

50376
1983
253

N° d'ordre : 1055

50376
1983
253

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

Spécialité : Biologie et Physiologie Animales

par

Zoubida TAGHY

LA REPRISE DE LA MEÏOSE OVOCYTAIRE CHEZ LES AMPHIBIENS URODÈLES ETUDE CYTOLOGIQUE ET CYTOCHIMIQUE



Soutenue le 27 Juin 1983 devant la Commission d'Examen

MM.	A.	CAPURON	Président
	P.	GUERRIER	Rapporteur
	J.C.	ANDRIES	
	B.	BOILLY	Examineurs

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

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

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

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

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

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

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

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNOT Ernest	Biologie végétale

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FOURET René	Physique du solide
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean Pierre	Catalyse
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie physique

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, électrotechnique, automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre

Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences économiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphé-
M. MAHIEU Jean Marie	Physique atomique et moléculaire. riques
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PETIT Francis	Chimie organique, minérale et analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean Paul	Physiologie animale
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique

M. WATERLOT Michel
M. WERNER Georges
M. WOSNIAK Michel
Mme ZINN JUSTIN Nicole

Géologie générale
Informatique fondamentale appliquée
Hydrométallurgie
Algèbre

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPÎTRE I : DESCRIPTION GÉNÉRALE DES ÉVÉNEMENTS MORPHOLOG- IQUES LIÉS À L'ÉVOLUTION MÉIOTIQUE DES OVOCYTES.	3
I. - INDUCTIONN DE LA MATURATION	3
II. - ASPECTS CYTOLOGIQUES ET ULTRASTRUCTURAUX	4
A - Métabolisme du glycogène	4
B - Les relations ovocyte-cellules folliculaires	5
C - Lamelles annelées et vésicules	6
CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES	8
I. - ETUDE CYTOLOGIQUE	9
A - Microscopie photonique	9
B - Microscopie électronique	9
1 - Techniques classiques	9
2 - Cryofracture	10
II. - ETUDE CYTOCHIMIQUE	10
A - Microscopie photonique	10
1 - Réaction à l'acide périodique-Schiff (P.A.S.)	11
2 - Réaction à l'acide périodique-dimédon (P.A.S. dimédon).	11
3 - Technique de coloration au carmin de Best	12
B - Microscopie électronique.	12
CHAPITRE III : RÉSULTATS	
I. - CONDITIONS DE MATURATION EN PRESENCE DE PROGESTERONE	13
A - Anoure (Xenope)	13
B - Urodèles (Pleurodèle, Axolotl)	14
1 - Pleurodèle	14
2 - Axolotl	16

II. - OBSERVATIONS CYTOLOGIQUES ET CYTOCHIMIQUES DE LA	
MATURATION	17
A - Aspects cytologiques	17
1 - Anoure : Xenope	17
2 - Urodèles: Pleurodèle et Axolotl	17
a) Pleurodèle	17
b) Axolotl	18
B - Observations cytochimiques de la maturation	19
1 - Pleurodèle	19
a) Ovocytes en fin de croissance	19
- Réaction à l'acide périodique-Schiff	19
- Digestion enzymatique	19
- Réaction à l'acide périodique-dimédon-	
Schiff (PAS-dimédon)	19
- Carmin de Best	19
b) Ovocytes en cours de maturation.	20
- Réaction PAS-dimédon	20
c) Ovocytes à la fin de la maturation	20
- Réaction PAS-dimédon	20
- Carmin de Best	20
2 - Axolotl	21
3 - Comparaison avec le Xenope	21
III. - ULTRASTRUCTURE DE L'OVOCYTE EN FIN DE CROISSANCE ET	
PENDANT LA MATURATION	22
A - Ultrastructure de l'ovocyte en fin de croissance	22
1 - Pleurodèle	22
a) Enveloppes ovocytaires	22
b) Cytoplasme cortical	23
c) Cytoplasme périnucléaire	24
2 - Axolotl	25
3 - Comparaison avec le Xenope	25
B - Modifications ultrastructurales au cours de la	
maturation	26
1 - Pleurodèle	26
a) Cytoplasme cortical	26
α) Les lamelles annelées	27

