chez *C. hortensis*, *S. morsitans* (CAMATINI et al, 1979) et *N. longicornis*, il est hémisphérique. Chez *Scutigera coleoptrata* (CAMATINI et al, 1977) l'organite de connexion a la forme d'un cône dont la base serait soudée au noyau.

Contrairement à ce qui a été observé chez les Lithobiomorphes, les expansions des gaines flagellaires dans la zone d'attache sont absentes chez les Scolopendromorphes, Geophilomorphes et Scutigéromorphes.

- Chez les Lithobiomorphes, le manchon mitochondrial est formé de deux hélices principales subdivisées en deux hélices secondaires. Par contre chez les Scolopendromorphes, les Scutigéromorphes et les Géophilomorphes, les hélices, au nombre de quatre, semblent équivalentes.

C'est chez les Géophilomorphes que le manchon caudal, creusé d'un système complexe de canaux, atteint sa plus grande complexité. Il est à remarquer que HORSTMANN (1968) et COTELLI et al, (1978) lui donnent le nom de dérivé membranaire et non de dérivé mitochondrial, nom donné par CAMATINI et al, (1977) chez *S. coleoptrata* et par DESCAMPS (1972, 1976) et CAMATINI et al, (1974) chez *L. forficatus*. Bien que l'étude détaillée de la spermiogenèse des Géophiles n'ait pas été entreprise, il n'est pas douteux que chez *N. longicornis* et chez *H. subterraneus*, par exemple, tous les éléments internes de la mitochondrie soient parfaitement discernables.

- Les gaines flagellaires, nettement séparées, ont chacune l'aspect d'une membrane unitaire chez les deux *Lithobius* et chez *Cryptopshortensis*. Ces deux gaines présentent des striations obliques qui, suivant le plan de coupe, sont mises ou non en évidence. Par contre, chez les Géophilomorphes, les Scutigéromorphes et *Scolopendra*, le flagelle n'est pourvu que d'une seule gaine striée qui est très épaisse chez *S. morsitans*, *S. coleoptrata*, *G. linearis* et *H. subterraneus*. Chez toutes les espèces l'angle d'obliquité des striations est comparable, compris entre 60 et 70°.

L'existence des épaisissements dans l'espace entre deux doublets semble un caractère constant chez les Chilopodes. Il faut souligner que ces structures occupent la même position que les fibres accessoires du flagelle des spermatozoïdes de nombreux insectes (DANILOVA, 1973).

La présence de glycogène dans les spermatozoïdes et notamment dans les espaces extramitochondriaux a souvent été signalée (ANDRE, 1965, ANDERSON, 1968, ANDERSON et PERSONNE, 1970, PERSONNE, 1971). Il est moins abondant chez les Lithobiomorphes que chez les Géophilomorphes où il est localisé dans le réseau de canaux et de septa.

Si dans l'ensemble, notre étude confirme chez les Chilopodes une grande constance morphologique des constituants principaux comme l'a déjà signalé BACCETTI (1970), un certain nombre de points méritent d'être soulignés ne serait-ce qu'à l'attention des taxonomistes.

1 - *N. longicornis* possède une tête spermatique à la morphologie toute spéciale. De plus, cette espèce se distingue par un caractère anatomique (non génital) tout à fait particulier : le *nervus glandulae cerebrealis*, nerf reliant la glande cérébrale au cerveau, est orienté antéro-postérieurement au lieu d'être transversal comme chez les autres espèces (JOLY et DESCAMPS, 1969).

2 - Deux espèces, *H. subterraneus* et *G. linearis* distinctes morphologiquement et appartenant dans la classification actuelle (BRÖLEMANN, 1930 ; DEMANGE, 1981) à des familles différentes, ont des gamètes très semblables, ce qui semble prouver une parenté assez (ou très) proche.

CHAPITRE II

MISE EN EVIDENCE EXPERIMENTALE DU ROLE DES CELLULES
DES CLOISONS DE LOGETTES DANS LA PHYSIOLOGIE TESTICULAIRE.

I - Introduction

La notion de "barrière" de perméabilité testiculaire* ("testis blood barrier") a été solidement établie sur des bases physiologiques dans le cas des Mammifères. Cette barrière explique les différences de composition entre le liquide des tubes séminifères et le milieu sanguin (SETCHELL et al, 1969, 1974).

Chez les Arthropodes, et principalement chez les Insectes, la présence d'une barrière de perméabilité testiculaire aux macromolécules hémolymphatiques a été évoquée par KAMBEYSELLIS et WILLIAMS, 1971, MARCAILLOU et SZOLLOSI, 1975, SZOLLOSI et MARCAILLOU, 1977. Afin d'interpréter leurs résultats expérimentaux les auteurs sont amenés à postuler, d'une part l'existence d'une telle barrière de perméabilité et d'autre part sa régulation par voie endocrine.

Nous nous sommes proposés d'étudier le problème de la perméabilité testiculaire chez *L. forficatus* grâce à l'utilisation des traceurs opaques.

II - Matériel et Techniques

Deux types de techniques ont été employées : soit l'injection du traceur *in vivo* (ferritine, peroxydase, microperoxydase et 5 - hydroxydopamine), à raison de 10 μ l d'une solution dans du Ringer, soit l'imprégnation *in vitro* après fixation (Lanthane et acide tannique).

Chaque série expérimentale comprend deux lots : un lot de témoins et un lot d'animaux "activés" qui reçoivent en injection 1 μ g de 20-OH-ecdysone, 24 heures avant l'application du traceur.

1 - Ferritine : (Ferritin 2Xcd Free, Sigma ; diamètre moléculaire \approx 7 nm). Deux concentrations ont été utilisées : 0, 25 ml et 0,7 ml par ml de Ringer. Les animaux sont sacrifiés de 5 minutes jusqu'à 8 heures après l'injection. Les testicules sont fixés selon la technique classique.

2 - Peroxydase et microperoxydase : Ces deux traceurs ont fait l'objet de nombreux essais afin de rechercher une meilleure adaptation des techniques.

Peroxydase (HRP, Peroxydase du Raifort, type II, Sigma ; diamètre moléculaire \approx 5 nm) et microperoxydase (MP, Sigma ; diamètre moléculaire \approx 2 nm). Les concentrations utilisées sont de 1 mg/ml, 2 mg/ml et 4 mg/ml pour des durées d'application de 1, 3, 8, 12 et 24 heures. Les meilleurs résultats sont obtenus pour une solution à 4 mg/ml pendant 24 heures.

Deux types de fixation ont été employées ; les pièces prélevées subissent soit une fixation classique au glutaraldéhyde à 6,25 % en tampon monophosphate de Na/biphosphate de Na 0,1 M à pH 7,2 suivi par un lavage dans

le même tampon, soit une fixation au formaldéhyde à 4 % et au glutaraldéhyde à 5 %, selon la technique de GRAHAM et KARNOVSKY (1966) dans un tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,2 pendant 1 heure 30. Après le lavage, les pièces sont incubées pendant 30 mn à 1 heure à la température ambiante dans un tampon TrisHCl 0,05 M à pH 7,6 contenant 0,01 % H_2O_2 saturé de 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma). Un lavage soigneux à l'eau distillée précède une post-fixation à l'acide osmique 1 % soit dans le tampon phosphate, soit dans le tampon cacodylate selon le cas.

Une autre technique a également été utilisée : après une injection de 10 μ l d'une solution de peroxydase à 4 mg/ml le testicule est fixé par le glutaraldéhyde dans un tampon monophosphate de Na/bi phosphate de Na à pH 7,2 pendant 15 mn. Après trois lavages rapides (5 mn chaque), il est mis à incuber 1 heure dans un tampon Tris HCl 0,1 M à pH 7,4 contenant 0,5 mg/ml de DAB et 0,02 % d' H_2O_2 . Après lavage à l'eau distillée puis au tampon phosphate, les pièces sont fixées par la technique classique (glutaraldéhyde, tétroxyde d'osmium).

3 - 5 Hydroxydopamine (5 OHDA, Sigma ; diamètre moléculaire compris entre 0,5 et 0,7 nm. Trois concentrations différentes ont été utilisées : 0,025 mg/ml, 0,1 mg/ml et 1 mg/ml dans du Ringer additionné de 0,1 % d'acide ascorbique. 5 à 10 mn après l'injection, le testicule est fixé au froid dans la glace pilée (GOTOW et HASHIMOTO, 1981) par le glutaraldéhyde à 3 % et le formaldéhyde à 0,8 % dans un tampon chromate de Na/dichromate de Potassium 0,1 M à pH 7,2 pendant 3 heures. Un lavage (18 heures) dans le même tampon 0,2 M à pH 7,2 suivi par une postfixation à l'acide osmique 2 % toujours dans le même tampon à 4° C pendant 2 heures précèdent la deshydratation et l'inclusion.

4 - Imprégnation par le nitrate de Lanthane : (diamètre moléculaire 0,92 nm ; REVEL et KARNOVSKY, 1967). Les pièces sont fixées (3 heures à température ambiante ou une nuit à 4° C) dans le glutaraldéhyde à 3 % dans un tampon cacodylate 0,1 M à 3% de HCl renfermant 1 % de nitrate de Lanthane. Après lavage dans un tampon cacodylate renfermant 1 % de nitrate de Lanthane, les pièces sont postfixées par le tétroxyde d'osmium à 1 % dans le même tampon.

5 - Imprégnation par l'acide tannique : (MEYRAN, 1982). Après une fixation et un lavage classiques, les pièces prélevées sont postfixées par le tétroxyde d'osmium 1 % dans un tampon veronal sodique/acétate de sodium 0,05 M (tampon Michaelis) à pH 7, puis sont traitées pendant 30 mn à 20° C par 1 % d'acide tannique dans le même tampon.

Les coupes sont examinées, soit non "colorées", soit simplement contrastées par le citrate de plomb(acide tannique) soit enfin contrastées normalement (5OH-DA).

III - Résultats

A - Rappels anatomiques

La paroi du testicule de *L. forficatus* (Pl. XXIII, 1, 2 et 3) est constituée, de l'extérieur vers l'intérieur par six couches successives : un épithélium, une couche de collagène, des faisceaux de muscles longitudinaux, une seconde couche de fibres de collagène, des fibres musculaires circulaires et enfin une dernière couche, épaisse, de collagène. Ces observations confirment celles de CAMATINI et al, (1974).

Les spermatogonies les plus jeunes et les cellules des cloisons de logette s'appuient sur la couche interne de collagène. Les logettes testiculaires renferment les cellules germinales, les stades les plus âgés étant les plus proches du centre du tube testiculaire (différenciation centripète). Rappelons cependant que la spermatogenèse n'est pas continue (JOLY et DESCAMPS, 1969).

B - Pénétration de traceurs dans le testicule

1) Ferritine

Nous avons testé différents temps d'action de cette substance, et, dès 5 minutes après l'injection, la ferritine est visible au niveau de la paroi testiculaire, dans les espaces occupés par le collagène (Pl. XXIII, 2 et 3). Les particules de ferritine semblent cheminer entre les anneaux musculaires (Pl. XXIII, 3) et s'accumuler dans les cellules des cloisons de logettes (Pl. XXIII, 2 ; Pl. XXIV, 1). Quelque soit, la durée du traitement ou l'état testiculaire (animaux injectés ou non avec la 20-OH-ecdysone) les résultats semblent être les mêmes : nous n'avons jamais observé de pénétration dans les cellules germinales.

2) Peroxydase et microperoxydase

Comme pour la ferritine, ces traceurs s'accumulent dans les cellules des cloisons de logettes et ne sont jamais retrouvés dans les spermatoctes, même chez les animaux activés par une injection de 20-OH-ecdysone (Pl. XXIV, 2).

3) 5 - Hydroxydopamine (5 OHDA)

Contrairement aux cas précédents, nous avons pu retrouver de la 5 OHDA dans les spermatoctes. Celle-ci se retrouve dans des vésicules de

pinocytose (Pl. XXV, 2). Une légère pénétration est observée chez les témoins (Pl. XXV, 1) et pour les temps employés (5 à 10 minutes) les vésicules restent cantonnées à la périphérie de la cellule. Chez les animaux activés par l'injection de 20-OH-ecdysone, les vésicules contenant le traceur peuvent se retrouver dans la région périnucléaire (Pl. XXV, 3).

4) Imprégnation par le nitrate de Lanthane

Deux séries expérimentales ont été réalisées : une série hivernale, chez les animaux dont l'activité physiologique est faible et une série printanière, au moment de la reprise d'activité spermatogénétique.

Chez les témoins de la série hivernale, le nitrate de lanthane s'infiltré dans les espaces intercellulaires internes de la cloison de logette (Pl. XXVI, 1). La durée du traitement (3 ou 18 heures) n'influe pas sur la répartition du traceur (Pl. XXVI, 2). Ce n'est qu'après activation par injection de 20-OH-ecdysone que le traceur se retrouve dans les espaces intercellulaires externes, entre logette et spermatocyte. Le traceur peut même alors pénétrer dans le reticulum endoplasmique de certains spermatocytes (Pl. XXVI, 3).

Chez les témoins de la seconde série, le traceur peut déjà être présent dans les espaces intercellulaires externes ; (Pl. XXVII, 1). Chez les animaux activés, le nitrate de lanthane occupe bien sûr les espaces intercellulaires externes (Pl. XXVII, 2), mais aussi certains espaces interspermatocytaires (Pl. XXVIII, 1) et peut même être présent au niveau des pores nucléaires des spermatocytes (Pl. XXVIII, 2).

5) Imprégnation par l'acide tannique

Les images obtenues par l'imprégnation à l'acide tannique confirment celles obtenues par le nitrate de lanthane. Chez les animaux activés, la capture du traceur est importante : il pénètre dans les espaces interspermatocytaires (Pl. XXVIII, 4) et peut également arriver jusqu'aux pores nucléaires (Pl. XXVIII, 5). L'imprégnation reste limitée chez les témoins (Pl. XXVIII, 3).

C - Les jonctions et contacts intercellulaires

La différence de pénétration des traceurs en fonction de l'état testiculaire nous a amené à étudier les relations intercellulaires entre les différents types cellulaires du testicule.

1) Imprégnation par le nitrate de lanthane

- Jonction septée

L'observation de coupes classiques montre que l'espace intercellulaire est occupé par une succession de cloisons ou septes, qui se succèdent souvent avec une périodicité régulière (Pl. XXIX, 1).

Après imprégnation au lanthane, les septes apparaissent comme des rubans clairs (Pl. XXIX, 2 et 3), régulièrement ondulés (période voisine de 20 nm). L'arrangement des septes les uns par rapport aux autres est très variable : la disposition en bandes parallèles, souvent observée, est rarement parfaitement régulière (Pl. XXIX, 3) (leur parallélisme n'est généralement régulier que sur une courte distance). Certains septes peuvent s'écarter les uns des autres, dans les régions où ils présentent une courbure accentuée (Pl. XXIX, 2 et 4).

Les ondulations entre deux septes voisins sont assez souvent en opposition de phase, pouvant même donner l'impression d'un réseau en maille hexagonale (Pl. XXIX, 3), mais plus fréquemment il y a un décalage plus ou moins marqué.

- Jonction gap

L'imprégnation au lanthane révèle la présence de sous-unités d'environ 9 nm de diamètre (Pl. XXIX, 4 et 5) ; leur disposition est variable, le plus souvent sans ordre apparent.

2) Cryofracture

- Jonction septée

La structure intramembranaire révélée par cryofracture apparaît avec une grande netteté au niveau de la jonction septée : la face protoplasmique PF (selon la terminologie de BRANTON et al, 1975) montre des rangées plus ou moins régulières de particules (Pl. XXX, 1, 3 et 4). La face endoplasmique EF présente l'indication des sillons complémentaires (Pl. XXX, 3).

- Jonction gap

Nous avons déjà signalé ce type de jonction entre les spermatoctes et les cellules des logettes. Les jonctions gap assurent donc aussi une communication entre cellules adjacentes d'une même cloison de logette. Rappelons que les particules en agrégat restent fixées préférentiellement sur la face E (Pl. XXX, 2) (PERACCHIA, 1973 a et b).

Des jonctions gap peuvent s'intercaler dans la jonction septée (Pl. XXX, 1).

IV - Discussion

L'ensemble de nos observations permet de dégager un certain nombre de conclusions.

Les traceurs n'ont accès aux logettes testiculaires, ^{quel que} quelque soit l'état d'activation du testicule, qu'en dessous d'un diamètre moléculaire d'environ 1 nm. En effet, la ferritine, la HRP et la MP (diamètres > 2 nm) ne pénètrent jamais dans les espaces intercellulaires externes de la cloison de logette. Ces "gros" traceurs permettent cependant d'une part de visualiser les voies d'accès des métabolites vers l'intérieur du testicule, en l'occurrence tous les espaces occupés par du collagène, et d'autre part de mettre en évidence le rôle de filtre des cellules des cloisons de logettes. Ces traceurs sont en effet captés par ces cellules et stockés dans des vacuoles.

Les traceurs d'un diamètre moléculaire inférieur à 1 nm et en particulier le nitrate de lanthane, mettent en évidence des variations de la perméabilité testiculaire en fonction de l'état physiologique de l'animal. Lorsque cette dernière est minimale, le traceur reste cantonné aux espaces intercellulaires internes de la cloison de logette. Une activation de la physiologie testiculaire naturelle ou expérimentale permet l'accès aux espaces intercellulaires externes, preuve d'un changement de perméabilité au sein des cloisons.

Notons que la 5 OHDA a permis la mise en évidence de vésicules de pinocytose, jamais décrites jusqu'alors chez le spermatocyte de *L. forficatus*.

L'injection de 20 OH-ecdysone entraîne donc une augmentation de la perméabilité testiculaire. Une régulation hormonale comparable avait été suggérée par KAMBYSELLIS et WILLIAMS (1971 a et b) chez les Lépidoptères. Cependant l'utilisation de traceurs n'a pas permis, chez *Hyalophora cecropia* de déterminer si l'ecdysone détermine réellement une augmentation de la perméabilité de la paroi testiculaire ou si elle stimule en fait la synthèse d'un transporteur du "facteur macromoléculaire" qui serait ensuite véhiculé vers le follicule testiculaire *via* le cytoplasme des cellules de soutien (*in* JONES, 1978).

Notons que des résultats diamétralement opposés ont été obtenus chez le criquet *Schistocerca gregaria* (JONES, 1978) : en effet, chez cette espèce l'ecdysone entraîne l'installation prématurée d'une barrière de perméabilité. Chez un autre Orthoptère *Locusta migratoria* (MARCAILLOU *et al.*, 1978), les résultats tout en étant comparables (absence de pénétration du traceur lorsque les taux d'ecdystéroïdes sont les plus élevés) n'ont pas permis la mise en évidence d'une stricte relation de cause à effet. La pénétration de la macromolécule est considérée par ces auteurs comme étant l'expression d'un transport actif, tandis que la période d'imperméabilité serait due à une sorte d'inertie dont la signification demeure inconnue.

L'utilisation de la cryofracture et l'imprégnation par le nitrate de lanthane démontrent la présence de jonctions par opposition aux simples contacts intercellulaires, suivant la terminologie proposée par FRIEND et GILULA (1972).

Nous n'avons observé que des jonctions septées et des jonctions gap. Chez les Arthropodes en effet, les jonctions intercellulaires les plus fréquentes sont du type jonction septée (jonction propre aux Invertébrés, WOOD, 1959) et les jonctions gap (GILULA, 1974 ; SATIR et GILULA, 1973 ; STAEHELIN, 1974).

Les jonctions septées que nous avons observées chez *L. forficatus* sont des jonctions septées plissées, (cf. NOIROT - TIMOTHEE et NOIROT, 1980 ; MEYRAN, 1982). Les caractéristiques géométriques (disposition, dimension des particules, périodicité) sont comparables à celles décrites chez les autres Invertébrés (BULLIVANI et LOEWESTEIN, 1968 ; HAND et GOBEL, 1972 ; NOIROT - TIMOTHEE et NOIROT, 1980). Les septes eux-mêmes semblent avoir une structure hétérogène, comme l'ont déjà supposé plusieurs auteurs (DANILOVA et SELEZNEVA, 1967 ; LEIK et KELLY, 1970 ; NOIROT - TIMOTHEE et NOIROT, 1973 ; STAEHELIN 1974 ; MEYRAN, 1982) et les particules intramembranaires restent retenues sur la face PF. (FLOWER et FILSHIE, 1975 ; DUVERT, 1980 ; NOIROT - TIMOTHEE et NOIROT, 1980 ; MEYRAN, 1982).

Les diverses hypothèses formulées jusqu'à présent quant à la fonction des jonctions septées envisageraient la possibilité de rôles essentiels :

- 1) dans la communication intercellulaire (LOEWENSTEIN, 1966) mais cette hypothèse est devenue caduque à la suite de la coexistence quasi-générale de jonctions gap avec les jonctions septées (STAEHELIN, 1974 ; GRAF, 1978 ; NOIROT-TIMOTHEE et NOIROT, 1980) -
- 2) dans la cohésion cellulaire. Le rôle mécanique semble vraisemblable : en effet fermement attachés aux deux membranes les septes doivent assurer une liaison solide mais dont la rigidité est variable (HAND et GOBEL, 1972 ; NOIROT - TIMOTHEE et NOIROT, 1973 ; GRAF, 1978).
- 3) les jonctions septées sont aussi considérées comme des barrières de perméabilité paracellulaire par des nombreux auteurs (cf. NOIROT - TIMOTHEE et NOIROT, 1980). Ce rôle en tant que barrière de diffusion semble *a priori* le plus évident et pourtant le fait même que cette jonction soit plus ou moins perméable au lanthane limite son rôle d'occlusion. Cependant, HAND et GOBEL (1972), chez l'hydre, constatent que les traceurs, dont le lanthane, ne dépassent pas le 5ème espace interseptal et n'hésitent pas à conclure que les jonctions septées sont bien le siège de la barrière de perméabilité.

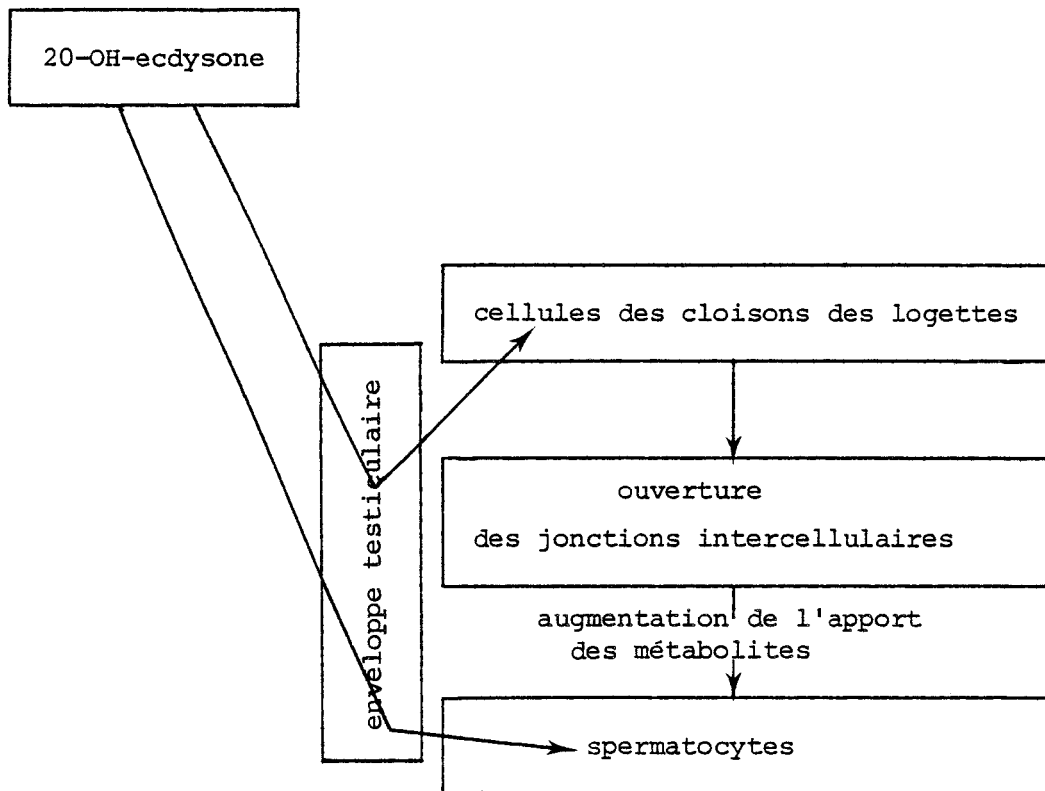


Fig. 13 : Schéma d'action de la 20-OH-ecdysone sur la physiologie testiculaire au cours de la croissance spermatocytaire des *Lithobius*.

Il est donc vraisemblable que les jonctions septées des Invertébrés suppléent les jonctions d'occlusion (tight junctions) propres aux Cordés (SATIR et GILULA, 1973 ; STAECHELIN, 1974 ; GRAF, 1978). Cependant LANE et al., (1974, 1977, 1978) ont montré chez *Limulus* et *Calliphora erythrocephala*, un système de crêtes (face P) et de sillons (face E) assimilés par ces auteurs aux crêtes et aux sillons des "tight junctions".

Chez *L. forficatus* le siège de la barrière de perméabilité semble également se situer au niveau des jonctions septées et être sous le contrôle de la 20-OH-ecdysone. La pénétration du lanthane dans le système réticulaire du spermatocyte et son accumulation au niveau des pores nucléaires est comparable à ce qui a été observé par SHAKLAI et TAUASSOLI (1982).