β) Les vésicules	27
γ) Le glycogène	28
L'ovocyte au début de la maturation	28
L'ovocyte en cours de maturation	28
Description du phénomène sécrétoire du glycogène	29
b) Cytoplasme périnucléaire	31
2 - Axolotl	31
3 - Comparaison avec le Xenope	32
C - Ultrastructure de l'ovocyte en fin de maturation	32
1 - Pleurodèle	32
a) Pôle animal	32
b) Pôle végétatif	33
2 - Axolotl	34
3 - Comparaison avec le Xenope	34
 CHAPÎTRE IV : DISCUSSION GÉNÉRALE	 36
III. - MECANISME DE SECRETION DU GLYCOGENE	36
II. - EVOLUTION DE LA SURFACE OVOCYTAIRE ET DES RELATIONS OVOCYTE-CELLULES FOLLICULAIRES	40
III. - EVOLUTION DES LAMELLES ANNELEES	41
 CHAPÎTRE V : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 45

Liste des principales abréviations utilisées dans les planches.

cf : cellule folliculaire	pa : pôle animal
chr : chromosome	pm : plasmalemme
ci : cytoplasme interne	pv : pôle végétatif
cmv : corps multivésiculaire	tc : tissu de collagène
co : cytoplasme ovocytaire	tm : tache de maturation
en : enveloppe nucléaire	ve : vésicule
ep : espace périvitellin	vg : vésicule germinative
ev : enveloppe vitelline	vi : vitellus
f : fuseau de division	vp : vésicule de pinocytose
fc : feutrage cortical	
fp : feuillet péritonéal	
g : appareil de Golgi	
gc : granule cortical	
gd : granule dense	
gl : glycogène	
gpl : globule polaire	
l : lipide	
la : lamelle annelée	
m : mitochondrie	
ma : macrovillosité	
ml : mélanosome	
mt : microtubule	
mv : microvillosité	
mve : membrane vésiculaire	
nc : nucléoplasme	
ov : ovocyte	

INTRODUCTION GENERALE

La maturation des ovocytes d'Amphibiens s'accompagne de nombreuses modifications morphologiques et biochimiques.

Les modifications morphologiques concernent la membrane ovocytaire, le cytoplasme et le noyau ou vésicule germinative. Les événements qui intéressent la vésicule germinative ont souvent servi de point de repère pour établir la chronologie de la maturation.

La cytologie ultrastructurale des ovocytes d'Amphibiens Anoures a fait l'objet de nombreuses recherches (KEMP, 1956 a ; WARTENBERG et SCHMIDT, 1961 ; BALINSKY et DEVIS, 1963 ; BALINSKY, 1966 ; WISCHNITZER, 1966 ; VAN GANSEN, 1966 ; BRACHET et coll. 1970) et leur évolution pendant la maturation est à présent bien connue.

En revanche peu de travaux existent sur la maturation des ovocytes d'Urodèles (HOPE et coll., 1963 ; BRACHET, 1974 ; BARSACCHI-PILONE et HUMPHRIES, 1975). La mise au point effective *in vitro* des conditions de maturation chez un urodèle : *Pleurodeles waltlii* n'est connue que depuis peu (VILAIN, 1975). Mais aucune description morphologique et cytochimique précise des ovocytes de Pleurodèle depuis le déclenchement de la méiose jusqu'à la métaphase II n'a été entreprise jusqu'à ce jour.

L'étude présente a été effectuée afin de mieux connaître les modifications morphologiques précoces qui peuvent intervenir bien avant la migration de la vésicule germinative vers la surface du pôle animal et qui intéressent à la fois les relations ovocyte - cellules folliculaires, la membrane ovocytaire, éventuellement les organites intracellulaires des ovocytes de Pleurodèle et d'Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) soumis à l'action de la progestérone. Une observation succincte des ovocytes d'un Anoure *Xenopus laevis* a été menée à titre de comparaison.

Les remaniements morphologiques ont été suivis en microscopie photonique et électronique, et nous avons tenté une étude en cryofracture qui reste très préliminaire.