Il est intéressant de rapprocher nos résultats de ceux qui sont obtenus sur le tube séminifère des Mammifères dans lesquels la différenciation spermiogénétique est également centripète. Dans ce tube, la barrière de perméabilité a pu être localisée très précisément au niveau de "tight junctions". Celles-ci sont localisées d'une part entre les cellules myoïdes de la paroi en certains points de tube séminifère, d'autre part entre les cellules de Sertoli (FAWCETT et al., 1970 ; DYM et FAWCETT, 1970 ; FAWCETT, 1973 ; GILULA, FAWCETT et AOKI, 1976 ; NAGANO et SUZUKI, 1976 ; RUSSELL, 1978). Deux compartiments distincts sont ainsi délimités par les jonctions sertoliennes, le compartiment basal étant réservé aux spermatogonies, le compartiment central aux spermatocytes et aux stades ultérieurs (FAWCETT, 1979). Des observations préliminaires, faites par nous-mêmes et DESCAMPS sur les spermatogonies de *L. forficatus* ou de *Scolopendra cingulata* montrent que chez ces deux espèces les spermatogonies les plus jeunes (cellules souches) sont directement plaquées sur la basale mais séparées des cellules germinales les plus internes par une cloison alors que des stades ultérieurs (de la gonie "âgée" au jeune spermatocyte) sont séparés de la basale par des prolongements des cellules de la cloison de logette qui s'insinuent progressivement entre la cellule et la basale.

Par ces aspects du contrôle de la perméabilité et de délimitation de compartiments nous pourrions donc comparer les cellules des cloisons des logettes testiculaires des Chilopodes aux cellules de Sertoli des Mammifères.

Nos observations, combinées aux résultats antérieurs (DESCAMPS, 1981 ; BENIOURI et al., sous presse) permettent d'établir un schéma récapitulatif de l'action de la 20 OH-ecdysone sur le testicule (Fig. 13). Cette hormone agirait : 1) directement sur les cellules de cloisons de logettes en per-

mettant l'ouverture des jonctions et en favorisant ainsi l'apport des métabolites vers les spermatocytes. 2) directement sur les spermatocytes par l'intermédiaire des jonctions gap. Selon SIMPSON et al., (1977), ce type de jonction permettrait le passage, chez les Insectes, de molécules de 1600 à 1900 daltons (20 OH-ecdysone : 480,6 daltons).

CHAPITRE III

INFLUENCE DE DIVERSES INTERVENTIONS EXPERIMENTALES
SUR LA STRUCTURE ET LE METABOLISME DU SPERMATOCYTE

I - Introduction

L'action stimulatrice de la 20-OH-ecdysone ayant été démontrée sur l'augmentation de perméabilité testiculaire (chapitre II) et le métabolisme de synthèse spermatocytaire (DESCAMPS, 1981a), il était intéressant d'étudier les changements éventuels de la structure de la membrane du spermatocyte accompagnant ces phénomènes.

Afin de disposer d'un élément de comparaison autre que les témoins nous avons utilisé deux moyens différents pour stimuler la croissance spermatocytaire, soit la 20-OH-ecdysone soit l'électrostimulation cérébrale (DESCAMPS, 1978, 1981b).

Nous avons vu par ailleurs dans le chapitre I que le spermatocyte de *L. crassipes* présente toutes les caractéristiques d'une cellule à forte activité de synthèse. Il nous a semblé utile d'envisager l'action de la 20-OH-ecdysone sur ce type de cellule afin de savoir si cette hormone était susceptible d'augmenter encore le métabolisme. Nous avons également tenté d'établir une relation entre le taux d'ecdystéroïdes totaux et l'activité de synthèse.

Cette dernière étude a fait l'objet d'une note (BENIOURI et al., sous presse).

II - Matériel et Techniques

A - Structure de la membrane

Cette étude, menée chez *L. forficatus*, a fait appel aux techniques de la cryofracture exposées antérieurement.

Les animaux opérés reçoivent une injection de 1 µg de 20-OH-ecdysone en solution dans le Ringer alcoolisé à 10 % ou sont stimulés électriquement suivant la technique mise au point par DESCAMPS (1977). La capsule céphalique est alors percée à l'aide d'un bistouri électrique, au niveau de la *pars intercerebralis* et dans la partie postérieure et para-médiane, afin de ne pas léser l'extrémité antérieure du vaisseau dorsal. Les électrodes en argent de 7/100 d'épaisseur sont introduites dans les ouvertures pratiquées. La stimulation appliquée est de 150 µA, en chocs rectangulaires d'1 ms, à la cadence de 5 chocs/s, pendant 10 minutes. Le courant est inversé toutes les 15 secondes pour éviter la polarisation des électrodes.

Les animaux opérés sont fixés 24 heures après l'intervention.

Le dénombrement des particules intramembranaires (PIM) est fait sur des micrographies prises au même agrandissement (X 40.000) et agrandies photographiquement à 120.000. Les spermatoocytes dont les membranes ont servi aux comptages ont été groupés par classe d'âge (diamètre < 50 μm ; entre 50 et 80 μm ; diamètre > 80 μm , indéterminé). Pour chaque classe d'âge 5 à 20 cellules ont servi aux mesures. Celles-ci sont effectuées sur 10 à 12 surfaces membranaires, choisies au hasard.

La densité des particules est exprimée en PIM par μm^2 .

Les mesures de surface et le calcul du nombre de PIM ont été réalisés sur une unité de comptage électronique (MOP/AMOI, Kontron) à l'Institut Pasteur de Lille (Unité INSERM n° 167).

B - Corrélation entre taux d'ecdystéroïdes et croissance spermatocytaire.

Les recherches ont été réalisées sur des *Lithobius crassipes* (L. Koch), mâles adultes. Cette espèce, de taille réduite (13 mm), est relativement abondante dans la litière des forêts du Nord de la France.

Deux séries expérimentales ont été réalisées :
une série hivernale et une série printanière.

Ces périodes d'intervention ont été choisies en fonction des résultats obtenus chez *L. forficatus*, chez qui ont été mises en évidence une faible activité physiologique hivernale et une activité spermatogénétique printanière (JOLY, 1966 ; JOLY et DESCAMPS, 1969 ; DESCAMPS, 1981a).

a) Etude ultrastructurale

Les animaux reçoivent une dose unique de 0,1 μg de 20 OH-ecdysone en solution dans du Ringer alcoolisé à 10 %. Compte tenu du poids des animaux (10 mg), cette dose correspond à celle qui s'est révélée la plus efficace chez *Lithobius forficatus* (1 μg pour un poids moyen de 100 mg) (DESCAMPS, 1977, 1981).

Les animaux sont sacrifiés 24 heures, 48 heures, 72 heures, 7 jours et 20 jours après l'injection de 20-OH-ecdysone.

Le testicule est fixé selon la technique classique

b) Etude autoradiographique

Afin de pouvoir comparer les résultats à ceux qui sont obtenus lors de l'étude ultrastructurale, les animaux reçoivent une même dose de 20 OH-ecdysone et sont sacrifiés après les mêmes laps de temps.

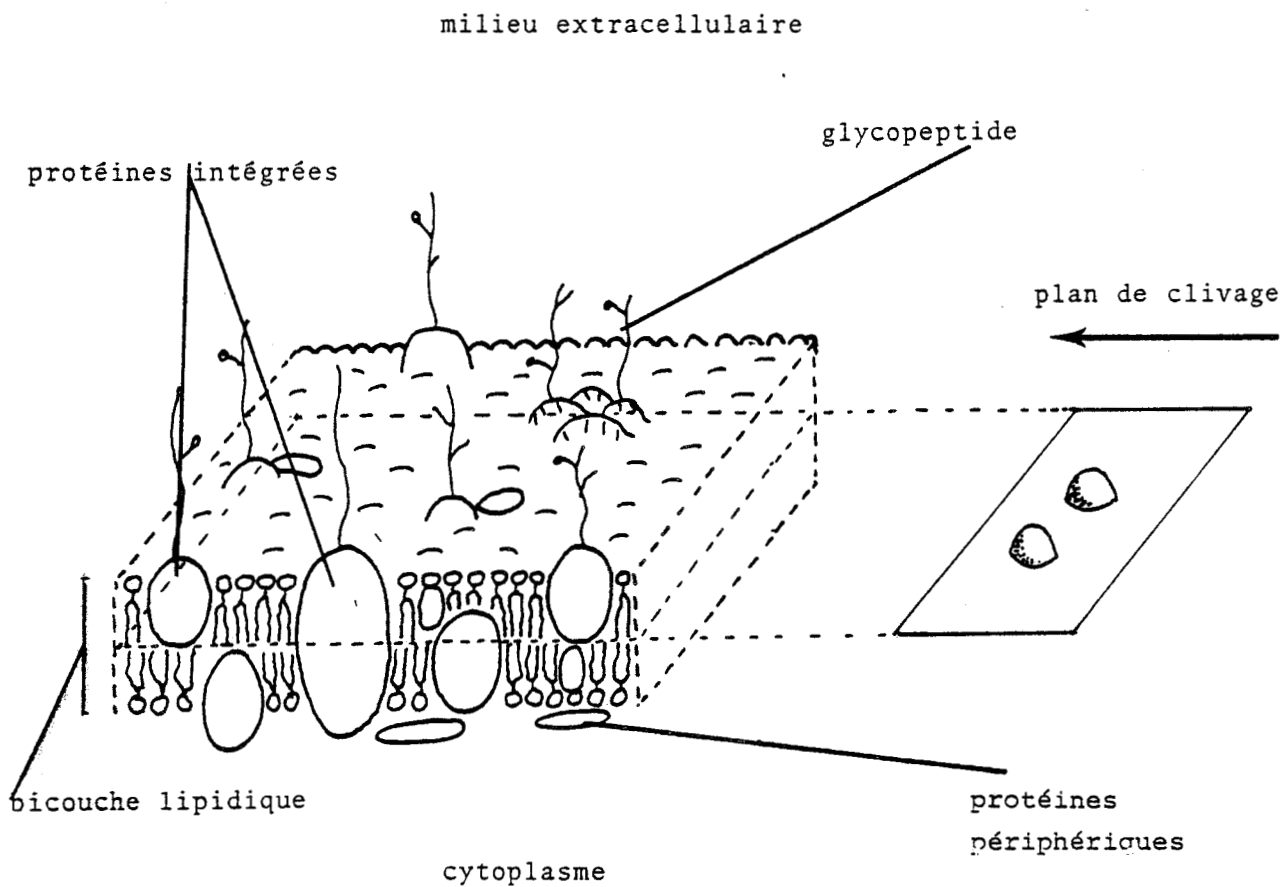


Fig. 14 - Architecture moléculaire de la membrane plasmique.

La membrane est constituée de phospholipides et de protéines hydrophobes. Les protéines sont enchassées dans la bicouche phospholipidique. Le cryodécapage révèle des particules intramembranaires qui correspondent aux molécules protéiques.



Les précurseurs utilisés sont la (³H) L-Leucine (activité spécifique 25 Ci/mM ; 0,6 µ Ci/animal) et la (³H) uridine (activité spécifique 30 Ci/mM ; 0,8 µ Ci/animal). Les temps d'incorporation (8 heures pour la Leucine et 48 heures pour l'uridine) sont comparables à ceux qui ont été retenus chez *L. forficatus* (DESCAMPS, 1981).

Les coupes semi-fines, émulsionnées à l'Ilford K5 sont révélées par le Kodak D 19 b.

L'étude autoradiographique quantitative a été réalisée

- soit par comptage des grains sur une surface de référence (500 µm²) dans le cas d'un marquage assez faible.

- soit à l'aide d'un cytophormètre Leitz MPV équipé d'un diaphragme de mesure de 500 µm² lorsque le marquage est plus intense.

Quelle que soit la méthode employée, 20 mesures ont été faites pour chaque animal. Deux témoins et deux animaux injectés sont utilisés pour chaque temps de fixation.

c) Dosage radio-immunologique des ecdystéroïdes

Les dosages, réalisés par P. PORCHERON (Laboratoire de cytophysiologie des Arthropodes ERA n° 620, Université de Paris VI), sont effectués individuellement sur 10 mâles de *Lithobius crassipes* et 10 mâles de *Lithobius forficatus* en période hivernale.

Chaque animal est broyé dans 1 ml de méthanol. Après centrifugation le surnageant est conservé et le culot lavé par 1 ml de méthanol. Pour chaque échantillon, les 2 extraits méthanoliques sont rassemblés et évaporés à sec. Les extraits secs sont ensuite dilués dans un tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,4) et utilisés pour le dosage radioimmunologique des ecdystéroïdes dans les conditions précédemment décrites (PORCHERON et al., 1976 ; PORCHERON, 1979). Dans ce dosage l'ecdysone et la 20 OH-ecdysone sont reconnus de la même façon par les anticorps ; les autres ecdystéroïdes sont moins immunoréactifs. La courbe de référence est obtenue avec la 20 OH-ecdysone ; les résultats sont donc exprimés en picogrammes équivalents de 20 OH-ecdysone par animal ou par milligramme de poids frais.

III - Résultats

A - Structure de la membrane

1) Terminologie

Lors de la cryofracture des membranes biologiques, la séparation des feuilletts se fait préférentiellement au sein de la zone hydrophobe c'est-à-dire entre les extrémités des acides gras des phospholipides et met en évi-

TABLEAU II - REPARTITION DES PARTICULES INTRAMEMBRANAIRES CHEZ LE SPERMATOCYTE
(série hivernale)

Classe d'âge	Face de fracture	TEMOIN		ECDYSONE		ST <u>PI</u>	
		E	P	E	P	E	P
< 50 µm	Nombre de PIM/µm ² (moyenne)	870	1279				
	Nombre total de PIM/µm ²	2149					
	Rapport $\frac{P}{E}$	1,47					
50 à 80 µm	Nombre de PIM/µm ² (moyenne)	318±48	1420±253	188±95	822±136	290±90	1492±178
	Nombre total de PIM/µm ²	1738 ± 301		1010 ± 231		1782 ± 268	
	Rapport $\frac{P}{E}$	4,47		4,38		5,20	
80 - 100 µm	Nombre de PIM/µm ² (moyenne)			113			
	Nombre total de PIM/µm ²						
	Rapport $\frac{P}{E}$						
Indéterminé	Nombre de PIM/µm ² (moyenne)	331	1092	332	591		
	Nombre total de PIM/µm ²	1423		923			
	Rapport $\frac{P}{E}$	3,30		1,78			

E : face exoplasmique ; P : face protoplasmique ; P/E : coefficient de partage.

Les écarts-type ne sont mentionnés que pour la classe 50 - 80 µm.

dence des particules intramembranaires (fig. 14).

Nous avons adopté la nomenclature proposée par BRNTON et al. (1975) pour désigner les faces de fracture : le feuillet adjacent au cytoplasme porte alors le nom de face protoplasmique ou face P et son complémentaire celui de face exoplasmique ou face E.

2) Etude de la répartition des PIM

L'observation des membranes révèle une certaine régularité dans la distribution horizontale des PIM. De plus, ^{quel que} soit l'intervention expérimentale, le nombre de particules attachées à la face P est toujours supérieur à celui de la face E (Pl. XXXI, 1, 2, 3 et 4) ; ce qui conduit à déterminer le coefficient de partage (CHAILLEY, 1979) c'est-à-dire le rapport des densités de particules des faces P et E ($\frac{P}{E}$).

Le nombre total de PIM (face P + face E) nous a paru être également un paramètre important pour la caractérisation de la membrane.

a - Série hivernale

* Témoins

La membrane plasmique est riche en PIM (fig. 15) les cellules jeunes (<50 μm) semblant les mieux pourvues (fig. 15). Le nombre total de PIM varie de 1423 à 2149 suivant les classes avec cependant une dissymétrie des deux feuillets. Le rapport $\frac{P}{E}$ atteint une valeur de 4,47 dans le cas des spermatocytes en phase de croissance (classe 50 - 80 μm). La densité de PIM est alors de $1420 \pm 253/\mu\text{m}^2$ sur la face P ; elle n'est que de $318 \pm 48/\mu\text{m}^2$ sur la face E (tableau II).

* Injection de 20-OH-ecdysone

La dissymétrie entre face P et E existe toujours ; le rapport $\frac{P}{E}$ est quasi-identique à celui des témoins pour les membranes des spermatocytes de la même classe d'âge ($\frac{P}{E} = 4,38$ pour la classe 50 - 80 μm). Par contre la densité en PIM est nettement moins élevée, le nombre total de particules se réduisant alors à $1010 \pm 231 \text{ PIM}/\mu\text{m}^2$.

La répartition des particules sur les faces P et E est respectivement de $822 \pm 136/\mu\text{m}^2$ et $188 \pm 95/\mu\text{m}^2$. Ces densités sont donc inférieures de moitié environ à celles trouvées chez les témoins (tableau II ; fig. 15).

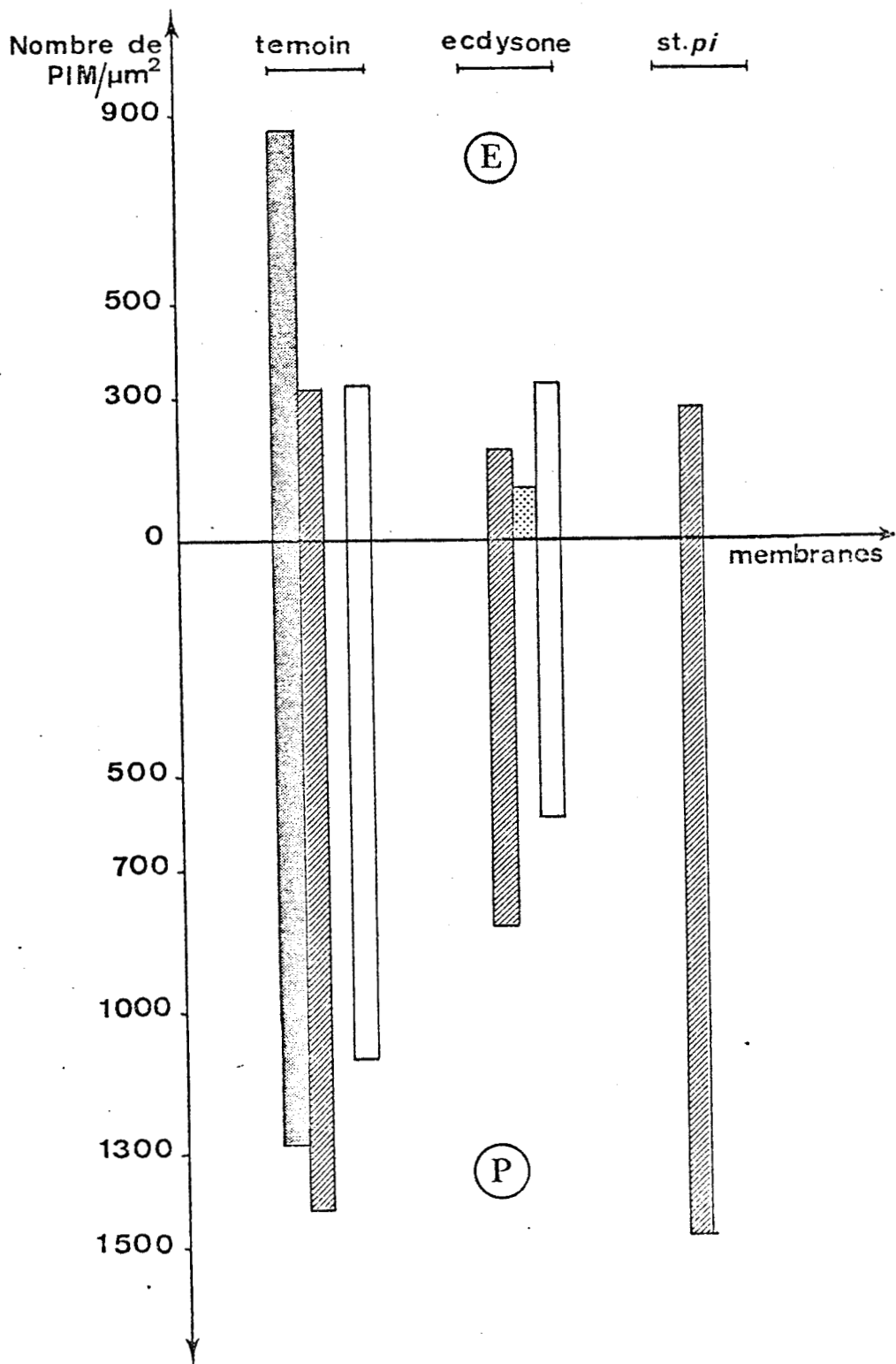


Fig. 15 - Histogrammes de répartition des PIM (série hivernale) selon les hémimembranes exoplasmique (E) ou protoplasmique (P). Ecdysone : animaux ayant reçu une injection de 1 μg de 20-OH-ecdysone. st. pi : animaux ayant subi l'électrostimulation de la *pars intercerebralis*. : classe < 50 μm ; : classe 50-80 μm ; : classe 80-100 μm ; : indéterminé.

TABLEAU III - REPARTITION DES PARTICULES INTRAMEMBRANAIRES CHEZ LE SPERMATOCYTE
(série printanière)

Classes d'âge	Face de fracture	TEMOIN		ECDYSONE		ST <u>PI</u>	
		E	P	E	P	E	P
> 50 μm	Nombre de PIM/ μm^2 (moyenne)		1528	192	839		597
	Nombre total de PIM/ μm^2			1031			
	Rapport $\frac{P}{E}$			4,36			
50 - 80 μm	Nombre de PIM/ μm^2 (moyenne)	468±18	1110±153	259±190	661±48	368±52	1316±190
	Nombre total de PIM/ μm^2	1577 ± 171		920 ± 238		1684 ± 242	
	Rapport $\frac{P}{E}$	2,37		2,55		3,57	
80 - 100 μm	Nombre de PIM/ μm^2 (moyenne)		1294	266	749		
	Nombre total de PIM/ μm^2			1015			
	Rapport $\frac{P}{E}$			2,8			

E : face exoplasmique ; P : face protoplasmique ; P/E : coefficient de partage.

Les écarts-types ne sont mentionnés que pour la classe 50-80 μm .



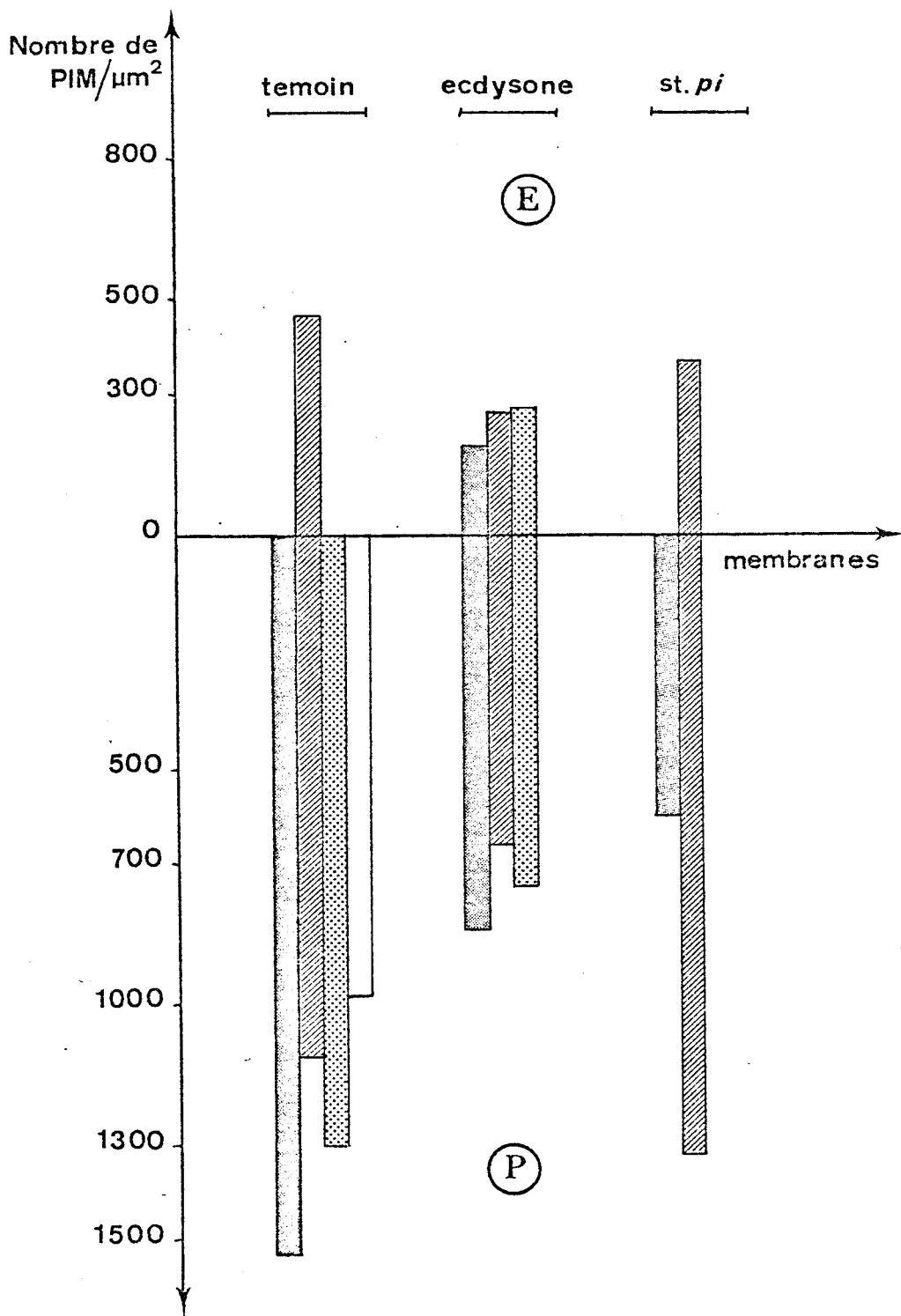


Fig. 16 - Histogrammes de répartition des PIM (série printanière) selon les hémimembranes exoplasmique (E) ou protoplasmique (P). Mêmes légendes que pour la figure 15.

* Stimulation de la *pars intercerebralis*

Dans ce cas, la densité des particules est élevée ($PE + EF = 1782 \pm 268$ particules/ μm^2) et comparable à celle observée chez les témoins. Il y a encore une différence entre les deux faces, mais le rapport $\frac{P}{E}$ est nettement plus élevé (5,20) que dans les cas précédents. (tableau II, fig. 15). L'augmentation du rapport $\frac{P}{E}$ est due à un appauvrissement en PIM de la face E, mais le nombre de PIM pour chaque face ne présente pas une différence significative avec celui des témoins (test de Student : $t = 0,174$, $P > 0,10$ pour les faces E, $t = 0,0746$, $P > 0,10$ pour les faces P).

b - Série printanière

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau III, fig. 16. Rappelons que pendant cette période les spermatocytes sont en phase de synthèse active.

Les variations de la densité des particules dans les trois classes d'âge sont comparables à celles déterminées dans la série hivernale, mais avec des valeurs numériques plus faibles (tableau III ; fig. 16).

Pour les cellules de la classe 50-80 μm , la face P de la membrane chez les témoins révèle 1110 ± 153 particules/ μm^2 et la face E 468 ± 18 particules/ μm^2 . Le rapport $\frac{P}{E}$ est inférieur à celui des témoins hivernaux ($\frac{P}{E} = 2,37$).

Chez les animaux ayant reçu une injection de 20-OH ecdysone, nous avons pu observer comme précédemment une diminution, par rapport aux témoins, du nombre de PIM (cf. tableau III). Le rapport $\frac{P}{E}$ reste comparable à celui des témoins.

Chez les animaux ayant subi l'électrostimulation de la *pars intercerebralis* les membranes des spermatocytes possèdent un nombre total de PIM supérieur à celui des témoins, (1684 ± 242 particules/ μm^2) alors que la dissymétrie est plus accentuée ($P/E = 3,57$) la face P étant plus riche en particules (1316 ± 190 particules/ μm^2) et la face E plus pauvre (368 ± 52 particules/ μm^2) (tableau III ; fig. 16). La différence entre la face E des stimulés et celle des témoins est très hautement significative (test t de student : $t = 56,5$, $P < 0,001$; par contre pour les faces P, elle n'est pas significative ($t = 1,84$, $P > 0,10$)).

B - Corrélation entre taux d'ecdystéroïdes et croissance spermatocytaire

1) Série hivernale

Chez les témoins, comme nous l'avons signalé antérieurement, les

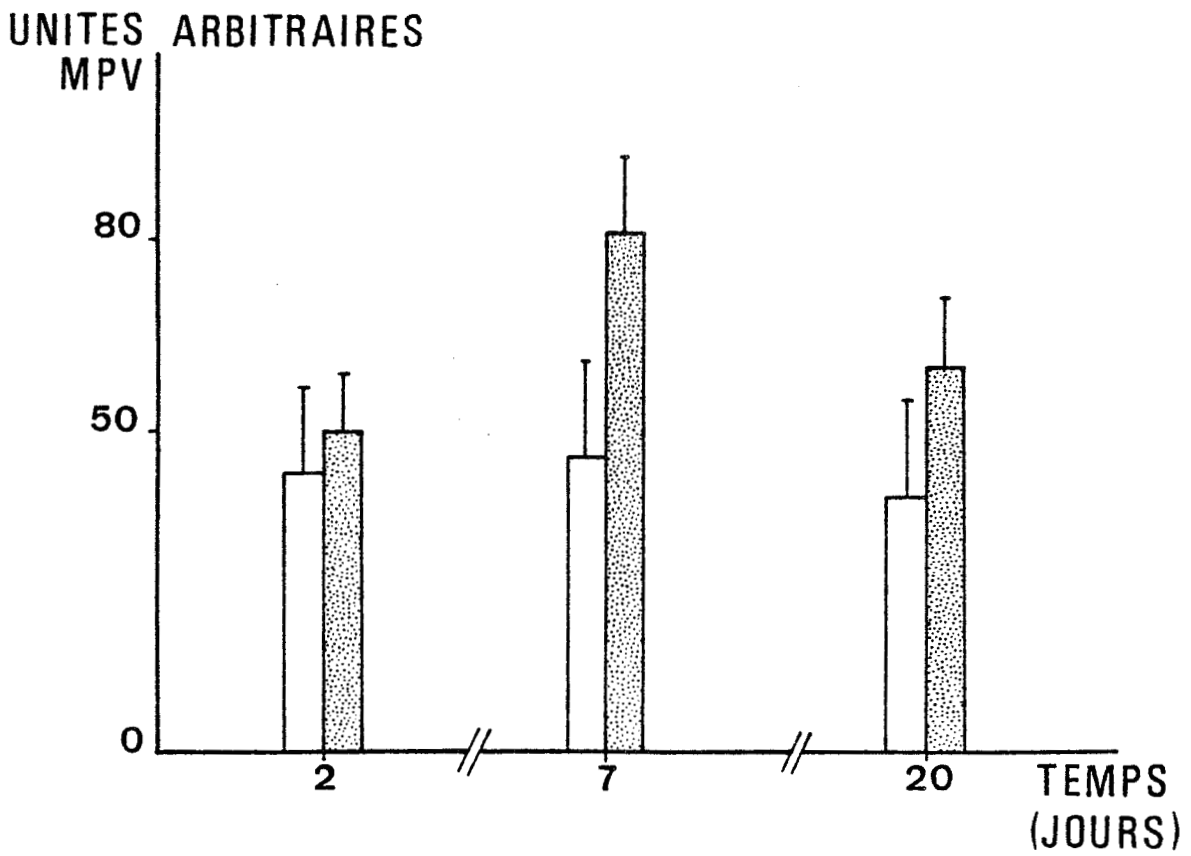


Fig. 17 - Incorporation de ^3H Uridine dans les spermatocytes de *L. crassipes*. Série hivernale. En clair : témoins ; en grisé : animaux injectés.



spermatocytes (Pl.I, 3, 4 et 5 ; Pl.II, 1, 2 et 3) présentent une activité synthétique déjà importante. Cependant, dès 24 h. après l'injection de 20-OH-ecdysone, le nucléole présente des figures de bourgeonnement (Pl. XXXII, 1) plus nombreuses que chez les témoins et le transit de matériel fibrillo-granulaire vers le cytoplasme est plus important (Pl. XXXII, 2).

Vingt jours après l'injection, les figures d'échanges sont toujours nettement plus nombreuses que chez les témoins.

L'activité cytoplasmique est également plus importante que celle qui est constatée chez les témoins. Le réticulum endoplasmique est plus développé et présente parfois des dilatations 1, 2 ou 3 jours après l'injection (Pl. XXXII, 4). Les dictyosomes sont toujours très nombreux et sécrètent abondamment (Pl. XXXII, 3 et 4).

Il est à noter que l'apport de 20 OH-ecdysone provoque une augmentation du nombre de dégénérateurs spermatocytaires.

Après l'étude autoradiographique, les résultats obtenus confirment ceux qui sont observés lors de l'étude ultrastructurale. L'incorporation d'uridine est utilisée comme indice de synthèse, mesurée au cytophotomètre et exprimée en unités arbitraires MPV, elle est plus élevée durant toute la durée de la série expérimentale. Si l'augmentation moyenne n'est que faible chez les animaux 2 jours après l'injection elle devient maximale à 7 jours et reste importante à 20 jours (fig. 17).

L'injection d'ecdystéroïdes détermine donc chez *L. crassipes* une augmentation du métabolisme de synthèse spermatocytaire, résultat comparable à celui qui a été obtenu chez *L. forficatus* (DESCAMPS, 1981). L'activité de synthèse étant plus élevée chez les témoins de *L. crassipes* que chez ceux de *L. forficatus*, nous avons recherché les taux d'ecdystéroïdes totaux chez les deux espèces. Les dosages ont été effectués pendant la période d'activité physiologique minimale, afin d'éliminer au maximum les variations du taux d'ecdystéroïdes en relation avec le cycle de mue (JOLY et al., 1979).

Les moyennes et écarts types obtenus à partir de 10 mesures sont les suivants :

L. crassipes : $148,2 \pm 69$

L. forficatus : $287,5 \pm 92,39$

Le poids moyen des *L. forficatus* étant environ 10 fois plus élevé que celui de *L. crassipes*, il y a donc proportionnellement 5 fois plus d'ecdystéroïdes chez cette dernière espèce.

TABLEAU IV

état testiculaire	témoins	20-OH ecdysone	
spermatocytes			
état préméiotique	[18 ± 3]	[14 ± 3]	(24h)
divisions de maturation			
spermatides	[17 ± 5]	[21 ± 5]	(2j, 3j, 7j)
spermatides spz			
reprise de croissance spermatocytaire	[51 ± 9]	[59 ± 6]	(20j)

Evolution du marquage après incorporation de ³H Uridine . Les chiffres entre crochets correspondent au nombre moyen de grains et à l'écart type par unité de surface de référence. Les chiffres entre parenthèses représentent le laps de temps écoulé entre l'injection et la fixation.



Rapportés à 10 mg de matière vivante, les taux d'ecdystéroïdes présentent une différence très hautement significative avec le test t de Student : $t = 5,42$, $p < 0,001$.

2) Série printanière

L'intérêt de cette série réside dans le fait que l'injection de 20 OH-ecdysone est faite chez des animaux dont les spermatoocytes vont subir les divisions de maturation. Les spermatoocytes sont alors en phase de synthèse très active et l'étude ultrastructurale ne permet pas de mettre en évidence de différences significatives entre les animaux ayant subi ou non une injection de 20 OH-ecdysone.

L'étude autoradiographique montre une faible incorporation des précurseurs pendant toute la période des divisions de maturation ; les synthèses ne reprennent que lorsque ces divisions sont terminées. Ces résultats sont valables aussi bien pour les témoins que pour les animaux injectés.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IV.

Rappelons que les dosages de 20-OH-ecdysone n'ont pas été effectués dans la série printanière car les résultats auraient pu être faussés par les variations provoquées par la reprise d'une activité normale du cycle de mue.

III - Discussion

Comme l'ont démontré JAMIESON et PALADE (1967), au cours de tout processus métabolique, la membrane plasmique est mise en jeu. Notre étude en cryofracture nous a permis de mettre en évidence un changement de la structure interne de la membrane en fonction de l'évolution normale du cycle spermatogénétique ou en fonction des séries expérimentales. Dans tous les cas l'activation expérimentale se traduit par une diminution du nombre de PIM au niveau de la face E. Cependant le nombre total des PIM comparé aux témoins hivernaux ne diminue que chez les témoins de printemps et les animaux injectés à la 20-OH-ecdysone. Par contre, le nombre total de PIM a tendance à augmenter après électrostimulation de la *pars intercerebralis*.

Les PIM, protéines ou complexes protéiques incorporés dans la bicouche lipidique, sont susceptibles de mouvement à l'intérieur de celle-ci. Ces mouvements vraisemblablement en relation avec les capacités de transport ou de fixation sur les récepteurs peuvent être horizontaux (RAPOPORT et al., 1981) ou verticaux (FUNK et al., 1982), provoqués par l'action d'hormones (vasopressine, RAPOPORT et al.) ou par les conditions d'élevage (température, FUNK et al.).

Il semblerait que dans le cas de *L. forficatus* il s'agisse d'un glissement vertical des PIM suite à la stimulation du métabolisme (diminution du nombre de PIM de la face E dans tous les cas), ce glissement étant très important et entraînant un abaissement du nombre de PIM visibles dans le cas de l'injection de 20-OH-ecdysone.

La différence constatée entre les deux techniques d'activation pourrait avoir deux origines : la stimulation de la *pars intercerebralis*, plus physiologique que l'injection de 1 µg de 20-OH-ecdysone entraînerait des effets moins spectaculaires mais également un accroissement plus rapide du taux des neurohormones libérées dans l'hémolymphe (relargage maximum 2 heures après l'intervention, JOLY et DESCAMPS, 1977) que l'injection d'ecdystéroïdes (maximum d'incorporation au niveau des cellules neurosécrétrices au 3ème jour après l'opération (JAMAULT-NAVARRO, JOLY, DESCAMPS, 1983). De ce fait il est possible que ce soient la (les) neurohormone(s) qui ^{sont} ~~soit~~ responsables de l'augmentation du nombre de PIM après électrostimulation (augmentation du nombre de récepteurs ? cf. HOLLENBERG, 1981).

La différence d'action constatée entre les deux techniques d'activation semble en accord avec l'hypothèse émise par DESCAMPS (1981b) concernant le contrôle de la croissance spermatocytaire à la fois par la 20-OH-ecdysone et une hormone issue de la *pars intercerebralis*.

Des études ultérieures, à différents moments après l'intervention, permettront peut-être de confirmer cette hypothèse d'un contrôle au moins bihormonal.

L'activité synthétique mise en évidence par les études ultrastructurales et autoradiographiques est nettement plus importante chez *L. crassipes*, au point que chez les témoins de cette espèce l'aspect d'un spermatocyte est comparable à celui d'un spermatocyte activé chez *L. forficatus* (après stimulation de la *pars intercerebralis*, ablation des glandes cérébrales ou injection de 20 OH-ecdysone ; DESCAMPS, 1978, 1981). Ce fait peut trouver une explication dans la différence très importante entre les taux relatifs d'ecdystéroïdes totaux présents dans chacune de ces espèces.

La durée de l'action de la 20 OH-ecdysone est plus longue chez *L. crassipes* que chez *L. forficatus* : après une injection d'ecdystéroïde le pouvoir de synthèse reste plus élevé que chez les témoins, durant au moins 20 jours chez *L. crassipes* et seulement 7 jours chez *L. forficatus*. Il semble que ce résultat puisse s'expliquer par le fait que la stimulation du spermatocyte de *L. crassipes*, dont le métabolisme de base est plus élevé, serait plus aisée.

L'augmentation du nombre des dégénérateurs après injection de 20-OH-ecdysone est en accord avec les observations faites chez *L. forficatus* (DESCAMPS, 1977).

L'ecdysone agirait : 1 - directement sur la cellule germinale, comme c'est le cas général pour l'action des stéroïdes sur les cellules cibles (BEAULIEU, 1978). 2 - indirectement par l'intermédiaire de certaines cellules neurosécrétrices de la *pars intercerebralis* qui sont activées par la 20 OH-ecdysone (JAMAULT-NAVARRO et al., 1983).

La conjugaison des deux effets est d'ailleurs vraisemblable ; d'autres actions non encore décrites sont également possibles.

Les ecdystéroïdes n'agissent sûrement pas seuls sur la régulation de la croissance spermatocytaire ; en effet, la faible incorporation des précurseurs marqués dans les spermatocytes en cours de croissance alors que le testicule renferme également des spermatocytes en division de maturation pourrait s'expliquer soit par une insensibilité temporaire à l'action de l'ecdysone, soit par l'installation d'une barrière de perméabilité.

L'installation d'une telle barrière, déjà évoquée dans le chapitre précédent, correspond à un changement des "besoins" de la cellule germinale : d'un côté se trouvent les cellules les plus jeunes. (gonies et jeunes spermatocytes) de l'autre les cellules qui vont subir les divisions de maturation ou les stades spermiogénétiques. Ce phénomène semble être au moins commun aux Insectes (cf. SZOLLOSI et MARCAILLOU, 1977 ; JONES, 1978) et aux Vertébrés (RUSSELL, 1978 ; FAWCETT, 1979 ; FRANCHI et al., 1982).

CHAPITRE IV

MISE EN EVIDENCE EXPERIMENTALE DE L'ACTION DE DIFFERENTS
NEUROTRANSMETTEURS SUR LA CROISSANCE SPERMATOCYTAIRE

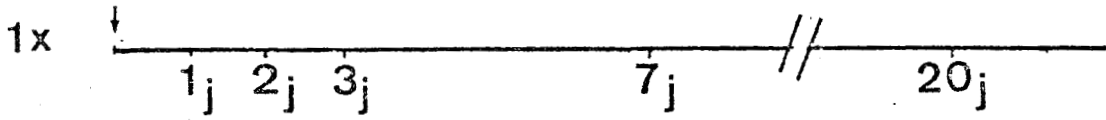


Fig. 18 - Protocole expérimental : injection unique (flèche).

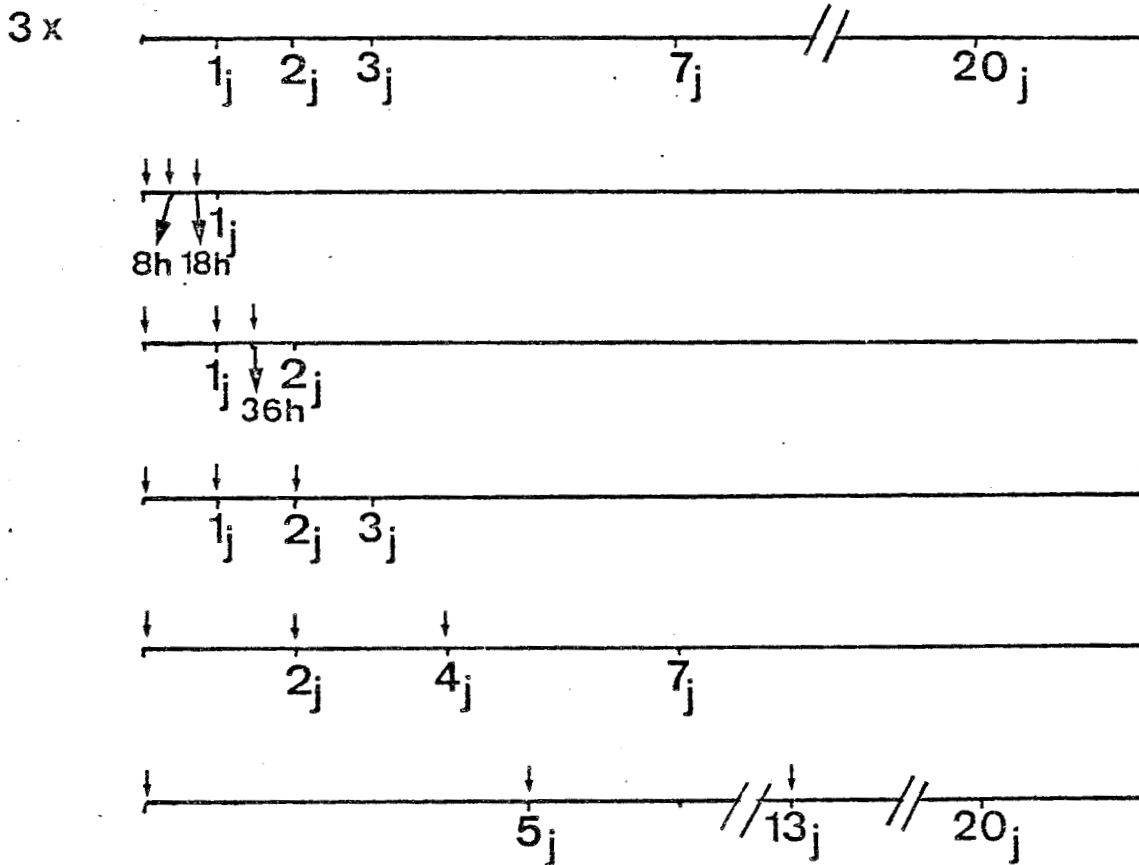


Fig. 19 - Protocole expérimental : injections triples (flèches).



I - Introduction

Le cerveau de *L. forficatus* est impliqué dans le contrôle de divers processus physiologiques, mue (JOLY, 1966), spermatogenèse (DESCAMPS, 1974, 1975), ovogenèse (HERBAUT, 1975, 1976). Par ailleurs, différents neurotransmetteurs peuvent exercer une action sur l'activité électrique cérébrale (DESCAMPS et LASSALLE, sous presse). Il semblait donc intéressant d'étudier le rôle, indirect par l'intermédiaire du système nerveux, de certains neurotransmetteurs et de quelques-uns de leurs agonistes et antagonistes sur la croissance spermatocytaire.

II - Matériel et Techniques

Nos recherches entreprises sur *L. forficatus*, ont fait appel aux techniques de la microscopie électronique et de l'autoradiographie. Deux séries expérimentales ont été réalisées : une série hivernale et une série printanière.

A - Etude autoradiographique

Les animaux opérés reçoivent soit une injection simple (Fig. 18), soit 3 injections (Fig. 19) de 1 µl d'une solution à 10^{-4} M dans le Ringer du produit testé. Cette dose correspond à celle qui s'est révélée efficace sur l'activité électrique cérébrale (DESCAMPS et LASSALLE, sous presse). Les différents produits utilisés sont : la 3-hydroxytyramine (Dopamine, DA, Sigma), la phenylhydrazine (Sigma), la 5 hydroxytryptamine (5-HT, sérotonine, Sigma), l'imipramine (Sigma), la réserpine (Serva), l'acide γ -aminobutyrique (GABA, Sigma) et la picrotoxine (Sigma).

Les animaux sont sacrifiés 24 heures, 48 heures, 72 heures, 7 jours et 20 jours après l'injection. Les séries printanières ont été limitées à 7 jours.

Deux précurseurs ont été utilisés : la (^3H) L-leucine (activité spécifique 25 Ci/mM ; 6 µCi/animal) et la (^3H) Uridine (activité spécifique 30 Ci/mM ; 8 µCi/animal). Les doses et les temps d'incorporation (8 heures pour la Leucine et 48 heures par l'Uridine) sont celles précédemment utilisées par DESCAMPS (1981 a).

Les coupes sont émulsionnées soit à l'Ilford K5 (semi-fines), soit au Kodak NTB_{III} (coupes à la paraffine).

Les lames émulsionnées sont conservées à l'obscurité en atmosphère sèche pendant 12 jours (semi-fines) ou 8 jours (coupes à la paraffine) puis révélées par le Kodak D19 b.

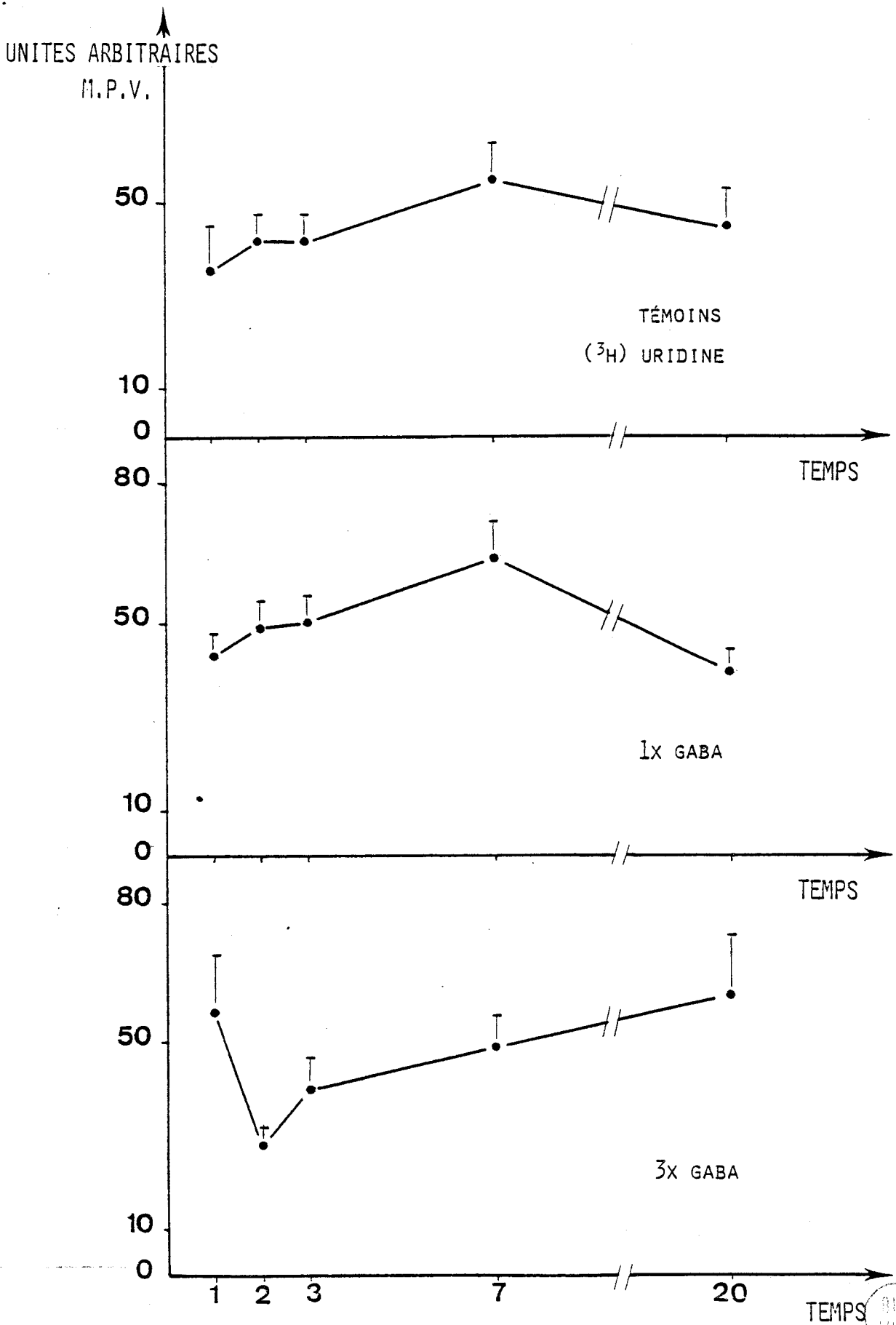


Fig. 20 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) après incorporation de (^3H) Uridine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de GABA.