Au cours de nos observations, nous avons remarqué que les granules de glycogène présents aussi bien dans la région périnucléaire que dans le reste du cytoplasme subissent une évolution particulière au cours de la méiose. Les recherches sur ce sujet sont restées jusqu'à présent fragmentaires. HAY (1966), VAN GANSEN et SCHRAM (1969), ont confondu les ribosomes associés en polyribosomes avec les granules de glycogène diversement associés. Les travaux de BRACHET et coll. (1970) ont montré la présence de granules β de glycogène et des ribosomes à la partie basale de la vésicule germinative. Aucun de ces auteurs ne s'est intéressé de près à l'évolution de ces granules de glycogène au cours de la maturation, leur présence n'a été que simplement mentionnée.

Par contre, plusieurs publications relatent l'évolution des lamelles annelées, leur origine et leur destinée à la fin de la maturation (KESSEL, 1963 a ; KESSEL, 1968 ; KESSEL et SUBTELNY, 1981 ; IMOH, 1982). Ces données les plus récentes sur les lamelles annelées, concernent les ovocytes d'Amphibiens, en particulier les Anoures, au cours et au terme de leur croissance et après la rupture de la vésicule germinative. IMOH (1982), a réalisé une étude sur l'évolution des lamelles annelées au cours de la maturation des ovocytes d'un Urodèle *Cynops pyrrhogaster*. Nous avons essayé d'analyser l'évolution de ces cytomembranes pendant la période allant du déclenchement de la méiose à la métaphase II dans les ovocytes de Pleurodèle incubés en présence de progestérone. Les résultats obtenus montrent que c'est au cours de cette période qu'ont lieu les changements dans le nombre et la morphologie des lamelles annelées.

La membrane ovocytaire subit, elle aussi, des modifications. Le nombre et la taille des microvillosités ornant le plasmalemme décroissent parallèlement à la rupture de l'enveloppe nucléaire. Ceci a été décrit par différents auteurs dans les ovocytes d'Amphibiens Anoures (KEMP et ISTOCK, 1967 ; MAGISTRINI, 1977 ; MARCHER, 1978) et Urodèles (HOPE et coll., 1963).

CHAPITRE I

DESCRIPTION GÉNÉRALE DES ÉVÉNEMENTS MORPHOLOGIQUES

LIÉS À L'ÉVOLUTION MÉIOTIQUE DES OVOCYTES.

I. - INDUCTION DE LA MATURATION

Au terme de leur croissance, les ovocytes des Amphibiens sont bloqués en prophase de la première division de méiose. Sans interphase, ils passent de la prophase I à la métaphase de la seconde division méiotique. Le stimulus physiologique de cette maturation semble être la sécrétion de progestérone par les cellules folliculaires qui entourent l'ovocyte sous l'influence d'un signal hypophysaire (MASUI, 1967 ; SMITH et coll., 1968).

De nombreux métabolites de la progestérone peuvent également induire la maturation. Cependant, l'activité de ces agents est inférieure à celle de l'hormone elle-même (REYNHOUT et SMITH, 1973 ; FOUCHET et coll., 1975 ; OZON et coll., 1975).

La progestérone permet donc la reprise de l'évolution méiotique et ne se révèle efficace que si elle est appliquée à l'extérieur de l'ovocyte, elle demeure sans effet après microinjection dans les ovocytes de *Rana pipiens* (MASUI et MARKERT, 1971 ; SMITH et ECKER, 1969, 1971) ou de *Xenopus laevis* (DRURY et SCHORDERET-SLATKINE, 1975 a ; JACOBELLZ et coll., 1974).

Le signal membranaire engendré par l'hormone est transmis au noyau par l'intermédiaire d'une libération intracellulaire de calcium et/ou d'un facteur intracytoplasmique le MPF (Maturation Promoting Factor) qui induit la rupture de la vésicule germinative (MASUI et MARKERT, 1971 ; REYNHOUT et SMITH, 1974 ; SCHORDERET-SLATKINE et DRURY, 1973 ; WASSERMAN et MASUI, 1975 a). Ce même facteur a été également mis en évidence dans le cas de la maturation des ovocytes des Echinodermes et en particulier ceux d'Etoile de mer (KISHIMOTO et KANATANI, 1976).