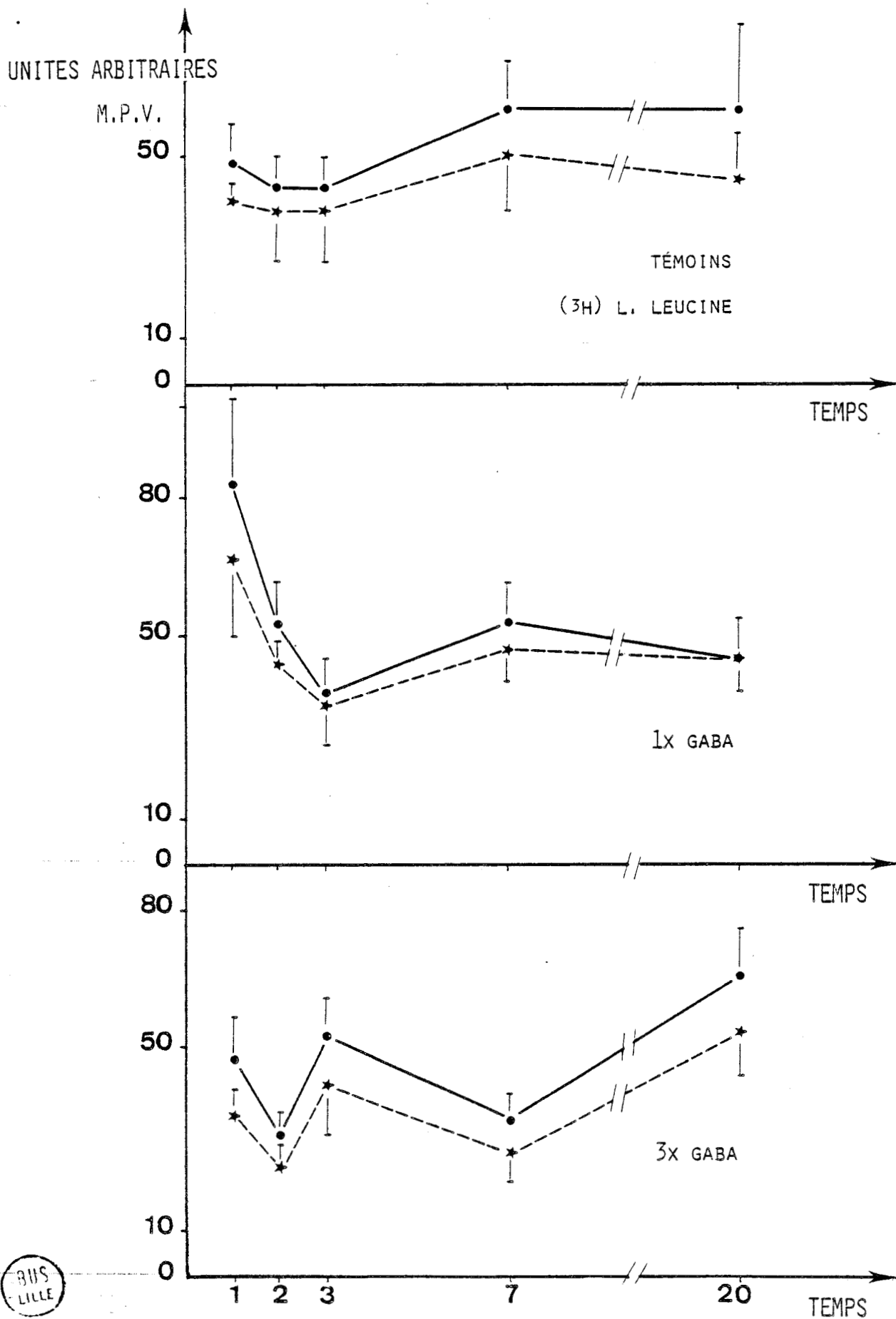


Fig. 21 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) dans le noyau (•—•) ou le cytoplasme (x---x) après incorporation de (³H) L-leucine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de GABA.

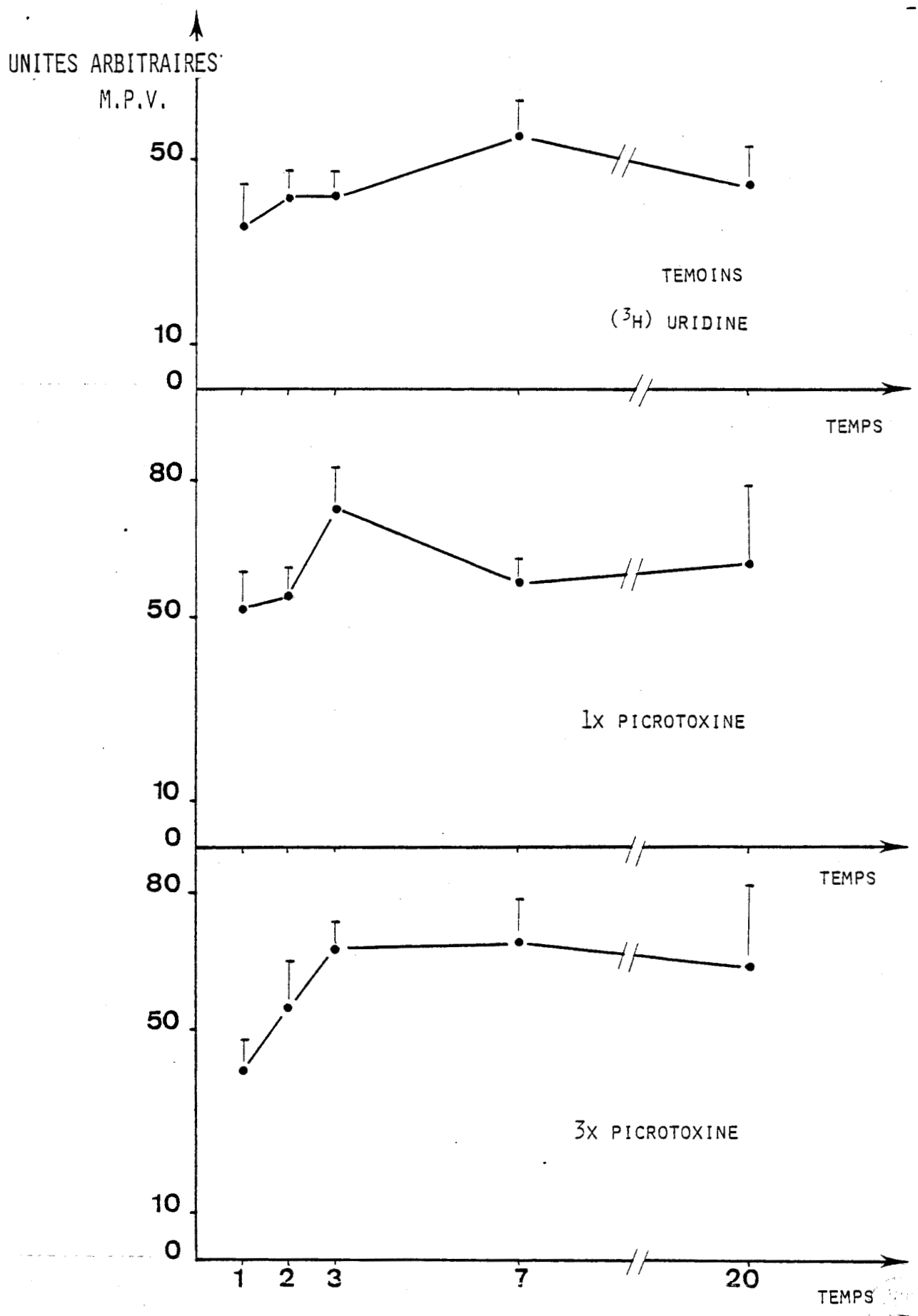
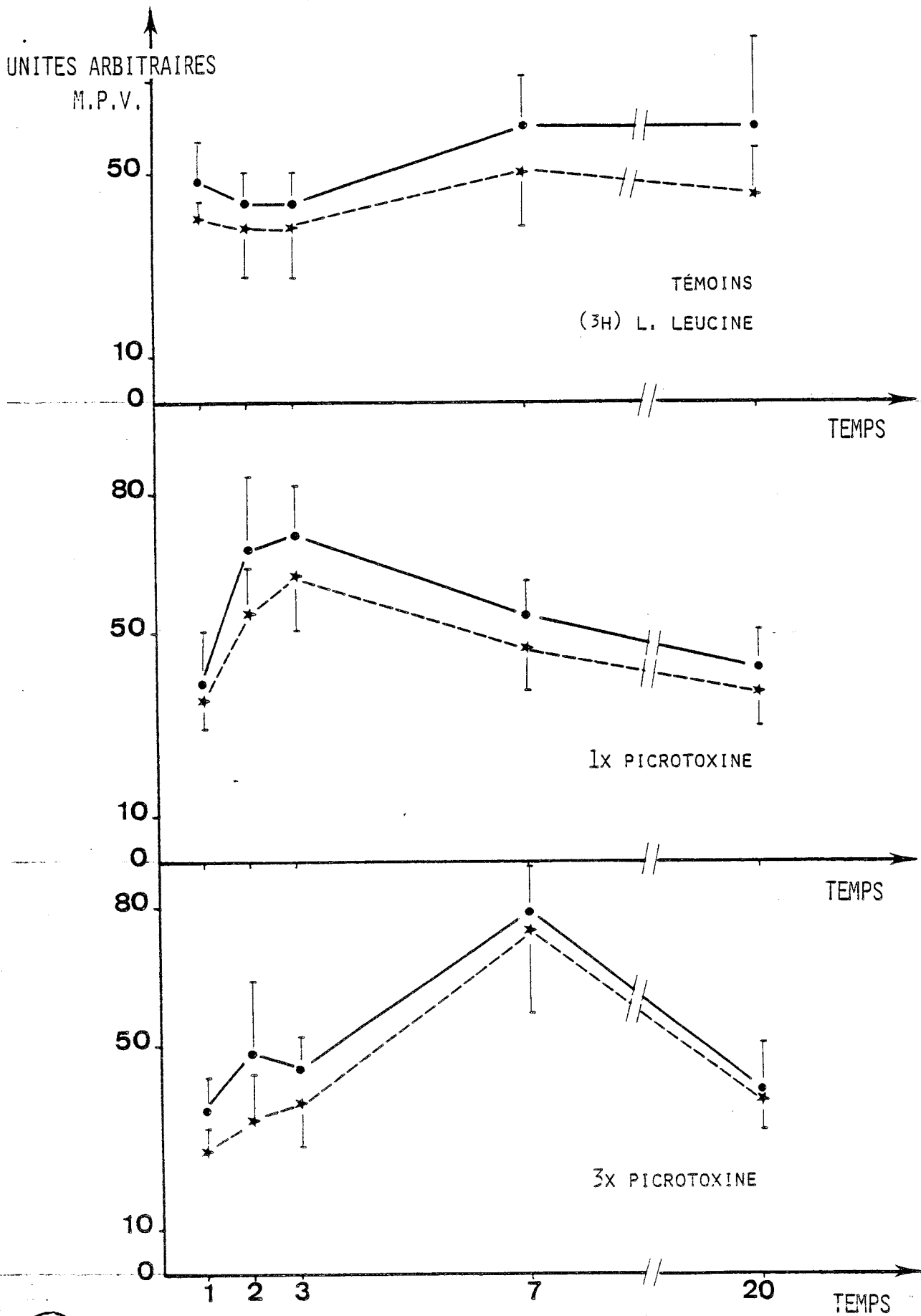


Fig. 22 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) après incorporation de ³H) Uridine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de picROTOXINE.





BNS
LILLE

Fig. 23 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) dans le noyau (•—•) ou le cytoplasme (x--x) après incorporation de (^3H) L-leucine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de picROTOXINE.

L'étude autoradiographique quantitative a été réalisée suivant les méthodes décrites dans le chapitre III.

B - Etude ultrastructurale

Afin de pouvoir comparer les résultats à ceux qui sont obtenus lors de l'étude autoradiographique, les animaux reçoivent une même dose de différents produits et sont fixés après les mêmes durées selon la technique classique.

III - Résultats

A - Série hivernale

1) GABA et PicROTOXINE

L'étude autoradiographique de l'incorporation des pré-curseurs après injection de GABA (Figs 20 et 21) montre que ce neurotransmetteur n'a pas d'effet sur l'incorporation de l'uridine (Fig. 20) après une injection unique. Par contre, dans le cas de la triple injection, des différences significatives par rapport aux témoins sont constatées pour 2 jours ($n = 38$; $t = 2,405$; $0,01 < p < 0,02$) et pour 20 jours ($n = 38$; $t = 4,48$; $p < 0,001$).

Aucune différence n'est constatée par rapport aux témoins après injection unique de GABA et utilisation de la ^3H L-leucine (Fig. 21) comme précurseur, sauf au jour 1 où l'incorporation est nettement plus importante. Après triple injection, l'incorporation est significativement plus faible aux jours 2 ($n = 38$; $t = 5,134$; $p < 0,001$) et 7 ($n = 38$; $t = 7,91$; $p < 0,001$) alors qu'elle est plus élevée au jour 20 ($n = 27$; $t = 2,17$; $0,02 < p < 0,05$). La courbe d'incorporation prend ici l'allure d'une pseudosinusoïde.

Après injection de picROTOXINE, antagoniste du GABA (Figs 22 et 23), l'incorporation d'uridine est significativement plus importante aux jours 2 et 3 pour une injection unique alors que cette augmentation visible aussi dès le jour 2 après injection triple reste très nette pendant toute la durée de la série expérimentale et est encore très significativement supérieure à celle des témoins au jour 20.

Après utilisation de la leucine (Fig. 23) nous constatons aussi une augmentation de l'incorporation du précurseur aux jours 2 et 3 après injection unique, et au jour 7 seulement après injections répétées.

Nous voyons donc que les injections de picROTOXINE entraînent une augmentation de l'incorporation, alors que globalement le GABA ne

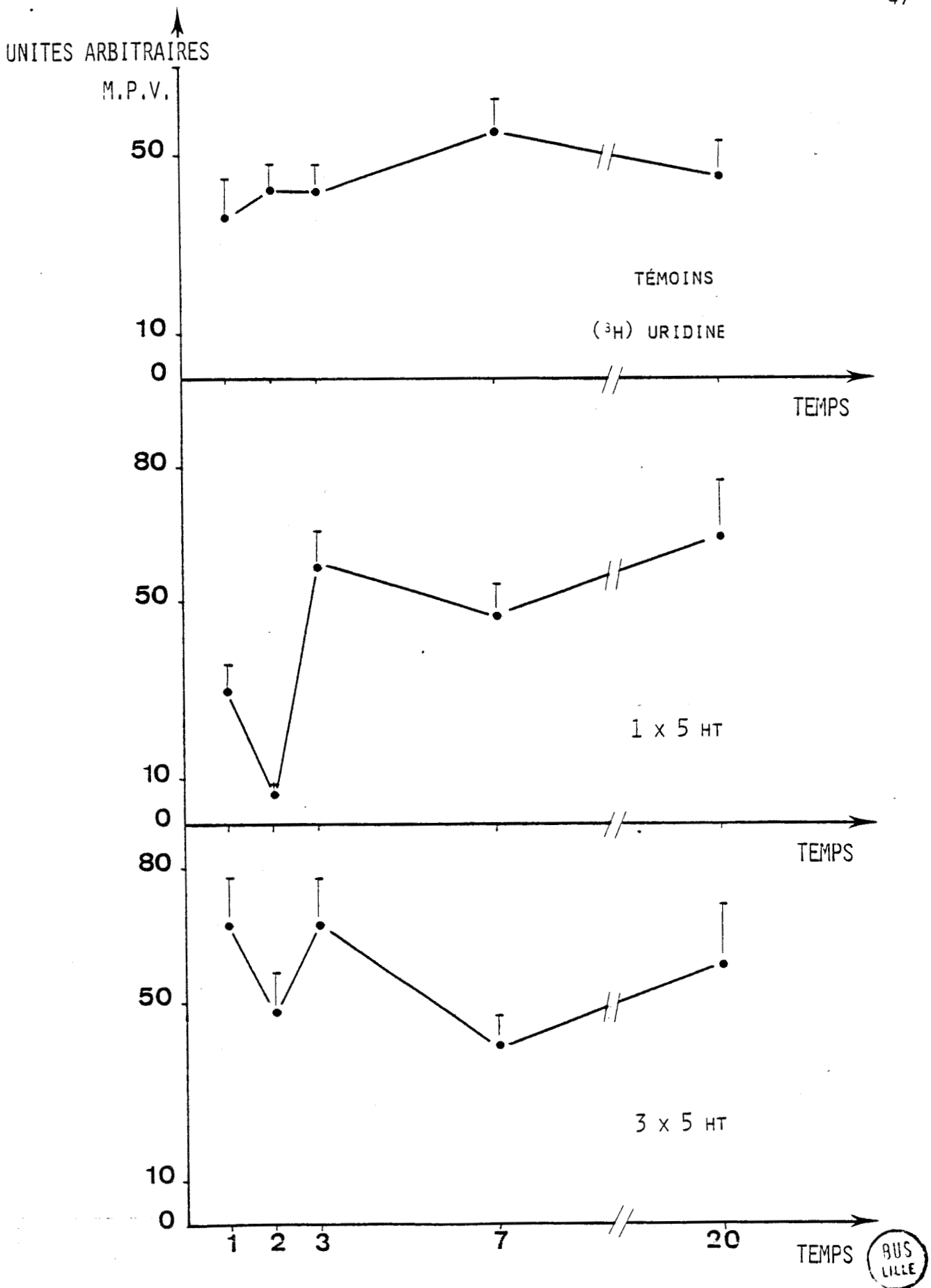


Fig. 24 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) après incorporation de (³H) Uridine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de 5 HT.

BUS
LILLE

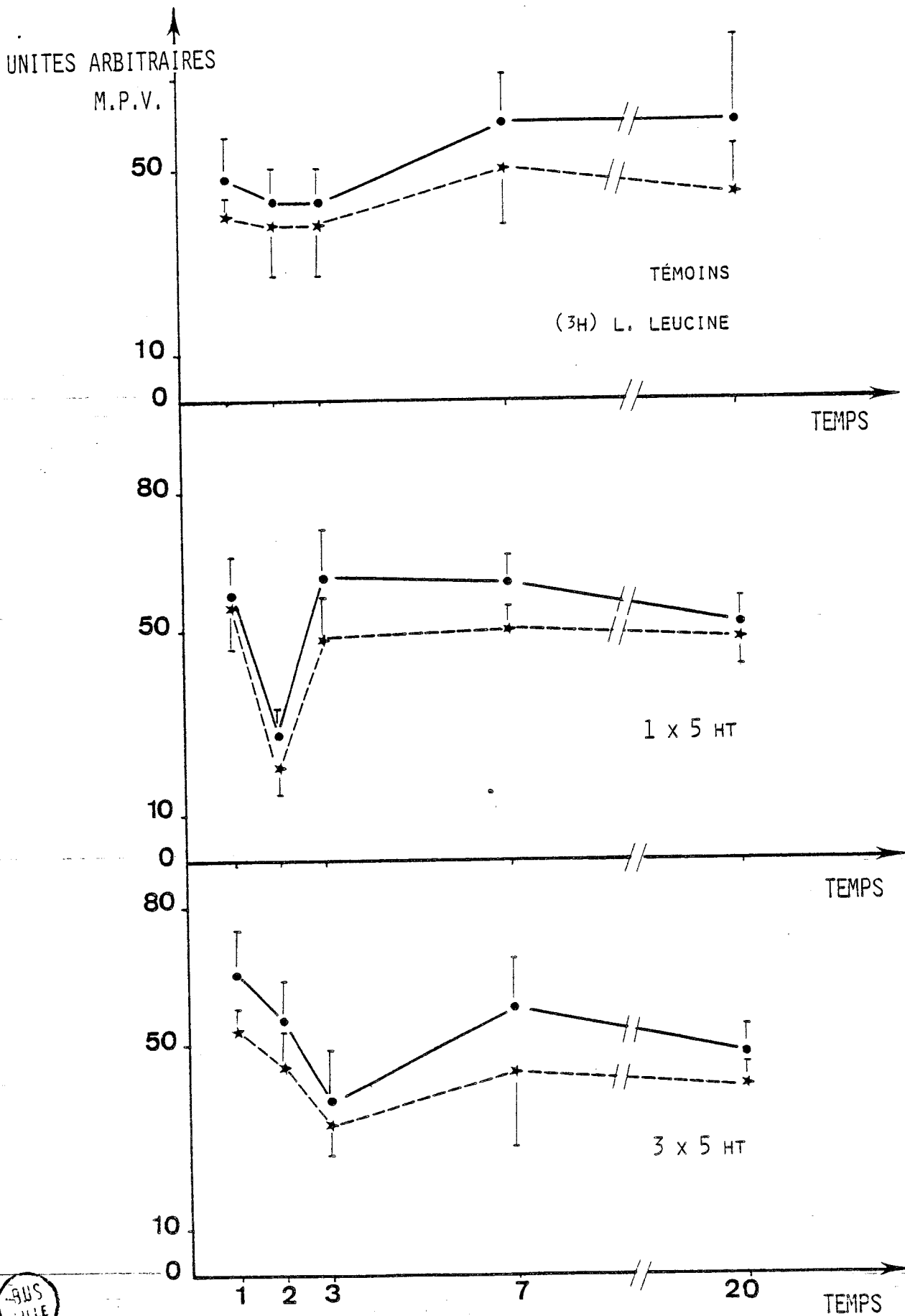


Fig. 25 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) dans le noyau (●—●) ou le cytoplasme (x--x) après incorporation de (³H) L-leucine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de 5 HT.

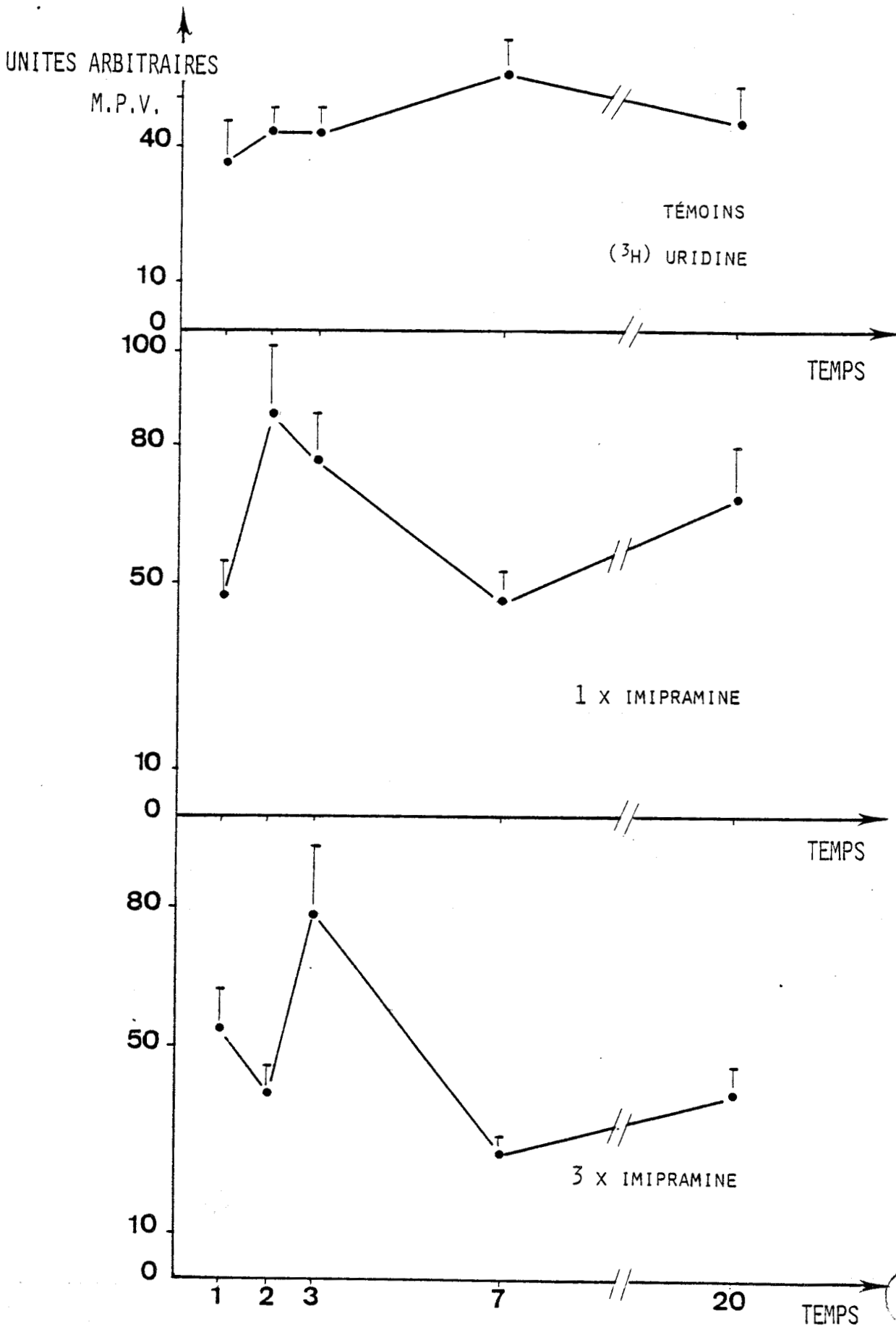


Fig. 26 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) après incorporation de (^3H) Uridine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) d'Imipramine.



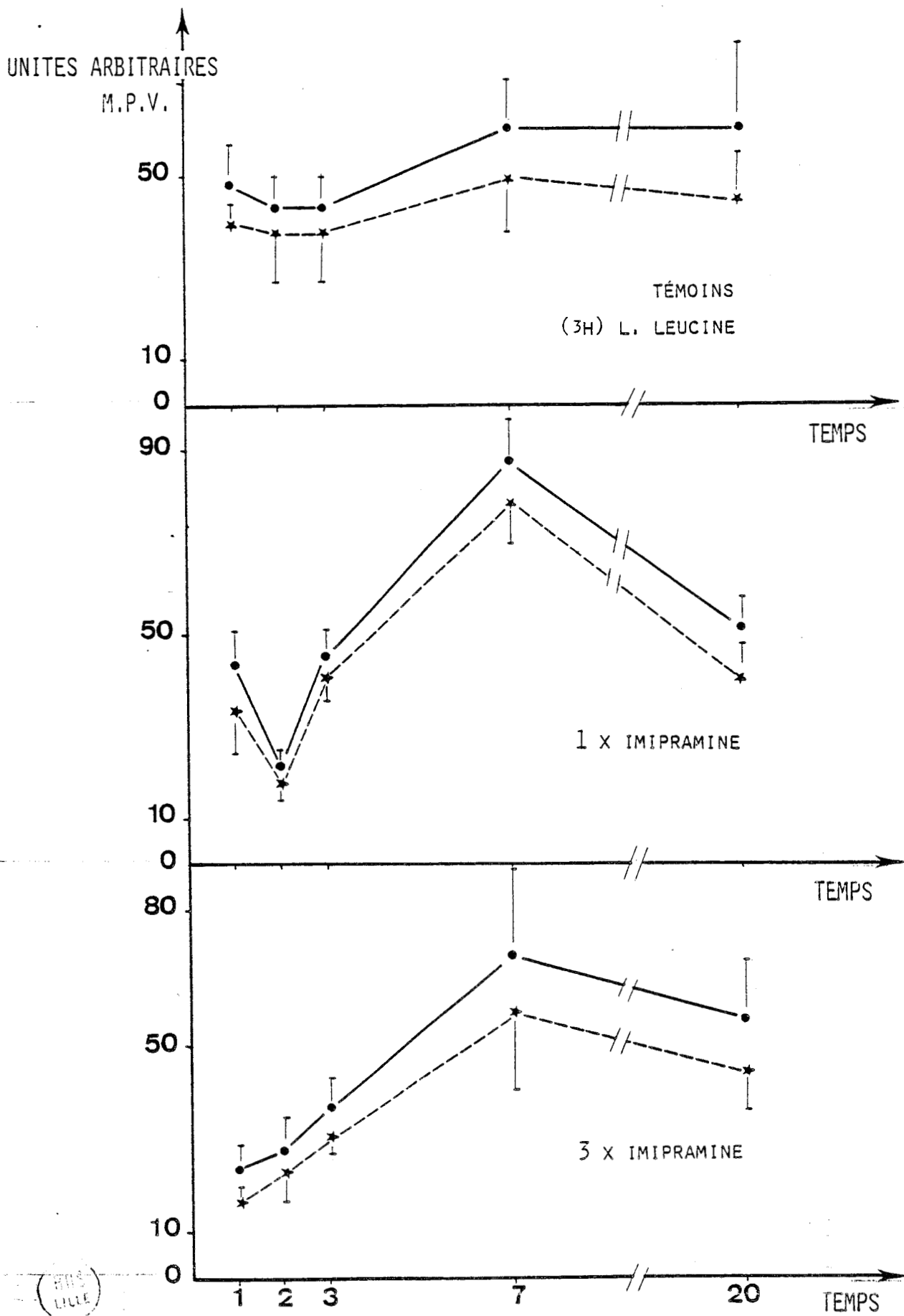


Fig. 27 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) dans le noyau (•—•) ou le cytoplasme (x---x) après incorporation de (³H) L-leucine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) d'Imipramine.

MS
DUE

semble pas avoir d'effet.

2) 5 HT et Imipramine

Après injection unique de 5 HT l'incorporation d'uridine (Fig. 24), faible et significativement inférieure à celle des témoins aux jours 1 et 2, devient par contre significativement supérieure aux jours 3 et 20. Après injections répétées une stimulation de l'incorporation peut être constatée aux jours 1, 2, 3 et 20. Seul le jour 7 montre une chute de l'incorporation ($n = 38$; $t = 6,44$; $p < 0,001$). L'aspect des courbes, aux amplitudes près, est cependant le même dans les deux cas, avec alternance d'un point haut et d'un point bas.

Les courbes d'incorporation de leucine (Fig. 25) montrent elles aussi des alternances point haut point bas mais ce phénomène est plus amorti que pour l'incorporation d'uridine.

L'examen des courbes montre cependant que lorsque l'injection est suffisamment rapprochée du moment de la fixation (6 heures avant le jour 1 dans le cas des injections répétées) la 5 HT a un effet stimulateur. L'alternance de points hauts et de points bas serait ensuite le résultat d'une balance entre deux systèmes antagonistes.

L'étude ultrastructurale confirme cet effet stimulateur (Pl. XXXV, 1). Le transit de matériel fibrillogranuleire vers le cytoplasme est plus important que chez les témoins (Pl. XXXV, 2). L'activité cytoplasmique est également plus importante. L'ergastoplasme est très développé (Pl. XXXV, 1).

Après injection d'imipramine (agoniste non spécifique de la 5 HT) la courbe d'incorporation de l'uridine (Fig. 26) montre comme précédemment une alternance plus ou moins régulière de points hauts et de points bas. Les effets sont en moyenne stimulateurs tout au moins jusqu'au jour 3. Par contre l'effet stimulateur sur les synthèses protéiques n'est visible qu'au jour 7 (Fig. 27) l'incorporation de leucine étant plus faible que chez les témoins au début des séries expérimentales.

Les différences constatées entre les deux produits testés, 5 HT et imipramine, pour les deux précurseurs utilisés pourraient avoir au moins deux causes : 1) l'imipramine, qui empêche le stockage du neurotransmetteur, n'est pas parfaitement spécifique de la 5 HT, et peut donc intervenir dans d'autres systèmes entraînant une réponse complexe ; 2) deux systèmes hormonaux antagonistes pourraient être contrôlés par des synapses sérotoninergiques. Cependant, en fonction de la prépondérance de l'un ou de l'autre ou de la plus grande rapidité de réponse de

BUS
LILLE

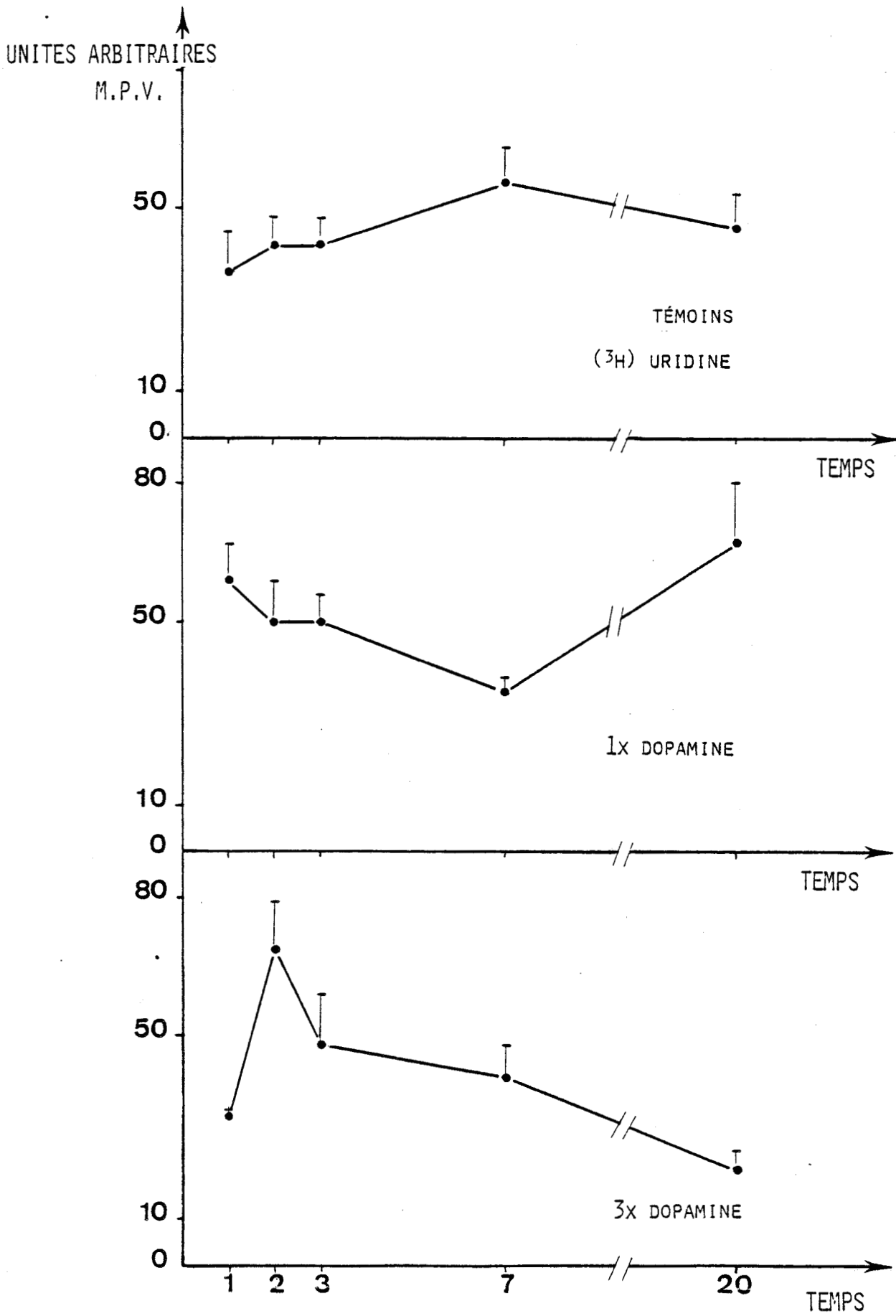


Fig. 28 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) après incorporation de (^3H) Uridine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de Dopamine.



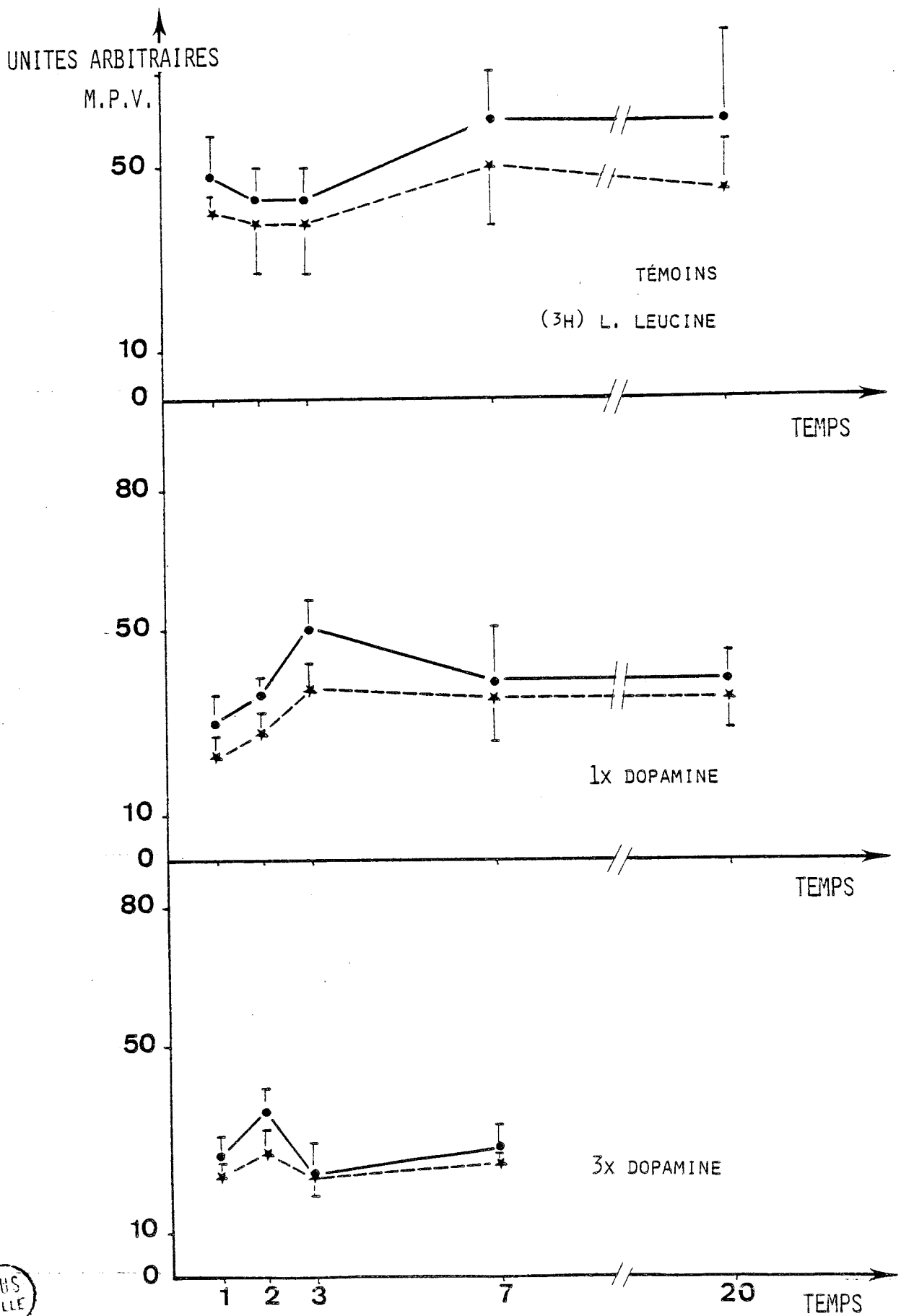


Fig. 29 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) dans le noyau (•—•) ou le cytoplasme (x--x) après incorporation de (^3H) L-leucine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de Dopamine.

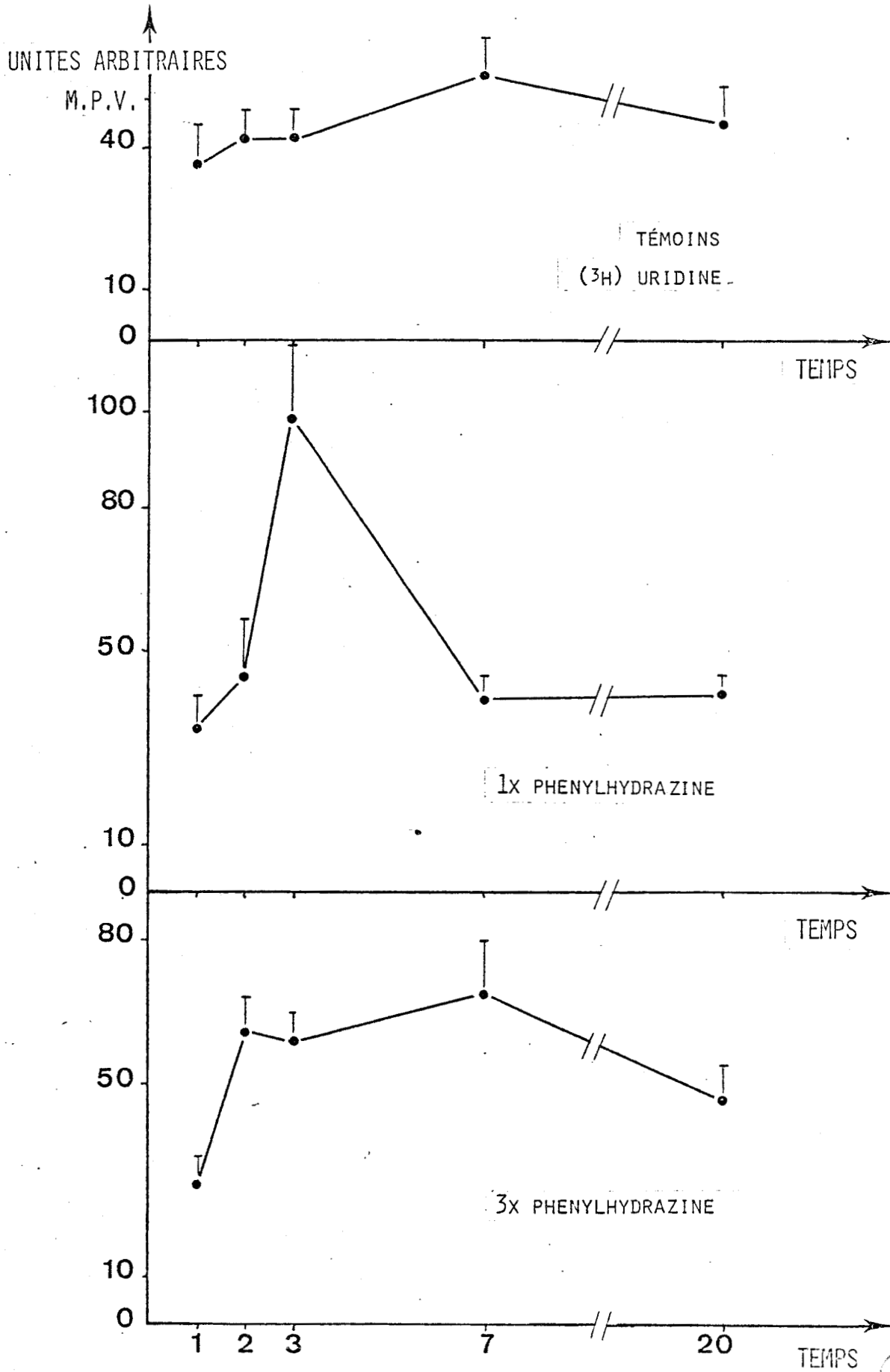


Fig. 30 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) après incorporation de (³H) Uridine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de Phenylhydrazine.



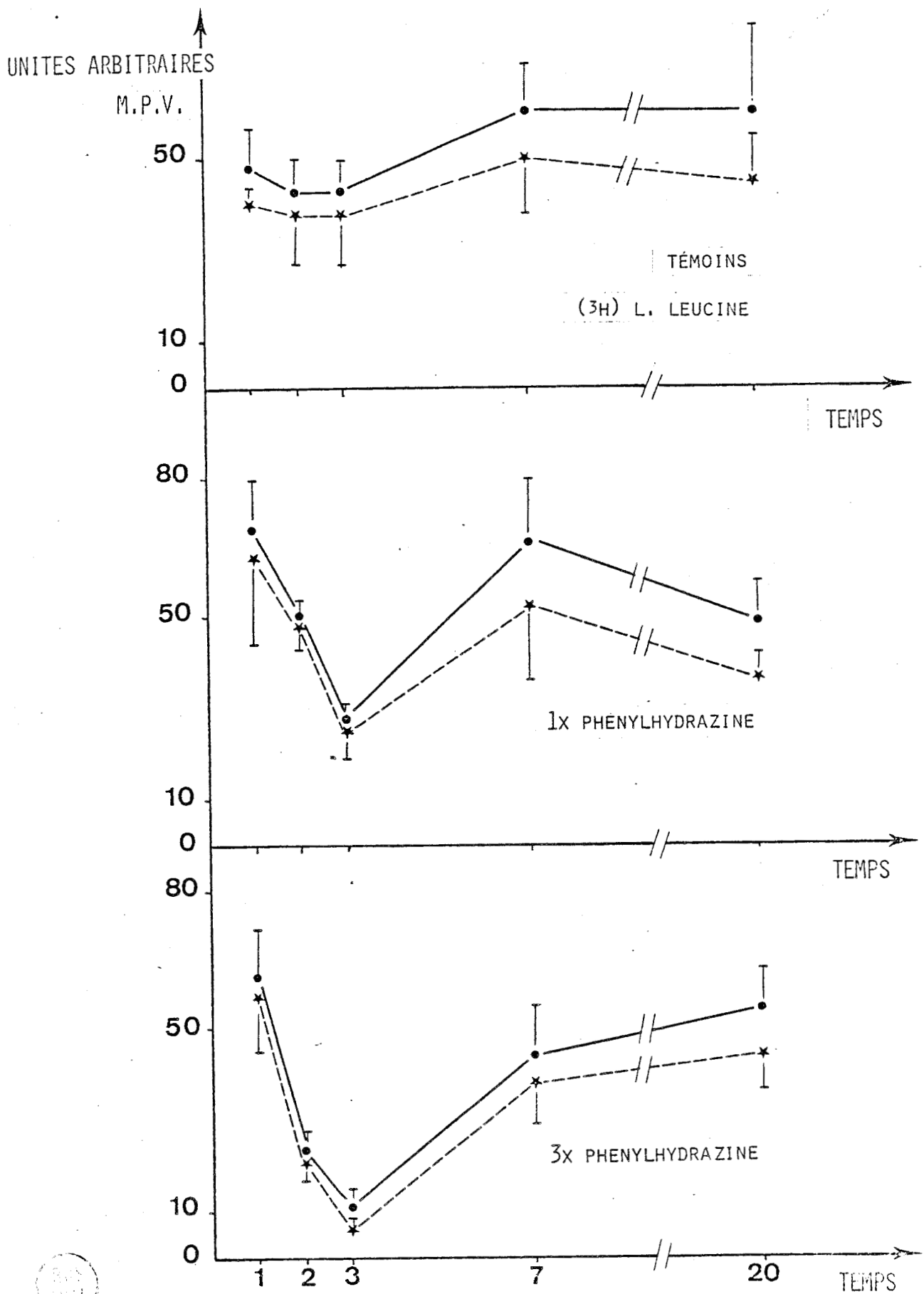


Fig. 31 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) dans le noyau (•—•) ou le cytoplasme (x---x) après incorporation de (³H) L-leucine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de Phenylhydrazine.

l'un ou de l'autre ou du synergisme avec d'autres systèmes, les effets négatifs ou positifs se feraient plus ou moins sentir, soit sur les synthèses d'ARN, soit sur les synthèses protéiques en fonction des hormones concernées.

3) Dopamine et phenylhydrazine

L'injection de dopamine produit des effets sur l'incorporation d'uridine plutôt stimulateurs après injection unique et plutôt inhibiteurs après injections multiples (Fig. 28). Par contre, injections uniques et répétées entraînent une diminution significative de l'incorporation de leucine (Fig. 29).

L'injection de phenylhydrazine (Fig. 30) entraîne des réactions (au moins) biphasiques : une inhibition au jour 1 suivie dans les jours suivants d'une stimulation, avec un retour à l'état normal au jour 7 après injection unique ou au jour 20 pour les injections répétées.

Une action biphasique est également constatée pour les synthèses protéiques mais en sens inverse (Fig. 31) : d'abord stimulateur jours 1 et 2 (injection unique) ou jour 1 (injections répétées), l'effet devient ensuite inhibiteur avec retour à l'état normal dès le jour 7.

Ceci nous permet de conclure à une action de la DA sur un système inhibiteur des synthèses protéiques. En effet des observations faites en microscopie électronique (Pl. XXXV, 4 et 5) montrent que le cytoplasme des spermatocytes est plus pauvre en sécrétions golgiennes (Pl. XXXV, 4) que celui des témoins (Pl. XXXV, 2).

Les lamelles réticulaires se présentent sous forme d'amas concentriques (Pl. XXXV, 5). Ce type d'arrangement est généralement interprété comme une preuve d'inactivité cellulaire.

La phenylhydrazine, agissant à la fois comme antagoniste de la DA et comme inhibiteur des systèmes décarboxylasiques en particulier celui qui mène à la synthèse du GABA, nous montre des effets successivement et/ou simultanément liés à des systèmes contrôlés par des neurones dopaminergiques et/ou GABAergiques.