La progestérone agit à la surface externe de la membrane (ISHIKAWA et coll., 1977 ; GODEAU et coll., 1978a ; BAULIEU et coll., 1978) des ovocytes de *Xenopus laevis*, mais les travaux de TSO et coll. (1982) plaident en faveur d'une action hormonale possible au niveau des sites de la surface interne de la membrane.

Après avoir soumis des fragments membranaires isolés d'ovocytes de *Rana pipiens* à l'action de la progestérone, CLOUD et SCHUETZ (1977) affirment que l'hémisphère animal est plus sensible à l'hormone que l'hémisphère végétatif.

Toutes ces études portent sur la maturation des Amphibiens Anoures. En effet, il a été montré que la progestérone ne permet la reprise de la méiose des ovocytes des Urodèles *Pleurodeles waltlii* (BRACHET, 1974)

et *Notophtalmus viridescens* (BARSACCHI-PILONE et HUMPHRIES, 1975) qu'après un traitement des animaux par les gonadotropines. En fait, les ovocytes de *Pleurodeles waltlii*, obtenus pendant la saison normale de ponte (octobre-mai), répondent directement à la progestérone alors que pendant la période de repos sexuel les ovocytes restent bloqués en prophase I malgré l'apport hormonal. (VILAIN, 1975).

La maturation est marquée par plusieurs événements morphologiques, dont la migration de la vésicule germinative au pôle animal, la rupture de l'enveloppe de la vésicule, la formation du fuseau de division et son orientation perpendiculaire à la surface du cortex. Ces derniers phénomènes se traduisent par l'apparition au centre du pôle animal d'une tache blanche que l'on utilise couramment pour identifier la réponse hormonale.

La migration et la rupture de la vésicule germinative sont des processus tardifs de la maturation. Bien avant cette étape, de nombreux remaniements morphologiques et biochimiques ont lieu.

II. - ASPECTS CYTOLOGIQUES ET ULTRASTRUCTURAUX.

L'étude de la maturation des ovocytes des Amphibiens a été reprise par plusieurs auteurs depuis que ce phénomène peut être obtenu *in vitro* (DETTLAFF, NIKITINA et STROEVA, 1964 ; DETTLAFF, 1966 ; BRACHET, 1965 a, b, 1967 ; SMITH, ECKER et SUBTELNY, 1966). Ils ont utilisé différentes techniques de mise en évidence spécifique et ont analysé l'ultrastructure des mécanismes morphologiques qui se produisent à la suite des traitements des ovocytes par la progestérone. Si depuis KEMP (1956 b), de nombreux auteurs ont étudié la cytologie ultrastructurale des ovocytes et des oeufs aux premiers stades de leur développement chez les Amphibiens (WARTENBERG, 1962 ; BALINSKY et DEVIS, 1963 ; BALINSKY, 1966 ; WISCHNITZER, 1966 ; VAN GANSEN et SCHRAM, 1968, 1969), la présence et l'importance de la distribution du glycogène ne sont que simplement mentionnées.

A - Métabolisme du glycogène.

BERGAMI, MANSOUR et SCARANO (1968) ont étudié le métabolisme des polysaccharides et en particulier le glycogène sur des oeufs fécondés et des oeufs non fécondés d'Etoile de mer. Ces auteurs se sont fondés sur

l'évaluation de l'activité d'une enzyme : la glycogène phosphorylase qui devient active après la fécondation et pendant la segmentation. Sa localisation au niveau de la cellule a été recherchée et les résultats semblent montrer que l'activation de la glycogène phosphorylase est due à sa libération à partir des structures subcellulaires qui l'englobent dans les oeufs non fécondés. Chez différents groupes d'animaux, la synthèse du glycogène commence principalement, au cours des derniers stades de l'ovogenèse (ANDO, 1960 ; BERGAMI et coll., 1968 ; HUEBNER et coll., 1975 ; YUROWITZKY et MILMAN, 1972 ; BRACHET et coll., 1970), et s'arrête au moment de la maturation de l'ovocyte, une consommation importante s'effectue aussi bien à l'ovulation qu'à la fécondation (EYAL-GILADI et coll., 1979 ; YUROWITZKY et MILMAN, 1972).