B - Série printanière

Dans les séries réalisées au printemps, compte tenu de leur durée plus courte (7 jours) et du fait que les animaux sont en croissance spermatocytaire rapide, le synchronisme des animaux est plus difficile à

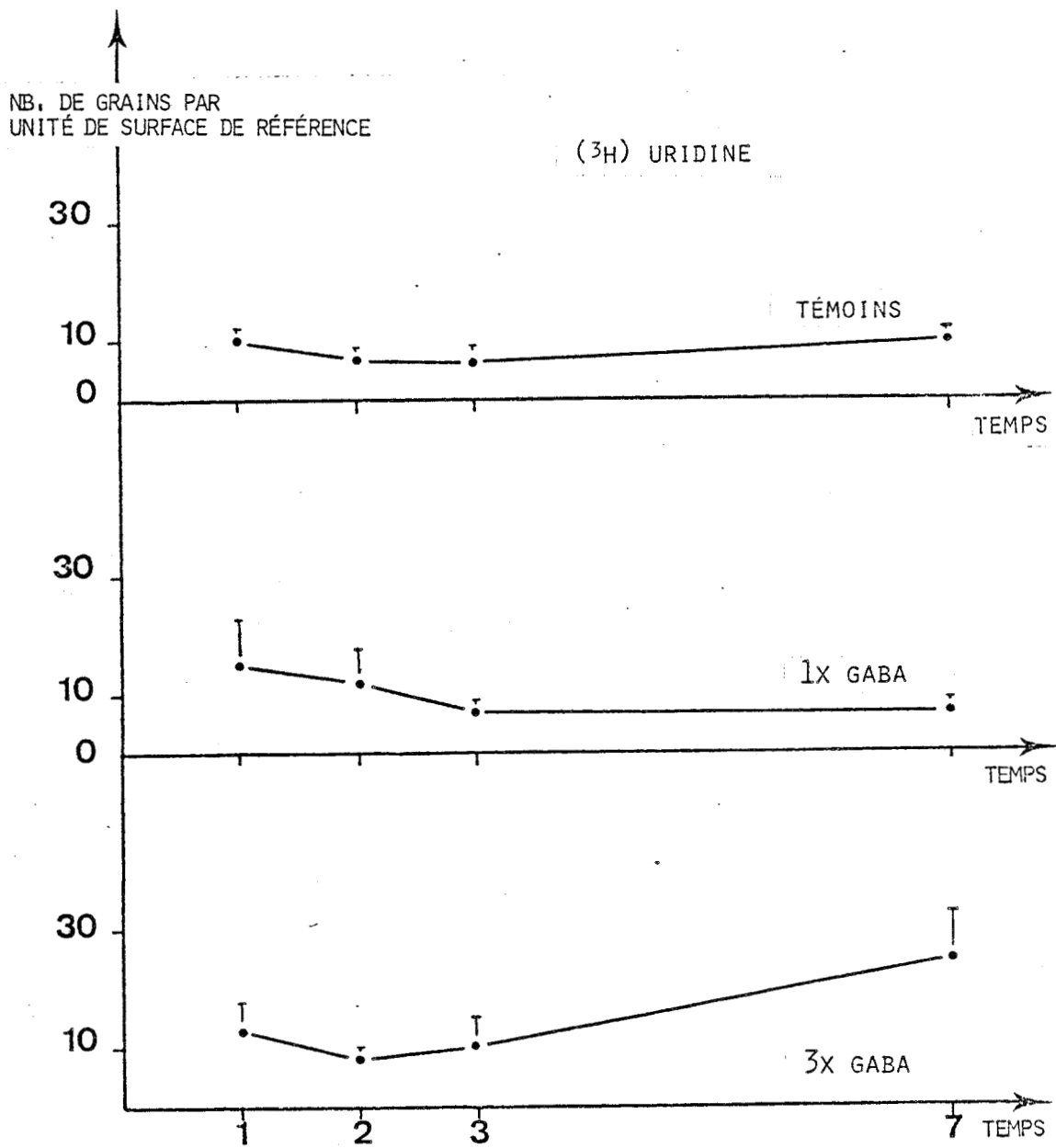


Fig. 32 - Evolution du marquage après incorporation de ^{3}H Uridine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de GABA.



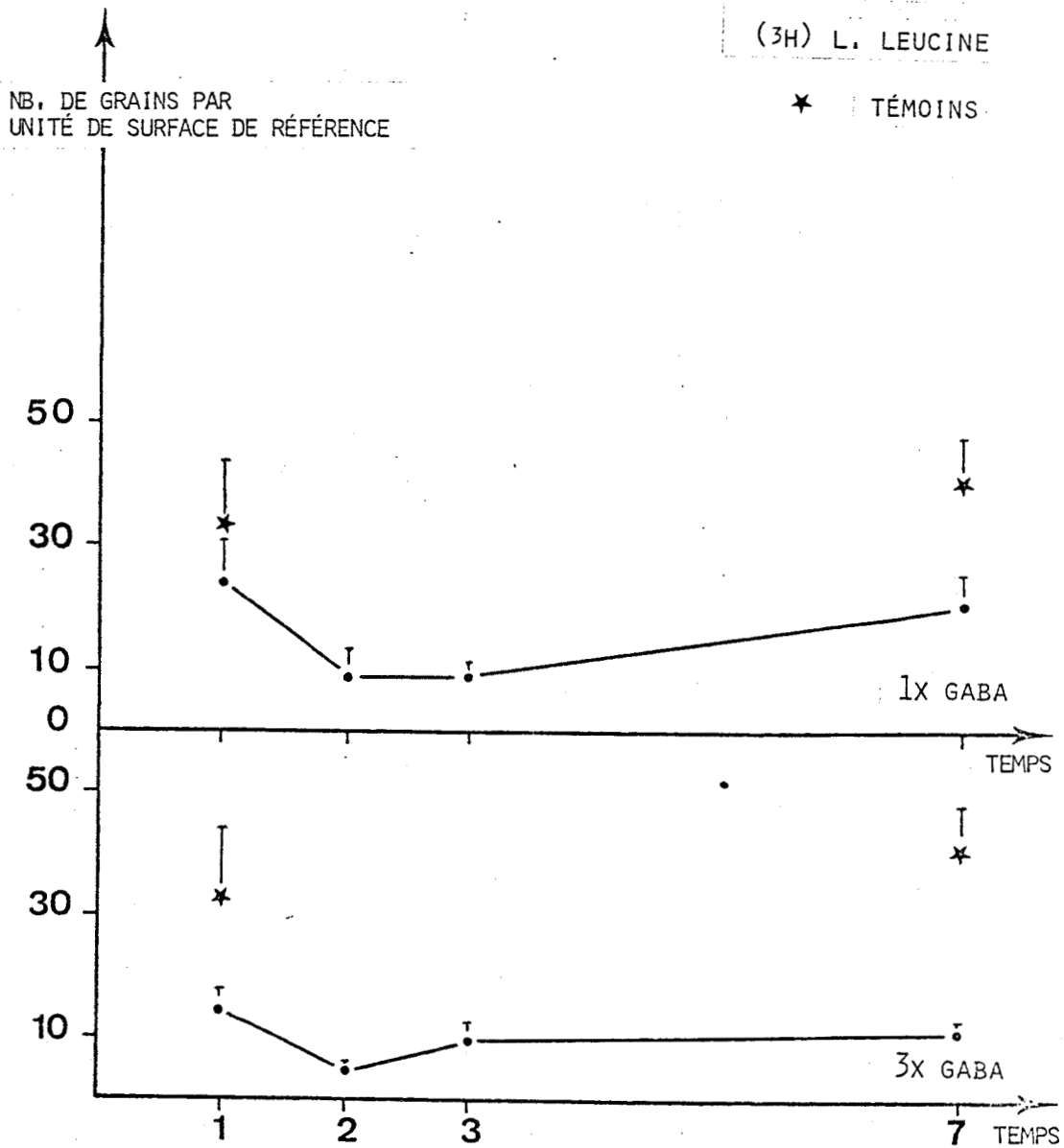


Fig. 33 - Evolution du marquage après incorporation de (³H) L-leucine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de GABA.



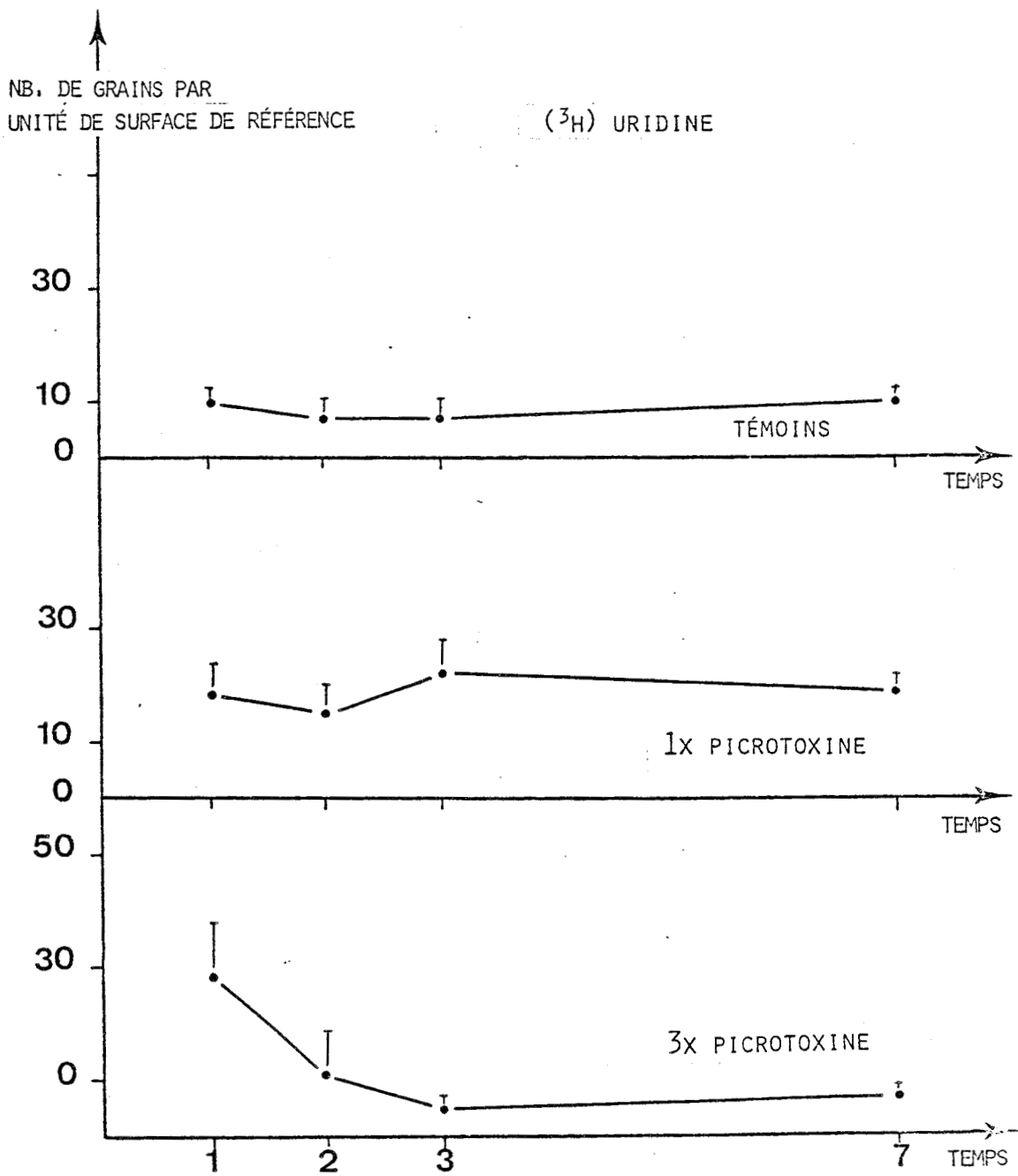


Fig. 34 - Evolution du marquage après incorporation de (^3H) Uridine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de PicROTOXINE.



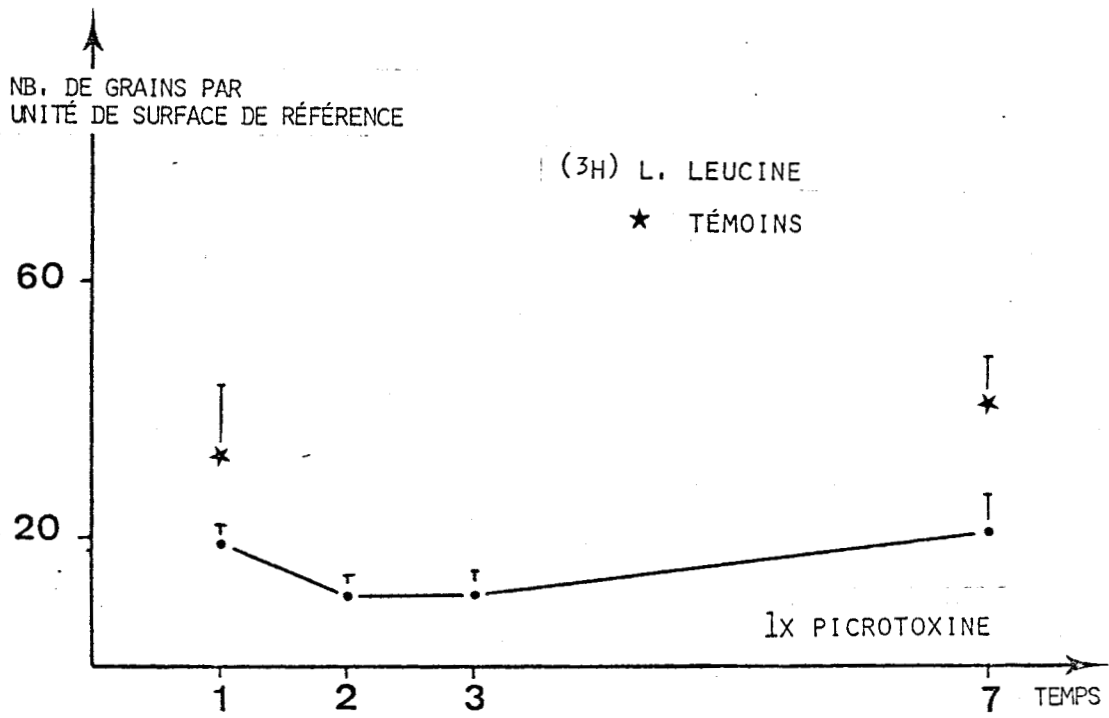


Fig. 35 - Evolution du marquage après incorporation de (³H) L-leucine. Injection simple (1 x) de Picrotoxine.



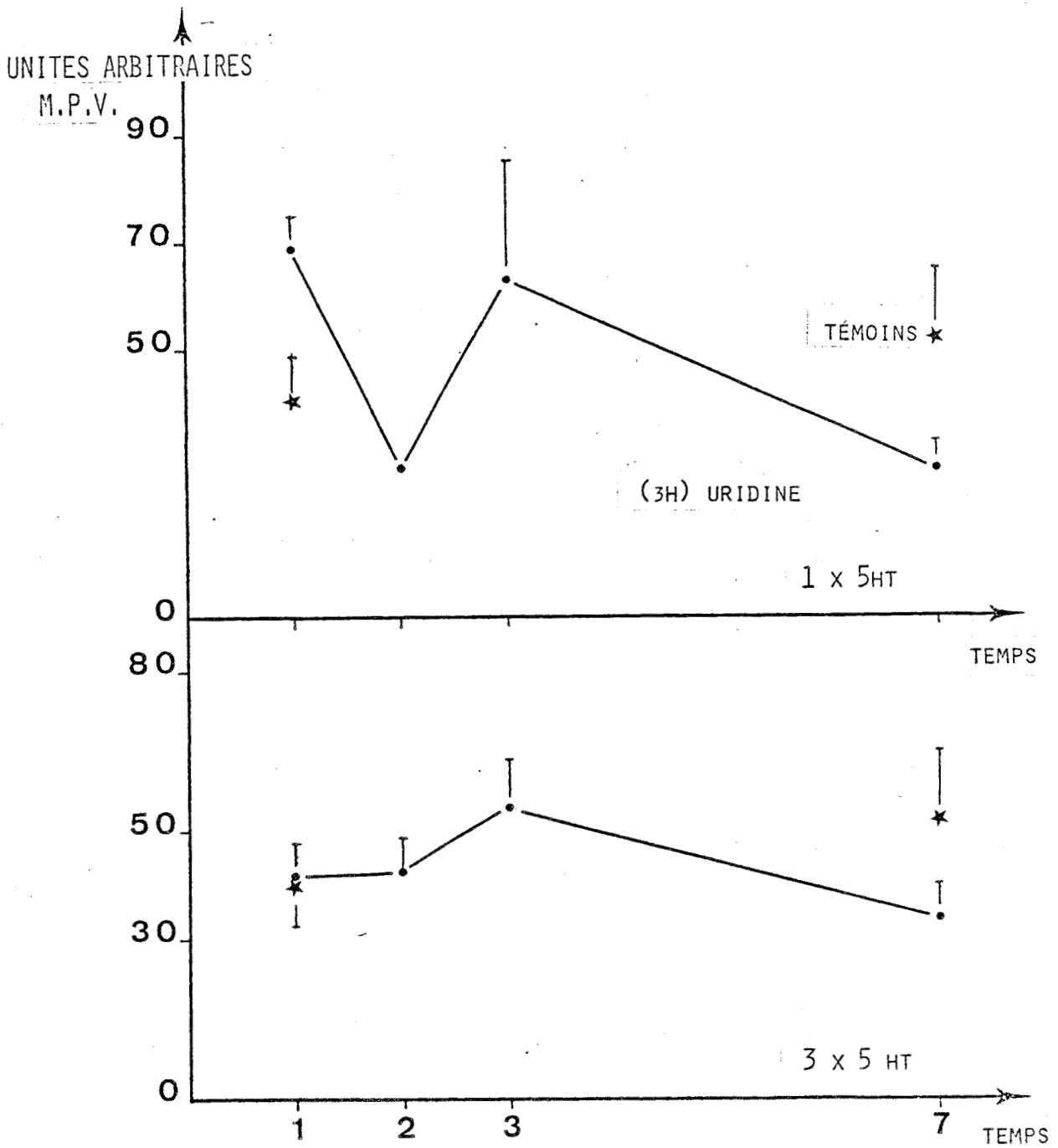


Fig. 36 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) après incorporation de (³H) Uridine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de 5 HT.



obtenir. Nous nous sommes donc limités volontairement à des témoins de début de série expérimentale (jour 1) et de fin de série expérimentale (jour 7).

1) GABA et picrotoxine

Après une injection unique de GABA, l'incorporation d'uridine (Fig. 32) est quasi identique à celle des témoins. Après triple injection, seule une augmentation de l'incorporation est constatée au jour 7. Il existe par contre un effet inhibiteur très net sur les synthèses protéiques aussi bien après injection simple qu'après injection triple (Fig. 33).

L'ultrastructure des spermatocytes après l'injection de GABA montre que le nucléole (Pl. XXXIII, 2) a le même aspect que celui des témoins (Pl. XXXIII, 1). De nombreux spermatocytes présentent dans leur cytoplasme des lamelles réticulaires parallèles (Pl. XXXIII, 2 et 3), rappelant les images observées normalement dans les spermatocytes de 40-50 μm de diamètre.

L'injection de picrotoxine entraîne une augmentation de l'incorporation d'uridine (Fig. 34) qui est cependant de courte durée (2 jours) pour les injections répétées. Une diminution significative de l'incorporation de la leucine par rapport aux témoins (Fig. 35) est observée après injection unique de picrotoxine. Les injections multiples se révèlent mortelles après le jour 3.

Des images en microscopie électronique confirment ces résultats. Après l'injection de picrotoxine, le nucléole présente des figures de bourgeonnement (Pl. XXXIII, 4) plus nombreuses que chez les témoins (Pl. XXXIII, 1).

Nous constatons donc que le GABA n'a aucun effet sur les synthèses d'ARN, alors que globalement la picrotoxine a un effet stimulateur. Par contre en ce qui concerne les synthèses protéiques, les deux produits testés ont un effet inhibiteur.

2) 5 HT et réserpine

Après injection unique de 5 HT, la courbe d'incorporation d'uridine (Fig. 36) montre, comme pour la série hivernale, une alternance de points hauts et de points bas. Les injections répétées entraînent cependant des variations nettement moins importantes (Fig. 36).

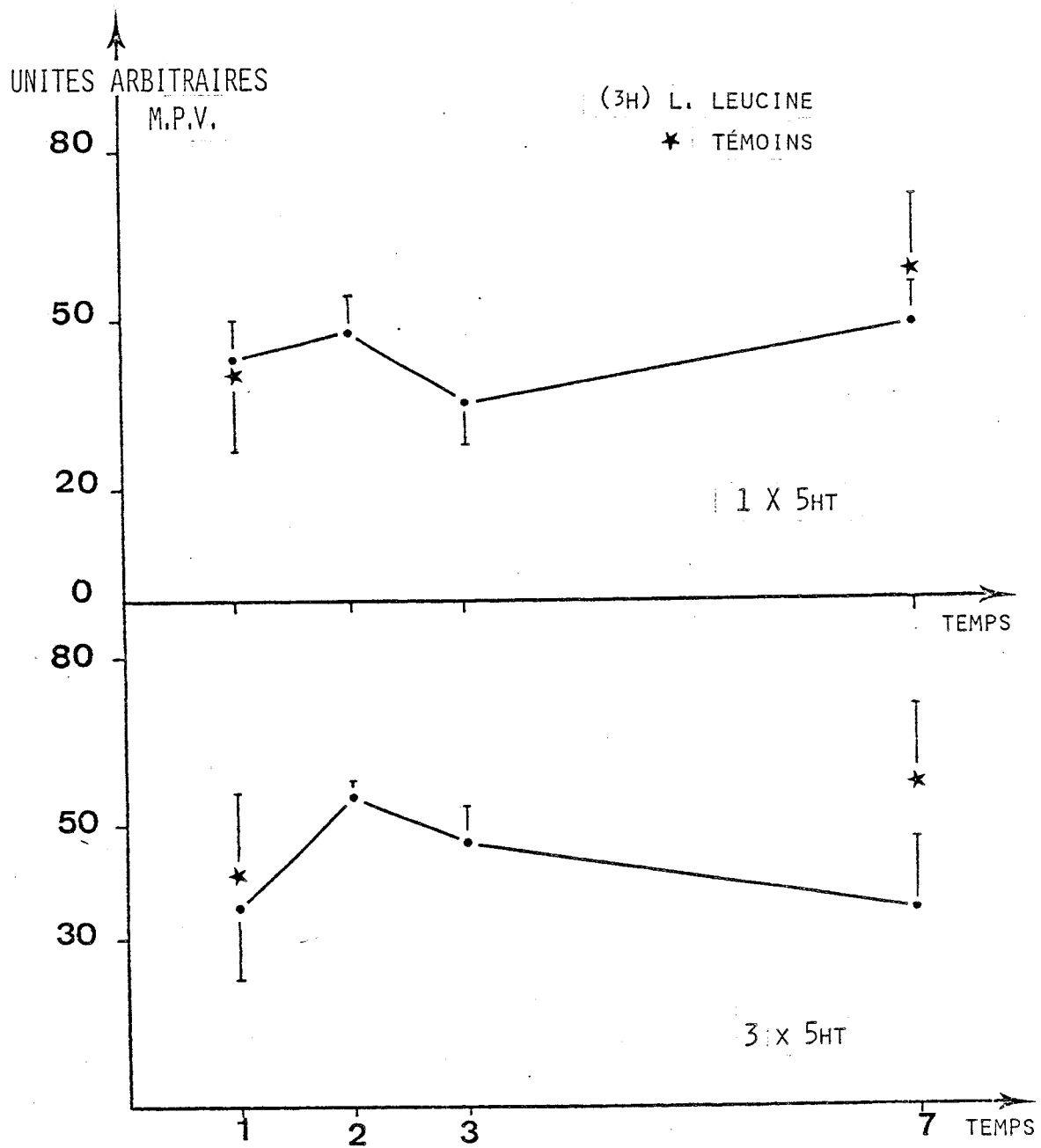


Fig. 37 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) après incorporation de (³H) L-leucine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de 5 HT.

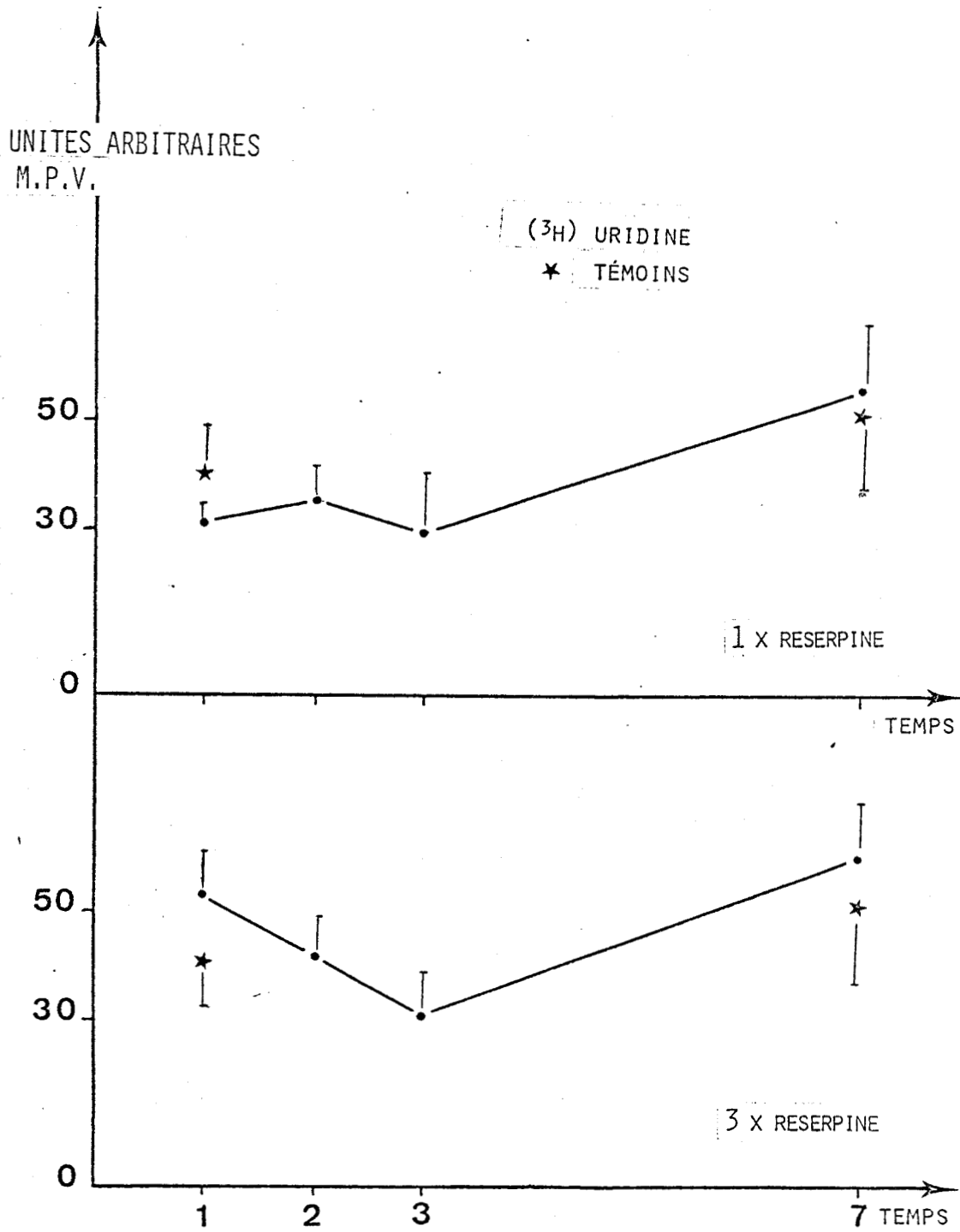


Fig. 38 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) après incorporation de ^(3H) Uridine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de Reserpine.



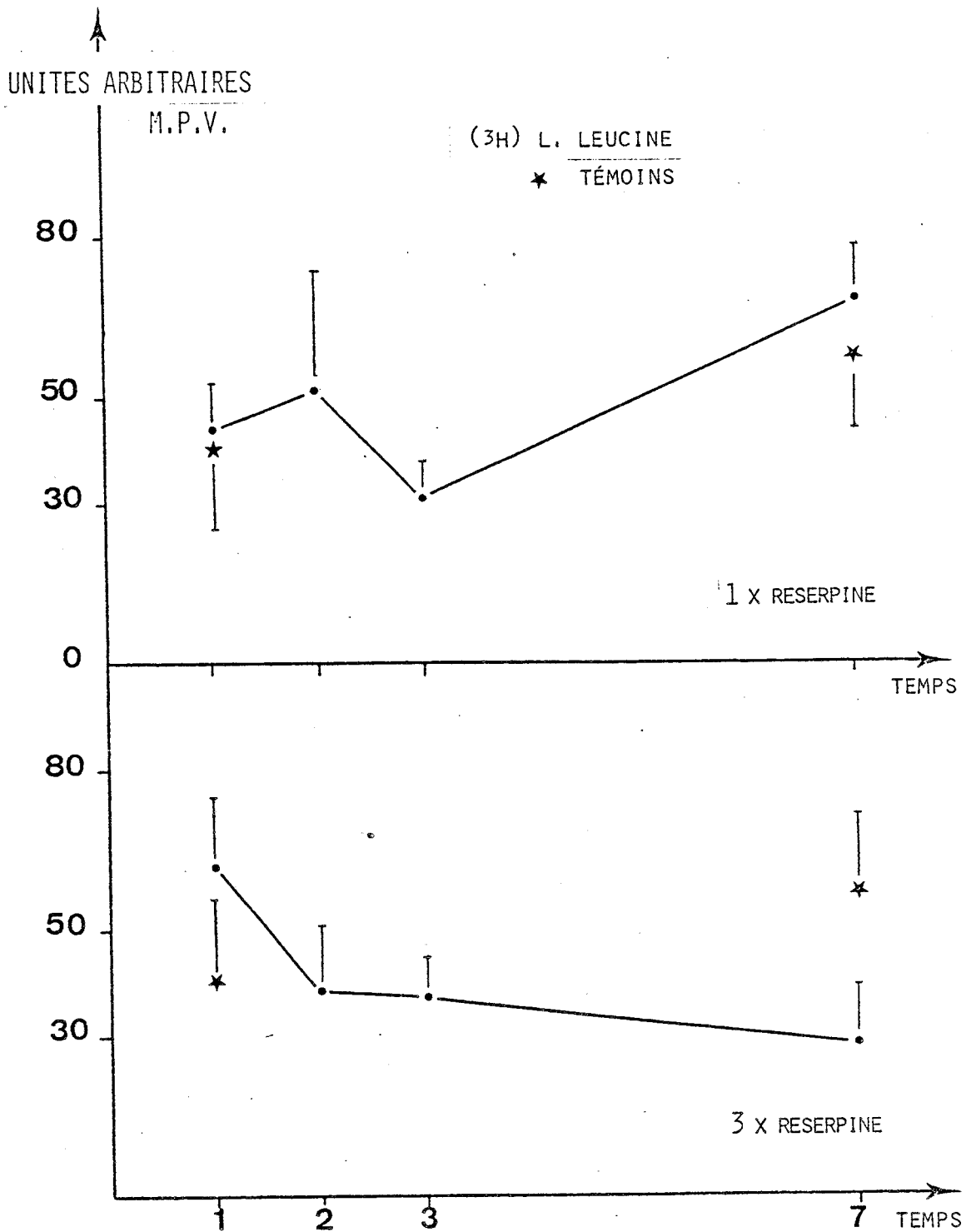


Fig. 39 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) après incorporation de (³H) L-leucine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de Reserpine.

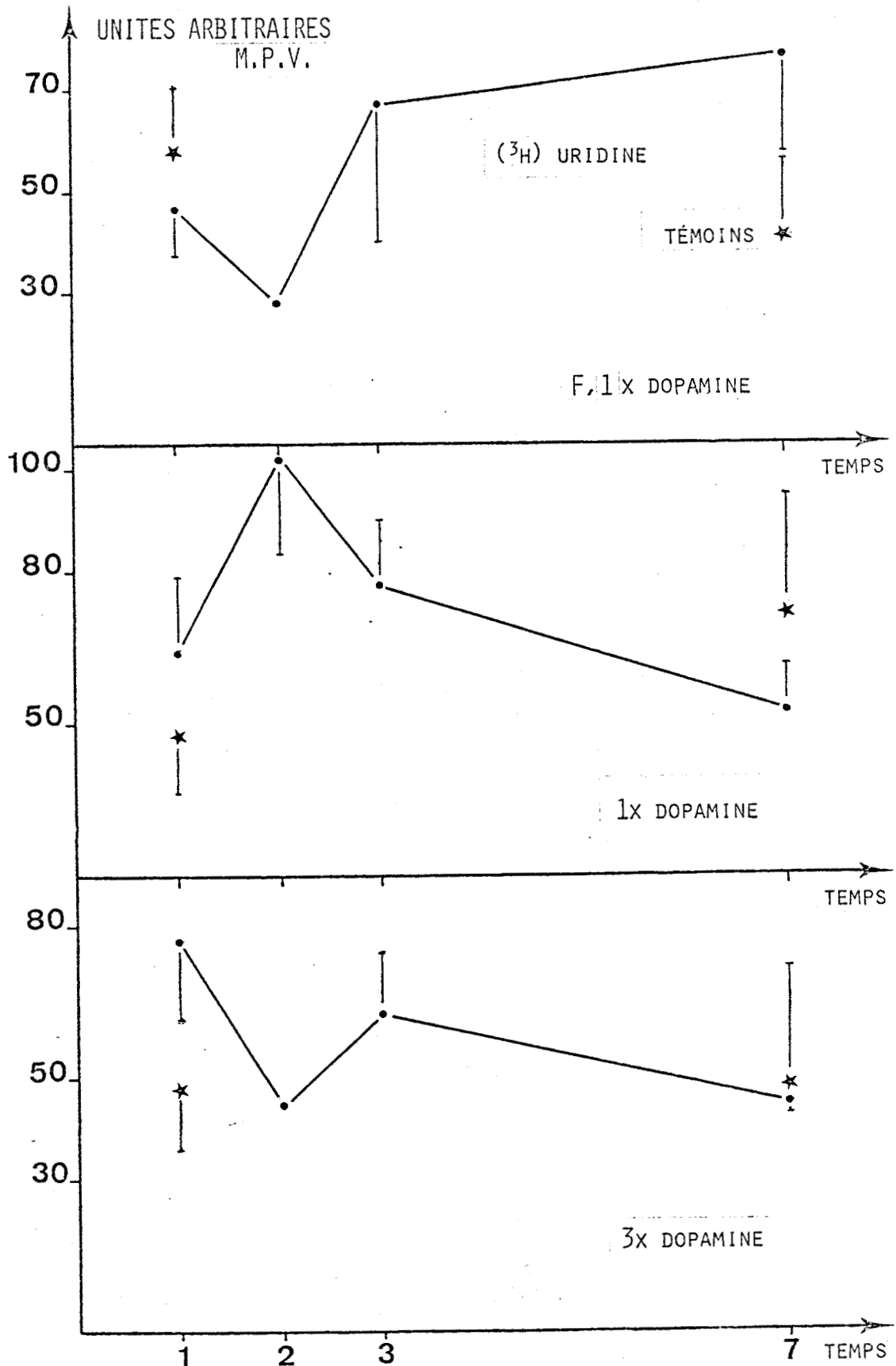


Fig. 40 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) après incorporation de (^3H) Uridine. Injection simple, précédée (F, 1 x) ou non (1 x) d'un passage à 4°C , ou triple (3 x) de Dopamine.



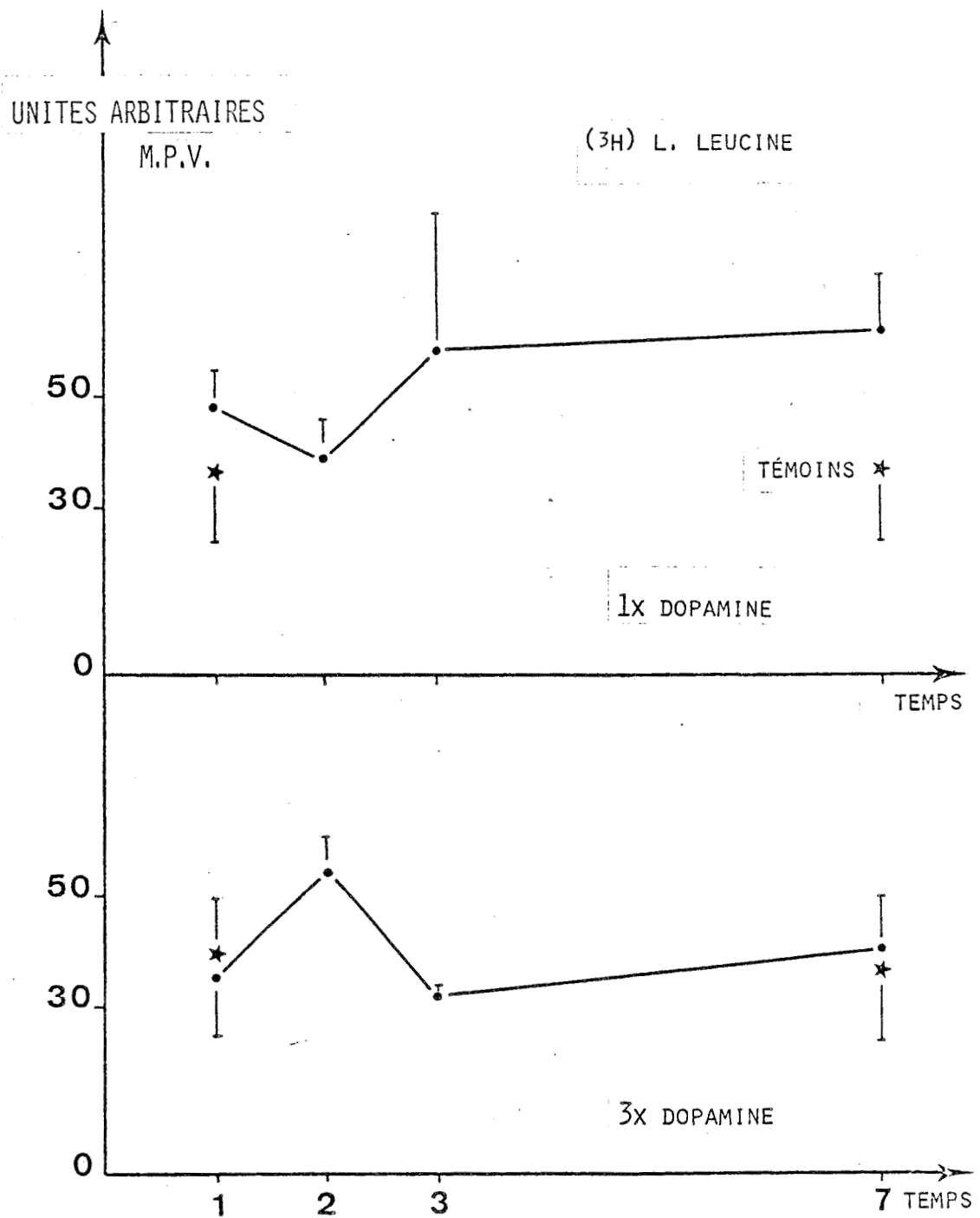


Fig. 41 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) après incorporation de (^3H) L-leucine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de Dopamine.

L'incorporation de leucine après injection (s) de 5 HT (Fig. 37) ne présente une différence significative par rapport aux témoins qu'au jour 7. Il faut cependant souligner le fait que les témoins du jour 7 ("uridine" et "leucine") ne présentent que des spermatoocytes en croissance alors que les divisions de maturation sont déjà présentes chez les injectés dès le jour 2 après l'injection du neurotransmetteur, signe d'une maturation plus précoce des cellules germinales.

L'étude en microscopie électronique (Pl. XXXIV, 2) révèle un nucléole peu différent de celui des témoins (Pl. XXXIV, 1).

Peu de différences sont également constatées dans l'incorporation d'uridine après injection de réserpine (agoniste de la 5 HT) (Fig. 38). Par contre une diminution nette de l'incorporation de leucine peut être observée après injection triple (Fig. 39). Un effet maturateur sur les produits génitaux, comparable à celui observé après injection de 5 HT, est observé chez les animaux injectés.

L'ultrastructure des spermatoocytes après injection de réserpine révèle un moins grand nombre d'extrusions nucléolaires (Pl. XXXIV, 3) que chez les témoins (Pl. XXXIV, 1), malgré une incorporation comparable d'uridine.

3) Dopamine et phenylhydrazine

L'injection de DA à des animaux élevés normalement au laboratoire (20-22° C à cette époque de l'année) entraîne dans un premier temps une augmentation de l'incorporation d'uridine (Fig. 40) aussi bien après injection unique qu'après injections répétées. Au jour 7 cependant le niveau d'incorporation est inférieur à celui des témoins.

L'incorporation de leucine (Fig. 41) n'est que peu modifiée par l'injection simple ou multiple de dopamine et reste à un niveau à peu près constant par rapport au témoin de départ.

L'injection de phenylhydrazine provoque dans un premier temps une diminution de l'incorporation d'uridine (Fig. 42), effet opposé à celui constaté après injection de DA. Cependant à 3 jours et à 7 jours (injections répétées seulement), la totalité des cellules montre un marquage très important. Dans le cas d'une injection simple il y a récupération et même si un nombre important de dégénérats existe chez les animaux au jour 7 l'incorporation du précurseur est revenue à un niveau normal.

Si avant leur injection de dopamine les animaux sont traités

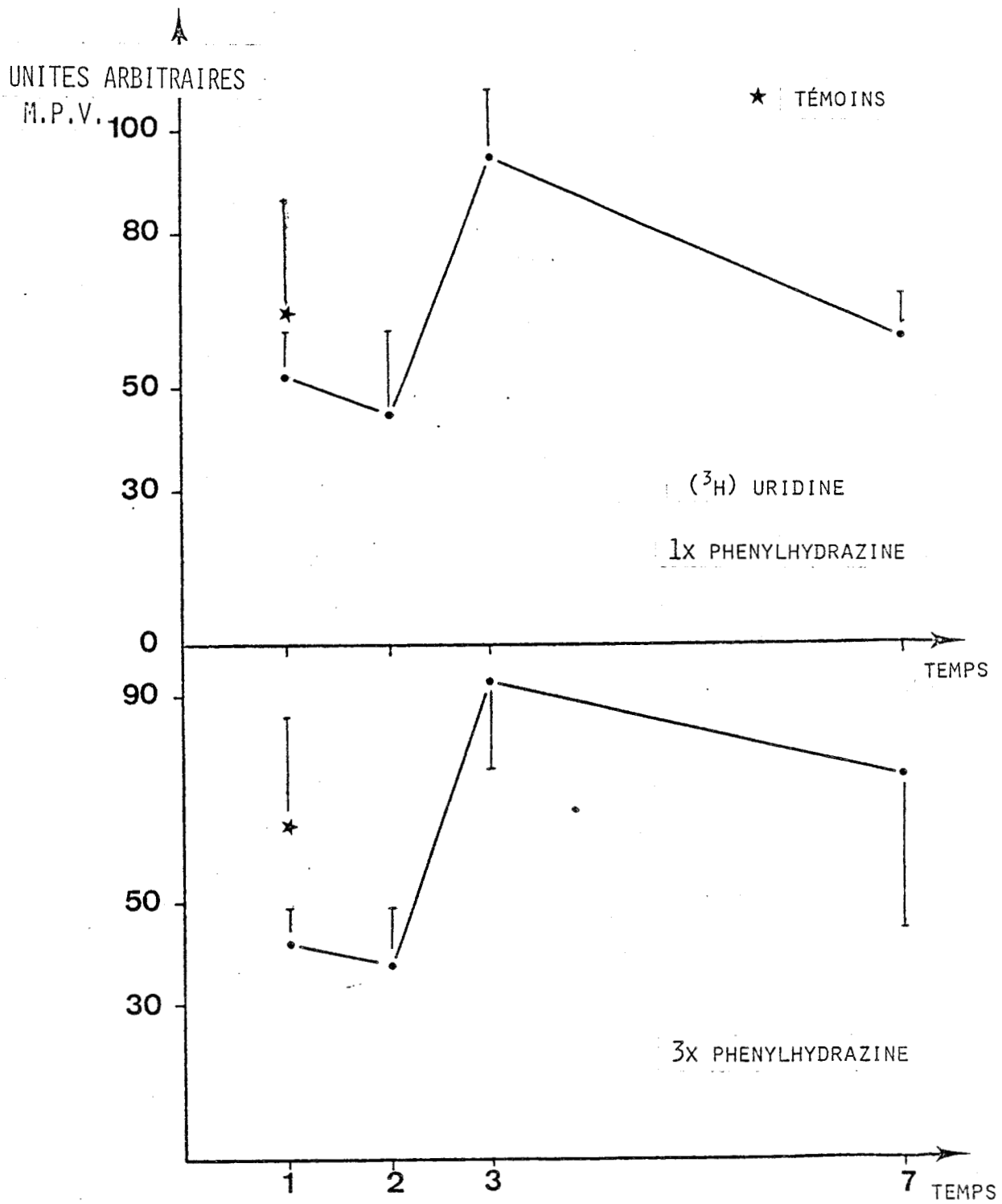


Fig. 42 - Evolution du marquage (mesures cytophotométriques) après incorporation de (^3H) Uridine. Injection simple (1 x) ou triple (3 x) de Phenylhydrazine.

par le froid (5° C) pendant 4 heures, ce qui entraîne le déblocage de la réaction cérébrale à la dopamine (DESCAMPS et LASSALLE, sous presse), on constate, dans un premier temps (jours 1 et 2), une diminution de l'incorporation d'uridine (Fig. 40). Puis il y a récupération et le niveau d'incorporation remonte à un niveau légèrement supérieur à celui des témoins.

IV - Discussion

L'injection de GABA n'a pratiquement aucune influence sur l'incorporation d'uridine dans le spermatocyte. Par contre, en expérimentation printanière un effet inhibiteur sur l'incorporation de leucine a pu être constaté. Il a été démontré (DESCAMPS et LASSALLE, sous presse) que le GABA exogène n'entraînait aucune modification de l'activité électrique du cerveau. L'absence d'effet peut donc se comprendre facilement. Il n'est pas possible, actuellement, d'expliquer l'effet inhibiteur.

La picrotoxine entraîne un effet stimulateur, sauf pour la série "leucine-printemps". Les résultats sont globalement en accord avec ceux obtenus électrophysiologiquement : le GABA serait en effet le seul neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central (DESCAMPS et LASSALLE, sous presse). L'injection de son antagoniste libère donc l'animal de son effet modérateur. Les effets négatifs (séries "leucine-printemps") ne peuvent cependant pas être expliqués.

La 5 HT a des effets stimulateurs sur l'activité électrique cérébrale (DESCAMPS et LASSALLE, sous presse). Cet effet stimulateur peut être retrouvé dans les différentes séries expérimentales, mais est vraisemblablement contrebalancé par un autre système, inhibiteur celui-là, entraînant un aspect en dents de scie de la courbe. Par contre en série printanière un effet maturateur sur les produits génitaux peut être observé.

L'utilisation des agonistes (seul l'imipramine a un léger effet sur l'activité électrique cérébrale) ne permet pas de conclusion nette.

La dopamine possède la particularité d'avoir une action stimulatrice sur l'activité électrique cérébrale au cours de l'hiver et de ne plus avoir d'effet à la belle saison sauf après passage des animaux au réfrigérateur pendant au moins 4 heures (DESCAMPS et LASSALLE, sous presse). La DA semble intervenir dans un système inhibiteur des synthèses protéiques, effet visible durant la période hivernale. Durant cette même

période un effet inhibiteur peut également être provoqué sur l'incorporation d'uridine mais après injections répétées, alors qu'une injection unique suffit au printemps, après passage au froid. Une injection unique provoque, aussi bien en hiver qu'au printemps, une augmentation de l'incorporation d'uridine, effet contraire dû soit à un effet de dose, soit à la réaction d'un système antagoniste.

Comme nous le voyons les effets engendrés par une ou plusieurs injections de neurotransmetteurs ne sont pas simples à expliquer. Il est vrai que l'influence des neurotransmetteurs sur les cellules neurosécrétrices est un domaine complexe. En effet le contrôle peut être multifactoriel (WHITEHOUSE, VINSON et THODY, 1982), le neurotransmetteur pouvant jouer lui-même plusieurs rôles (cf revue de QUAY, 1979). Il a même été démontré que l'action *in vivo* et *in vitro* pouvait être différente, dépendant donc des conditions expérimentales (FRANQUINET et MARTELLY, 1981 ; FIOK, ZSUZANNA-ACS et STARK, 1981). Des effets biphasiques ont également été constatés (TOMIKO, TARASKEVICH et DOUGLAS, 1983).

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

•

Nous envisagerons successivement l'étude ultrastructurale descriptive des cellules germinales et des gamètes chez les Chilopodes puis le rôle de différents facteurs sur la perméabilité testiculaire et le métabolisme des spermatocytes.

I - Etude ultrastructurale des cellules germinales et des gamètes

Chez les Myriapodes Chilopodes la spermatogenèse est caractérisée par une importante croissance spermatocytaire : les spermatogonies relativement petites (de 10 à 20 μm suivant les espèces) donnent des spermatocytes dont le diamètre est en moyenne 3 fois supérieur à celui des spermatogonies. A notre connaissance un tel gigantisme spermatocytaire n'a été signalé que chez *Aphodius* et quelques autres Coléoptères (VIRKKI, 1951, 1956).

L'activité synthétique au cours de la spermatogenèse semble nettement plus élevée que celle qui est généralement décrite dans le règne animal.

Chez les Scolopendromorphes et les Lithobiomorphes notamment, une intense activité nucléolaire et une importante augmentation du nombre de mitochondries et de dictyosomes peuvent être observées.

En ce qui concerne les Lithobiomorphes, l'augmentation d'activité est plus nette chez *Lithobius crassipes* que chez *Lithobius forficatus*.

Chez les Géophilomorphes, il est possible d'observer une stimulation de l'activité nucléolaire mais l'augmentation de l'activité golgienne semble plus faible.

Les spermatozoïdes sont très longs (2 à 3 mm) et rattachés au type III selon la définition d'ANDRE (1962) ; ils présentent une grande constance morphologique chez les différents Chilopodes étudiés comme l'a déjà signalé BACCETTI (1970). La structure très particulière de la tête du spermatozoïde de *Necrophloeophagus longicornis* d'une part et d'autre part, la grande ressemblance entre les spermatozoïdes de *Geophilus linearis* et *Haplophilus subterraneus* pourraient remettre en question la position systématique de ces animaux au sein du groupe des Géophilomorphes.

II - Rôle de différents facteurs sur la perméabilité testiculaire et le métabolisme des spermatocytes

Chez *L. forficatus*, durant la période hivernale, c'est-à-dire lorsque l'animal présente un taux de croissance spermatocytaire minimal, les traceurs et en particulier le nitrate de lanthane ne pénètrent pas à

l'intérieur des logettes testiculaires. Cette barrière de perméabilité peut être levée par une activation naturelle (reprise de croissance rapide au printemps) ou expérimentale (injection de 20-OH-ecdysone) de la physiologie testiculaire. Le siège de la barrière de perméabilité semble être localisé au niveau des jonctions septées présentes entre les cellules des cloisons des logettes testiculaires ; ces dernières pourraient être rapprochées des cellules de Sertoli des Vertébrés.