Si le glycogène semble être la source d'énergie primaire durant le développement embryonnaire précoce (GUSSEK et HEDRICK, 1972), peu de travaux rendent compte de son métabolisme au cours de l'ovogenèse et de la maturation des ovocytes d'Amphibiens . VAN GANSEN et SCHRAM (1969), ont observé la présence d'une grande quantité de glycogène dans l'espace extracellulaire, entre les blastomères, dans les gastrules de *Xenopus laevis*.

Cependant, certains auteurs ont pensé qu'il était possible de confondre les ribosomes ou polyribosomes, avec les granules de glycogène (HAY, 1966 ; PERRY, 1967 ; VAN GANSEN, 1967 ; BRACHET et coll., 1970). Il était dès lors indispensable d'employer des techniques de mise en évidence spécifique du glycogène. Les nombreuses études, biochimiques, histochimiques et ultrastructurales sur le métabolisme du glycogène dans les tissus embryonnaires (BENZO et coll., 1975 ; SASSE, 1975 ; EYAL-GILADI et coll., 1979) et adultes (CORVAJA et coll., 1971 ; TAKEUCHI et coll. 1975 ; DAVIDOWITZ et coll., 1975), montrent une relation étroite entre le métabolisme du glycogène et l'évolution de diverses structures membranaires.

B - Les relations ovocyte-cellules folliculaires.

Les relations étroites entre l'ovocyte et les cellules folliculaires qui l'entourent ont fait l'objet d'études chez *Rana esculenta* (WARTENBERG et GUSEK, 1960) *Rana pipiens* (KEMP 1956 a ; KEMP, 1961) *Xenopus laevis*, *Rana temporaria*, *Triturus alpestris*, *Ambystoma mexicanum*

(WARTENBERG, 1962) et *Triturus viridescens* (HOPE et coll., 1963). Dès les stades précoces de l'ovogenèse, l'ovocyte dont la surface est lisse, est directement en contact avec la membrane plasmique des cellules folliculaires ; celles-ci se détachent de l'ovocyte lorsque sa membrane plasmique développe des microvillosités qui se projettent dans l'enveloppe vitelline nouvellement créée entre les deux systèmes cellulaires. les prolongements cellulaires des cellules folliculaires viennent au contact de la membrane plasmique de l'ovocyte, mais lors de la reprise de la méiose les microvillosités régressent et les cellules folliculaires se détachent.

Par analogie avec d'autres structures cellulaires telles que les cellules de l'épithélium intestinal (PALAY et KARLIN, 1959), la plupart des auteurs ont supposé que la fonction des microvillosités et des macrovillosités était d'absorber les matières nutritives élaborées ou transportées par les cellules folliculaires. KEMP (1956 a) et WARTENBERG (1962) décrivent dans ce sens de nombreuses vésicules de pinocytose au niveau de la membrane plasmique ovocytaire.

D'autres études (KEMP et ISTOCK, 1967 ; MAGISTRINI, 1977 ; MARCHER, 1978) ont montré également que le nombre et la taille des microvillosités tapissant le plasmalemma décroissent parallèlement à la rupture de l'enveloppe nucléaire.

C - Lamelles annelées et vésicules.

Les organites cytoplasmiques des oeufs d'Amphibiens ont fait l'objet de plusieurs études, d'un point de vue cytochimique et cytologique (VAN GANSEN, 1966 ; VAN GANSEN et SCHRAM, 1969 ; BRACHET et coll., 1970 ; BRACHET, 1974). Contrairement au glycogène, les lamelles annelées ont été bien étudiées.

Les lamelles annelées qui sont des structures cytoplasmiques contenant plusieurs couches de membranes empilées les unes sur les autres, ont été décrites pour la première fois par Mc CULLOCH (1952) dans les oeufs d'*Arbacia*. Elles ont été observées d'une façon dominante dans les ovocytes et les spermatoctes de tous les phylums du règne animal (KESSEL, 1968). En plus, elles ont été décrites dans les tumeurs et les cellules cancéreuses (KESSEL, 1968).

Se basant sur l'analogie morphologique certains auteurs ont supposé que les lamelles annelées pourraient dériver de l'enveloppe nucléaire (AFZELIUS, 1955 ; SWIFT, 1956 ; MERRIAM, 1959 ; OKADA et WADDINGTON, 1959 ; BARER et coll., 1960 ; REBHUN, 1961). KESSEL (1963 a, b) a montré que les lamelles annelées proviennent du bourgeonnement de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire. Leur rôle n'est pas encore clarifié. Il a été suggéré cependant, qu'elles auraient une fonction dans le transfert de la spécificité génétique du noyau vers le cytoplasme (SWIFT, 1956), comme le supportent les observations montrant leur origine nucléaire probable (KESSEL, 1968 ; KESSEL et BEAMS, 1969 ; BAL et coll., 1968 ; GULYAS, 1971).

En dépit de ces travaux, la distribution des lamelles annelées dans les ovocytes d'Amphibiens au cours de l'ovogénèse et la maturation n'a été que très peu analysée. En accord avec BALINSKY et DEVIS (1963) dans les ovocytes de *X. laevis* elles deviennent visibles dès les premiers stades vitellogéniques, continuent à être présentes pendant toutes les phases de croissance, et disparaissent à la fin de la maturation par transformation en masses vésiculeuses.

La distribution de ces lamelles a été rapportée par KESSEL (1968) dans les ovocytes de *Rana pipiens*. Elles sont abondantes dans la région polaire de l'hémisphère animal mais rares dans la région polaire végétative; celles qui sont observées dans le cortex sont plus petites que celles observées plus à l'intérieur. Ce qui suggère le déplacement des lamelles vers le cortex et leur fragmentation en séquences plus petites. Dans les ovocytes de *Rana pipiens* intervient par la suite la vésiculisation des lamelles annelées (KESSEL et SUBTELNY, 1981).

Dans les ovocytes en fin de croissance d'un Urodèle *Cynops pyrrhogaster* (IMOH, 1982), les lamelles annelées se situent au contact de masses denses aux électrons et de l'enveloppe nucléaire. Les empilements de lamelles augmentent en nombre après 6 heures de traitement à la progestérone dans les ovocytes de *Cynops* (IMOH, 1982). Après cette période (6 heures), elles commencent à disparaître ; quelques temps après la rupture de l'enveloppe nucléaire elles disparaissent complètement. Aucun changement immédiat de la structure fine de la zone corticale ne se produit à la suite de la disparition de ces lamelles.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les femelles de Pleurodèle , d'Axolotl et de Xenope, sont anesthésiées au MS222 à 1 g/l puis rincées à l'eau courante. L'opération consiste en une incision de la peau et des muscles sous-jacents, sous la forme d'une boutonnière en position ventro-latérale et postérieure de la cavité abdominale.

Les ovocytes sont prélevés dans l'ovaire et placés en incubation dans le milieu OR₂ de WALLACE (WALLACE et coll., 1973) dont la composition est la suivante :

- NaCl	82,5 mM/l
- KCl	2,5 mM/l
- CaCl ₂	1 mM/l
- MgCl ₂	1 mM/l
- Na ₂ HPO ₄	1 mM/l

Le pH est ajusté à la valeur de 7,4 à l'aide du tampon Hépes/NaOH dans les proportions :

- Hepes	3 mM/l
- NaOH	1,8 mM/l

La pression osmotique de ce milieu est de 163 mos.

Seuls les ovocytes intraovariens, choisis au terme de leur accroissement, sont isolés et équilibrés dans ce milieu à la température de 13-14° C pendant 12 heures environ.

Ils sont ensuite mis en suspension dans le milieu OR₂ normal à la température ambiante par lots de 40 dans des boites de Pétri. Ils ne subissent aucun traitement préalable ayant pour effet de les séparer de leur enveloppe folliculaire.