Il semblerait donc que la 20-OH-ecdysone agisse : 1) directement sur les cellules des cloisons en permettant l'ouverture des jonctions et en favorisant ainsi l'apport des métabolites vers les spermatocytes ; 2) directement sur les spermatocytes par l'intermédiaire des jonctions gap.

Chez *L. forficatus*, l'activation expérimentale, par injection de la 20-OH-ecdysone ou par électro-stimulation de la *pars intercerebralis* se traduit par une diminution du nombre de particules intramembranaires (PIM) au niveau de la face E. Ce changement de la structure interne de la membrane est dû vraisemblablement à un glissement vertical des PIM suite à la stimulation du métabolisme. Cependant le nombre total des PIM par μm^2 comparé à celui observé chez les témoins hivernaux ne diminue que chez les témoins de printemps et les animaux injectés à la 20-OH-ecdysone. Par contre le nombre total de PIM/ μm^2 a tendance à augmenter après électro-stimulation de la *pars intercerebralis*.

Les corrélations naturelles et expérimentales entre le taux des ecdystéroïdes et la croissance spermatocytaire ont été étudiés chez *L. crassipes*. L'intense activité synthétique constatée au cours de la croissance spermatocytaire est en relation avec un taux d'ecdystéroïdes très élevé nettement supérieur à celui qui est observé chez *L. forficatus*.

Néanmoins, l'injection de 20-OH-ecdysone chez *L. crassipes* peut encore provoquer une augmentation de l'incorporation des précurseurs radioactifs, sauf si elle est effectuée durant la période des divisions de maturation. Il a donc été possible de mettre en évidence une période réfractaire à l'action de l'hormone.

Il serait intéressant ultérieurement d'étudier la pénétration des traceurs opaques durant cette période afin de préciser le moment d'installation de la barrière.

L'étude de l'action (indirecte) des neurotransmetteurs sur la croissance spermatocytaire a dans la majorité des cas donné lieu à des réponses complexes dues soit à des interactions entre différents systèmes, soit à des contrôles plurifactoriels. Le moment de l'intervention, semble également être important, les réponses n'étant pas obligatoirement semblables dans les séries hivernales et dans les séries printanières. Néanmoins, dans l'état actuel de nos recherches, il semble que le GABA ait un rôle modérateur au moins sur le système de contrôle des synthèses d'ARN. La 5 HT déclencherait un effet maturateur tout au moins en série printanière, tandis que la DA interviendrait dans un système inhibiteur.

Afin de mieux interpréter les effets de ces substances sur le système nerveux une collaboration étroite avec C. JAMAULT-NAVARRO (Université de Picardie) doit être envisagée. Il serait également intéressant d'étudier l'action en culture organotypique de différentes régions du système nerveux sur la physiologie testiculaire. Cette méthode d'approche permettrait d'éliminer les interactions organiques et les modifications de l'équilibre (hormonal ou autre), inévitables lors de l'étude expérimentale *in vivo*.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON W.A., 1968 - Cytochemistry of sea urchin gametes. I. Intra-mitochondrial localization of glycogen, glucose-6 phosphatase, and adenosine triphosphatase activity in spermatozoa of *Paracentrotus lividus*. J. Ultrastruct. Res., 24, 398-411.
- ANDERSON W.A., PERSONNE P., 1970 - The localization of glycogen in the spermatozoa of various invertebrate and vertebrate species. J. Cell Biol., 44, 29-51.
- ANDRE J., 1960 - L'évolution ultrastructurale du chondriome au cours de la spermatogenèse chez le Rat. Proc. European Reg. Conf. Electron Microscopy, Delft 1960, vol. II, 947-950.
- ANDRE J., 1962 - Contribution à la connaissance du chondriome. Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogenèse. J. Ultrastruct. Res., suppl. 3, 1-185.
- ANDRE J., 1965 - Quelques données récentes sur la structure et la physiologie des mitochondries : glycogène, particules élémentaires, acides nucléiques. Arch. Biol., 76, 277-304.
- BACCETTI B., BIGLIARDI E., BURRINI A.G., DALLAI R., 1970 - Some enzymes of the sperm tail in a grasshopper. 7ème Congr. Int. Micr. Elect., Grenoble, Favard Ed., 3, 655-656.
- BEAULIEU E.E., 1978 - Hormones. Hermann Ed., Paris.
- BENIOURI R., DESCAMPS M., PORCHERON P., JOLY R. - Corrélations naturelles et expérimentales entre croissance spermatocytaire et taux d'ecdystéroïdes chez les *Lithobiidae* (Chilopoda). Rev. Canad. biol. Exp., sous presse.
- BLACKMAN B.M., 1905 - The spermatogenesis of the Myriapods. III. The spermatogenesis of *Scolopendra heros*. Bull. of the Museum of comparat. Zool. at Harvard College, vol. XLVIII, n° 1, 1-138.

- BOUIN P., 1903 - Sur l'existence d'une double spermatogenèse et de spermies eupyrènes et oligopyrènes chez *Scolopendra cingulata* (démonstration). C.R. Ass. Anat., 5ème session, P. 229.
- BOUIN P., 1920 - Sur la dimégalie des spermies dans certaines doubles spermatogenèses ; sa signification. C.R. Soc. Biol., 83, 432-434.
- BOUIN P., BOUIN M., 1899 - Sur la présence et l'évolution des formations ergastoplasmiques dans les cellules séminales de *Lithobius forficatus* (Lin.). Bibliogr. Anat., 7, 141-150.
- BRANTON D., BULLIVANT S., GILULA N.B., KARNOVSKY M.J., MOOR H., MUHLETHALER K., NORTHCOTE D.N., PACKER L., SATIR B., SATIR P., SPETA V., STAEHLIN L.A., STEERE R.L., WEINSTEIN R.S., 1975 - Freeze-etching nomenclature. Science, 190, 55-56.
- BREUCKER H., 1970 - Die Struktur des Samenableitenden Gangsystems bei *Geophilus linearis* Koch (Chilopoda). Z. Zellforsch., 108, 225-242.
- BROLEMANN H.W., 1930 - Elements d'une faune des Myriapodes de France. Chilopode. Imprimerie Toulousaine ed.
- BULLIVANT S., LOEWENSTEIN W.R., 1968 - Structure of coupled and uncoupled cell junctions. J. Cell Biol., 37, 621-632.
- CAMATINI M., CERESA CASTELLANI L., 1974 - Atypical myofilament array of visceral muscle fibers of *Lithobius forficatus* L. testis. J. Submicr. Cytol., 6, 353-365.
- CAMATINI M., SAITA A., COTELLI F., 1974 - Spermiogenesis of *Lithobius forficatus* L. at ultrastructural level. Symp. Zool. Soc., London, 32, 231-235.
- CAMATINI A., FRANCHI E., SAITA A., BELLONE L., 1977 - Spermiogenesis in *Scutigera coleoptrata* (Myriapoda, Chilopoda). J. Submicr. Cytol., 9, 373-387.

- CAMATINI A., FRANCHI E., 1979 - Ultrastructural morphology of spermatozoa from *Scolopendra morsitans* (Myriapoda, Chilopoda). J. Submicr. Cytol., 11, 335-343.
- CHAILLEY B., 1979 - Etude par cryofracture des membranes impliquées dans la sécrétion. J. Micr. Biol. Cell., 35, 55-70.
- CLARK R.B., 1955 - The posterior lobes of the brain of *Nephtys* and the mucous glands of the prostomium. Quart. J. Microsc., 96, 545-565.
- COTELLI F., FERRAGUTI M., LAMIA DONIN C.L., 1978 - Morphologie ultrastructurale du spermatozoïde de *Himantarium gabrielis* Linnaeus. Abh. Verh. naturwiss. Ver. Hamburg (NE), 21/22, 219-229.
- DANILOVA L.V., 1973 - Ultrastructure du flagelle des spermatozoïdes. Usp. Sov. rem. Biol. S.S.S.R., 76, 246-263.
- DANILOVA L.V., SELEZNEVA S.N., 1967 - Deux types de structure des desmosomes septés. Citolofija, S.S.S.R., 9, 595-597.
- DEMANGE J.M., 1968 - Myriapodes. Encyclopaedia Universalis, 11, 510-516.
- DEMANGE J.M., 1981 - Les Mille pattes. N. Boubée Ed., Paris.
- DESCAMPS M., 1969 - Etude cytologique de la spermatogenèse chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode, Chilopode). Arch. Zool. exp. Gen., 110, 349-361.
- DESCAMPS M., 1971 - Etude ultrastructurale des spermatogonies et de la croissance spermatocytaire chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode, Chilopode). Z. Zellforsch., 121, 14-26.
- DESCAMPS M., 1972 - Etude ultrastructurale du spermatozoïde de *Lithobius forficatus* L. (Myriapode, Chilopode). Z. Zellforsch., 126, 193-205.

- DESCAMPS M., 1974 - Etude du contrôle endocrinien du cycle spermatogénétique chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode, Chilopode). Rôle de la *pars intercerebralis*. Gen. Comp. Endocrinol., 24, 191-202.
- DESCAMPS M., 1975 - Etude du contrôle endocrinien du cycle spermatogénétique chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode, Chilopode). Rôle du complexe "cellules neurosécrétrices des lobes frontaux du protocérébron - glandes cérébrales". Gen. Comp. Endocrinol., 25, 346-357.
- DESCAMPS M., 1976 - Contribution à l'étude du cycle spermatogénétique et de son déterminisme chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode, Chilopode). Thèse Doctorat Etat, Univ. Lille I.
- DESCAMPS M., 1977 - Recherches expérimentales sur la régulation du cycle spermatogénétique au cours du développement post-embryonnaire chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode Chilopode). Arch. Biol., 88, 203-215.
- DESCAMPS M., 1978 - Rôle des centres endocrines céphaliques dans la régulation de la spermatogenèse chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode, Chilopode). Bull. Soc. Zool. Fr., 103, 367-373.
- DESCAMPS M., 1981 a - β -ecdysone influence on the spermatocyte growth in *Lithobius forficatus* L. (Myriapoda, Chilopoda). Autoradiographic (optical level) and ultrastructural studies. Arch. Biol., 92, 53-65.
- DESCAMPS M., 1981 b - Influence of the electrostimulation of the *pars intercerebralis* on the spermatocyte growth in *Lithobius forficatus* L. (Myriapoda, Chilopoda). Autoradiographic study. 5th Int. Congress of Myriapodology Radford, U.S.A.
- DESCAMPS M., LASSALLE B. - Influence of putative neurotransmitters on brain electrical activity in *Lithobius forficatus* L. (Myriapoda Chilopoda). Comp. Biochem. Physiol., C, sous presse.

- DROCHMANS P., 1962 - Morphologie du glycogène. Etude au microscope électronique de colorations négatives du glycogène particulaire. J. Ultrastruct. Res., 6, 141-163.
- DUVERT M., 1980 *in* MEYRAN J.C., 1982 -
- DYM M., FAWCETT D.W., 1970 - The blood - testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. Biol. Reprod., 3, 308-326.
- EPHRUSSI B., BEADLE G.W., 1936 - A technic of transplantation for *Drosophila*. Amer. Natur., 70, 218-225.
- FABRE J.H., 1855 - Recherches sur l'anatomie des organes reproducteurs et sur le développement des Myriapodes. Ann. Sci. Nat. Zool., 4ème série, 3.
- FAWCETT D.W., 1961 - Intercellular bridges. Exp. Cell. Res., **suppl.** 8, 174-187.
- FAWCETT D.W., 1965 - The anatomy of the mammalian spermatozoon with particular reference to the guinea pig. Z. Zellforsch., 67, 279-296.
- FAWCETT D.W., 1979 - The cell biology of gametogenesis in the male. Perspect. Biol. Med., 22, 556-573.
- FAWCETT D.E., LEAK K.V., HEIDGER P.M., 1970 - Electron microscopic observations on the structural components of the blood testis barrier. J. Reprod. Fertil (suppl.) 10, 105-122.
- FIOK J., ZSUZSANNA-ACS, STARK E., 1981 - Possible inhibitory influence of gamma-aminobutylic acid on growth hormone secretion in the rat. J. Endocr. 91, 391-397.
- FLOWER N.E., FILSHIE B.K., 1975 - Junctional structures in the midgut cell of Lepidopteran caterpillars. J. Cell. Sci., 17, 221-239.

- FRANCHI E., CAMATINI M., DE CURTIS I., 1982 - Morphological evidence of a permeability barrier in Urodele testis. J. Ultrastruct. Res., 80, 253-263.
- FRANKE W.W., 1970 - On the Universality of nuclear pore complex structure. Z. Zellforsch., 105, 405-429.
- FRANQUINET R., MARTELLY I., 1981 - Effects of serotonin and catecholamines on RNA synthesis in planarians ; *in vitro* and *in vivo* studies. Cell differentiation. 10, 201-209.
- FRIEDN D.S., GILULA N.B., 1972 - Variations in tight and gap junctions Mammalian tissues. J. Cell. Biol., 53, 758-776.
- FUNK J., WUNDERLICH F., KRETZ W., 1982 - Temperature-induced vertical shift of proteins in membranes. J. Mol. Biol., 161, 561-577.
- GILSON G., 1884 - La spermatogénèse chez les Arthropodes. La cellule, 1, 1-190.
- GILULA N.B., 1974 - Junctions between cells. In : Cell. communication. Cox R. P. Edit. John Wiley and sons, 1-29.
- GILULA N.B., FAWCETT D.W., AOKI A., 1976 - The sertoli cell occluding functions and gap functions in mature and developing mammalian testis. Dev. Biol. 50, 142-168.
- GOLANSKI K., 1929 - Composants plasmatiques des cellules sexuelles mâles chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode). C.R. Soc. Biol., 100, 227-229.
- GOTOW T., HASHIMOTO PH., 1981 - Graded differences in tightness of ^{épider}epithelial intercellular junctions within and in the vicinity of the rat median eminence. J. Ultrastruct. Res., 76, 293-311.
- GRAF F., 1978 - Les jonctions continues zonaires et maculaires d'un épithélium de crustacé. Biol. Cellulaire, 33, 55-62.

- GRAHAM R., KARNOVSKY M.J., 1966 - The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney : ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14, 291-302.
- HAND A.R., GOBEL S., 1972 - The structural organisation of the septate and gap junctions of *Hydra*. *J. Cell. biol.* 52, 397-408.
- HERBAUT C., 1975 - Etude expérimentale de l'ovogenèse chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode, Chilopode). Rôle de la *pars intercerebralis* Gen. Comp. Endocrinol., 27, 34-42.
- HERBAUT C., 1976 - Etude expérimentale de la régulation endocrinienne de l'ovogenèse chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode, Chilopode). Rôle du complexe "cellules neurosécrétrices protocérébrales-glandes cérébrales" Gen. Comp. Endocrinol., 28, 264-276.
- HOLLENBERG M.D., 1981 - Membrane receptors and hormone action I new trends related to receptor structure and receptor regulation trends pharmacol sci. 2, 320-323.
- HORSTMANN E., 1968 - Die Spermatozoen von *Geophilus linearis* Koch (Chilopoda). *Z. Zellforsch.*, 89, 410-429.
- JAMAULT-NAVARRO C., JOLY R., DESCAMPS M., 1983 - Activation of neurosecretory protocerebral -Cells by 20-hydroxyecdysone in *Lithobius forficatus* L. (Myriapoda, Chilopoda). Gen. Comp. Endocrinol., 50, 36-42.
- JAMIESSON J.D., PALADE G.E., 1967 - Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. I. Rôle of the peripheral elements of the Golgi complex. *J. Cell. Biol.*, 34, 577-596.
- JOLY R., 1966 - Contribution à l'étude du cycle de mue et de son déterminisme chez les Myriapodes, Chilopodes. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 3, 379-480.

- JOLY R., DESCAMPS M., 1969 - Evolution du testicule, des vésicules séminales et cycle spermatogénétique chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode, Chilopode). Arch. Zool. exp. gén., 110, 341-348.
- JOLY R., DESCAMPS M., 1977 - Influence de l'électrostimulation cérébrale sur l'histologie ultrastructurale et le rôle physiologique des glandes cérébrales chez *Lithobius forficatus* L. (Myriapode, Chilopode). Arch. Biol., 88, 3, 333-347.
- JOLY R., PORCHERON P., DRAY F., 1979 - Etude des variations du taux d'ecdystéroïdes au cours du cycle de mue dans l'hémolymphe de *Lithobius forficatus* L. (Myriapode, Chilopode) par dosage radioimmunologique. C.R. Acad. Sci., 228, 243-246.
- JONES T.R., 1978 - The blood/germ cell barrier in male *Schistocera gregaria* : the time of its establishment and factors affecting its formation. J. Cell. Sci., 31, 145-163.
- KAMBEYSELLIS M.P., WILLIAMS C.M., 1971a - In vitro development of insect tissues I - A macromolecular factor prerequisite for silkworm spermatogenesis. Biol. Bull. mar. biol. lab., Woods Hole, 141, 527-540.
- KAMBEYSELLIS M.P., WILLIAMS C.M., 1971b - In vitro development of insect tissue II. The role of ecdysone in spermatogenesis of the silkworm. Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole 141, 541-552.
- LANE N.J., SKAER H., LEB., SWALES L., 1977 - Intercellular junctions in the central nervous system of insects. J. Cell. Sci. 26, 175-199.
- LANE N.J., HARRISON J.B., 1978 - An unusual type of continuous junction in *Limulus*. J. Ultrastruct. Res. 64, 85-97.
- LEIK J., KELLY D.E., 1970 - Septate junctions in the gastrodermal epithelium of *Phialidium* : a fine structural study utilized ruthenium red. Tissue and cell, 2, 435-441.

- LIEBRICH W., SCHROETER D., 1982 - Gap junctions in spermatocyte cysts of *Drosophila hydei* testis, Int. J. Invertebr. Reprod. 5, 243-245.
- LOEWENSTEIN W.R., 1966 - Permeability of membrane junctions. Ann. N.Y. Acad. Sc., 137, 441-472.
- LOEWENSTEIN W.R., KANNO Y., 1964 - Studies on an epithelial (gland) cell junction. I. Modifications of surface membrane permeability. J. Cell. Biol., 22, 565-586.
- MARCAILLOU Ch., SZOLLOSI A., 1975 - Variation de perméabilité du follicule testiculaire chez le criquet *Locusta migratoria migratorioides* (Orthoptère) au cours du dernier stade larvaire. C.R. Acad. Sci., D, 281, 2001-2004.
- MARCAILLOU Ch., SZOLLOSI A., PORCHERON P., DRAY F., 1978 - Uptake of horseradish peroxydase by the testis of *Locusta migratoria* during the last larval instar ; relation with variations of ecdysteroid levels in haemolymph. Cell Tiss. Res. 188, 63-74.
- MEYRAN J.C., 1982 - Segmental variations of intercellular junctions in insect malpighian tubules, a comparative study of two species. J. Ultrastruct. Res. 79, 31-46.
- NAGANO T., SUZUKI F., 1976 - The postnatal development of the functional complexes of the mouse sertoli cells as revealed by freeze-fracture. Anat. Rec. 185, 403-418.
- NATH V., 1925 - Spermatogenesis of *Lithobius forficatus*. Proc. Cambridge Phil. Soc., B, 1, 270-277.
- NATH V., 1957 - Animal gametes. Res. Bull. Panjab Univ., 95-99, 1-207.
- NOIROT-THIMOTHEE C., NOIROT C., 1973 - Jonctions et contacts intercellulaires chez les Insectes. I. Les jonctions septées. J. Microscopie, 17, 169-184.

- NOIROT-THIMOTHEE C., NOIROT C., 1980 - Septate and scalariform junctions in Arthropods. *Int. Rev. Crytol.*, 63, 97-140.
- PERACCHIA C., 1973a - Low resistance junctions in crayfish. I. Two arrays of globules in junctional membranes. *J. Cell. Biol.* 57, 54-65.
- PERACCHIA C., 1973b - Low resistance junctions in crayfish. II. Structural details and further evidence for intercellular channels by freeze fracture and negative staining. *J. Cell. Biol.*, 57, 66-76.
- PERSONNE P., 1971 - Etude structurale et cytochimique de la pièce intermédiaire du spermatozoïde des Gastéropodes Pulmonés : cas de spécialisation mitochondriale. Thèse Doct. Sci. Nat., Orsay.
- PORCHERON P., 1979 - L'hormone de mue des Arthropodes : dosage radioimmunologique, production, divers aspects de son rôle physiologique. Thèse Doctorat Etat. Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- PORCHERON P., FOUCRIER J., GROS CL., PRADELLE Ph., CASSIER P., DRAY F., 1976 - Radioimmunoassay of Arthropod moulting hormone : β -ecdysone antibodies production and ^{125}I iodinated tracer preparation. *Febs letters*, 61, 2, 159-162.
- PRENANT A., 1887 - Observations cytologiques sur les éléments séminaux de la Scolopendre (*Scolopendra morsitans* Gew.) et de la Lithobie (*Lithobius forficatus*). *La cellule*, 3, 415-442.
- PRUNESCO C., 1964 - Anatomie microscopique du système génital mâle des Lithobiidés (*Lithobiomorpha*, *Chilopoda*). *Rev. Roumaine Biol.*, 9, 101-107.
- QUAY W.B., 1979 - Biogenic amines in neuroendocrine systems : multiple sources, messages, targets and controls. *Texas reports on Biology and Medicine* 38, 87-103.

- RAPOPORT J., KACHADORIAN W.A., MULLER J., FRANKI N., HAYS R.M., 1981 - Stabilisation of vasopressin - induced membrane events by bifunctional imi-doesters. J. Cell. Biol. 89, 261-266.
- REGER J.F., FITZGERALD M.F., CAMATINI M., 1980 - A correlated thin-section freeze-fracture study on plasmalemmal and mitochondrial membrane specializations in the principal piece of spermatozoa from the Chilopodan *Lithobius forficatus* L. J. Ultrastruct. Res., 73, 157-168.
- REVEL J.P., KARNOVSKY M.J., 1967 - Hexagonal array of subunits of intercellular junctions of the mouse heart and Liver. J. Cell. Biol., 33 C7-C12.
- REYNOLDS E.S., 1963 - The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 17, 208-212.
- RUSSELL L.D., 1978 - The blood - testis barrier and its formation relative to spermatocyte maturation in the adult Rat : a lanthanum tracer study. Anat. Rec., 190, 99-112.
- SATIR P., GILULA N.B., 1973 - The fine structure of membranes and intercellular communication in Insects. Ann. Rev. Entomol., 18, 143-166.
- SETCHELL B.P., VOGLMAYS J.K., WAITES G.M.H., 1969 - A blood-testis barrier restricting passage from blood into rate testis fluid but not into lymph. J. Physiol., 200, 73-85.
- SETCHELL B.P., 1974 - In MARCAILLOU Ch., SZOLLOSI A., 1975.
- SHAKLAI M., TAVASSOLI M., 1982 - Preferential localization of lanthanum to nuclear pore complexes. J. Ultrastruct. Res. 81, 139-144.

- SIMPSON E., ROSE B., LOEWENSTEIN W.R., 1977 - Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science*, 195, 294-296.
- SKAER H.LE B., LANE N.J., 1974 - in NOIROT-TIMOTHEE C., NOIROT C., 1980 -
- STAEHELIN L.A., 1974 - Structure and function of intercellular junctions. *Int. Rev. Cytol.*, 39, 191-283.
- SZOLLOSI A., MARCAILLOU Ch., 1977 - Electron microscope study of the blood testis barrier in an insect *Locusta migratoria*. *J. Ultrastruct. Res.* 59, 158-172.
- THIERY J.P., 1967 - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie*, 6, 987-1018.
- TOMIKO S.A., TARASKEVICH P.S., and DOUGLAS W., 1983 - GABA acts directly on cells of pituitary pars intermedia to alter hormone output. *Nature* 301, 5902, 706-707.
- TUZET O., MANIER J.F., 1951 - La spermatogenèse de *Lithobius calcaratus* C. Koch (Myriapode, Chilopode). *C.R. Acad. Sci.*, 232, 882-884.
- TUZET O., MANIER J.F., 1954 - Les spermatozoïdes de quelques Myriapodes Chilopodes et leur transformation dans le réceptacle séminal de la femelle. *Ann. Sci. Nat. Zool.*, 15, 221-230.
- VIRKKI N., 1951 - Zur Zytologie liniger Scarabaeiden. *Ann. Zool. Soc. "Vanamo"*, 14, 1-104.
- VIRKKI N., 1956 - Zur Kenntnis der postmeiotischen ereignisse der samenentwicklung bei den Skarabäiden (Coleoptera). *Z. Zellforsch.*, 44, 644-655.
- WALKER M., MAC GREGOR H.C., 1968 - Spermatogenesis and the structure of the mature sperm in *Nucella lapillus* (L). *J. Cell. Sci.*, 3, 95-104.

WHITE HOUSE B.J., VINSON G.P., THODY A.J., 1982 - Dopaminergic control of aldosterone : modulation of the response of rat adrenal zona glomerulosa cells to α - MSH. by pretreatment with bromocriptine or metoclopramide. *Steroids* 39, 2, 155-164.

WOOD R.L., 1959 - Intercellular attachment in the epithelium of *Hydra* as revealed by electron microscopy *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 6, 345-352.

ZAMPIGHI G., CORLESS J.M., ROBERTSON J.D., 1980 - On gap junction structure. *J. Cell. Biol.* 86, 190-198.