Ils reçoivent en continu de la progestérone à la concentration finale de 1 mg/ml, préalablement diluée dans l'éthanol.

Les observations à la loupe binoculaire ont permis de suivre l'évolution morphologique et d'évaluer ainsi le pourcentage de maturation dans chaque cas.

Différentes méthodes d'observation en microscopie photonique et électronique ont été utilisées.

I. - ETUDE CYTOLOGIQUE

A - Microscopie photonique.

Des ovocytes traités à la progestérone ainsi que des ovocytes témoins sont fixés dans le liquide de Bensley ou de Bouin-hollande toutes les heures pendant une période de 12 à 24 heures. Les pièces sont ensuite incluses dans le paraplast après passage dans une solution de celloïdine diluée à 1 % dans le Benzoate de méthyle.

Les ovocytes sont débités en coupes sériées de 7 μ m. Généralement, la grande richesse en vitellus des ovocytes d'Amphibiens, entraîne de sérieuses difficultés pour la confection des coupes. Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé la technique dite de "Trempage" d'après MARTOJA (1967). Les blocs entamés sont traités par le mélange :

- Alcool éthylique à 60° 9 volumes
- Glycérine 1 volume

Lorsque le vitellus éclate, le bloc de paraplast est plongé dans ce mélange pendant une durée de trempage de 12 à 24 heures. Il est débité à nouveau en coupes sériées ; ce procédé, bien que long, a donné des résultats satisfaisants.

Les coupes ainsi obtenues sont colorées par le rouge nucléaire associé au picro-indigo-carmin.

B - Microscopie électronique.

1 - Techniques classiques.

Les ovocytes sont fixés avec la glutaraldéhyde à 2,5 % dans le tampon phosphate pH = 7,4 pendant 24 heures. Avant le passage dans la solution de lavage, les deux hémisphères animal et végétatif sont séparés. Les ovocytes subissent une post-fixation au tétroxyde d'osmium à 1 % dans le tampon phosphate pendant une durée de 3 heures. L'exposition des pièces à l'acétate d'uranyle 1 % dans l'alcool 70° est effectuée en cours de déshydratation. Les pièces sont incluses dans l'épon. Les coupes sont effectuées à l'ultramicrotome Reichert OMU₂ puis ramassées sur des grilles à membrane (parlodion en solution 0,4 % dans l'acétate d'isoamyle), elles sont contrastées

par le citrate de plomb selon la technique de REYNOLDS (1963), précédée d'un passage dans l'acétate d'uranyle en solution alcoolique. Les grilles ainsi obtenues sont examinées au microscope électronique JEOL JEM 120.

2 - Cryofracture

Les matériels destinés à cette étude ont été fixés à la glutaral-déhyde à 2,5 % en tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4, rincés dans le tampon puis imprégnés par le glycérol à 30 %.

Congelés dans l'azote fondant (préparé par dépressurisation, d'azote liquide) après installation sur des supports en or, les échantillons sont fracturés sous vide (10^{-6} Torr) à -150° C dans un appareil de cryofracture BALZERS BAF 380.

Les surfaces de fractures 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 de 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.

Terminologie.

Lors de la fracture, la membrane est clivée au niveau de la zone interne hydrophobe, séparant ainsi deux faces : l'une adjacente au cytoplasme et qui est appelée face P et sa complémentaire ou face E, d'après la nomenclature de BRANTON et coll. (1975).

II. - ETUDE CYTOCHIMIQUE

Notre intérêt pour les polysaccharides et en particulier le glycogène, nous a conduit à utiliser diverses techniques spécifiques de mise en évidence du glycogène, en microscopie photonique et électronique.

A - Microscopie photonique.

Les pièces sont fixées dans le Bensley :

- . Alcool absolu saturé d'acide picrique 9 volumes
- . Formol neutralisé 1 volume

pendant 24 heures à la température de 4° C. Cette méthode permet une bonne fixation des particules de glycogène.

1 - Réaction à l'acide périodique-Schiff (P.A.S.) (MAC MANUS, 1946).

Principe : Après passage dans l'acide périodique les polysaccharides, sont oxydés et donnent naissance à des aldéhydes qui sont colorés par le réactif de Schiff.

Les coupes histologiques déparaffinées sont placées dans une solution d'acide périodique à 0,5 % dans l'eau distillée pendant 10 minutes. Les pièces subissent ensuite un traitement au réactif de Schiff pendant 15 minutes, elles sont différenciées dans trois bains d'eau sulfureuse puis dans l'eau courante.

Les noyaux sont colorés par l'hématoxyline de Groat, une coloration de fond est effectuée au picro-indigo-carmin.

Les résultats de la réaction précédente sont contrôlés par une digestion enzymatique à l'amylase. Dans ce cas, les coupes subissent un traitement à l'amylase pendant 1 heure à 37 ° C. Après lavage et oxydation périodique, elles sont traitées par le réactif de Schiff.

Cette opération a pour but l'élimination du glycogène.

Il y a lieu de rappeler, que la réactivité au P.A.S. disparaît lorsqu'un blocage des fonctions "aldéhydes" est intercalé, entre l'oxydation périodique et l'action du réactif de Schiff ; ce blocage est obtenu par le dimédon (diméthylcyclohexanedione).

2 - Réaction à l'acide périodique-dimédon-Schiff (P.A.S. dimédon)

La technique (P.A.S. dimédon) est réalisée selon les indications de LISON (1960) et de GABE (1968). Le dimédon bloque plus difficilement les aldéhydes produits par l'oxydation périodique du glycogène que ceux issus des autres polysaccharides. Son emploi permet donc de mettre en évidence le glycogène seul.

Le traitement des coupes se fait de la façon suivante :

Entre l'oxydation périodique et le passage dans le réactif de Schiff, les coupes sont traitées par le dimédon dilué à 5 % dans l'alcool absolu pendant une durée de 5 heures.

3 - Technique de coloration au carmin de Best (GABE 1968)

Les coupes sont colorées par l'hématoxyline de Groat, et ensuite par le carmin de Best qui est un mélange de solution mère de carmin et de liquide de dilution dont la composition est la suivante :

- Solution mère de carmin 1 volume
- Liquide de dilution (50 % alcool méthylique, 50 % ammoniacque) 2 volumes

Sans aucun lavage les coupes sont différenciées directement par le différenciateur :

- Alcool méthylique 4 volumes
- Alcool ethylique absolu 8 volumes
- Eau distillée 10 volumes

jusqu'à cessation de toute extraction du colorant ; on opère ensuite une déshydratation par l'alcool absolu.

B - Microscopie électronique.

La recherche du glycogène est effectuée après coloration des coupes ultrafines à la thiocarbohydrazide-protéinate d'argent (T.C.H.) selon la technique de SELIGMAN modifiée par THIERRY (1967).

Principe de la méthode : Les fonctions aldéhydes révélées par la T.C.H. (en fonction du temps de traitement) sont mises en évidence par le protéinate d'argent.

Après oxydation préalable par l'acide périodique à 1 % pendant 20 minutes, les coupes subissent un flottage sur la thiocarbohydrazide (T.C.H.) 0,2 % à différents temps :

- 40 minutes : mise en évidence du glycogène et des polysaccharides simples.

- 24 heures }
- 48 heures } autres polysaccharides
- 72 heures }

Après un rinçage soigneux à l'acide acétique et à l'eau distillée, les pièces sont traitées par le protéinate d'argent à 1 % dilué dans l'eau distillée, pendant une demi-heure à l'obscurité.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

I. - CONDITIONS DE MATURATION EN PRESENCE DE PROGESTERONE

A la fin de sa phase d'accroissement, l'ovocyte d'Amphibien se présente comme une grosse cellule sphérique dont le diamètre varie suivant les espèces (Xenope \simeq 1,2 mm ; Pleurodèle \simeq 1,5 mm et l'Axolotl \simeq 1,9 mm) ; une polarité apparente se traduit par sa pigmentation, l'hémisphère supérieur est plus fortement pigmenté que le pôle inférieur ou hémisphère végétatif.

A - Anoure (Xenope).

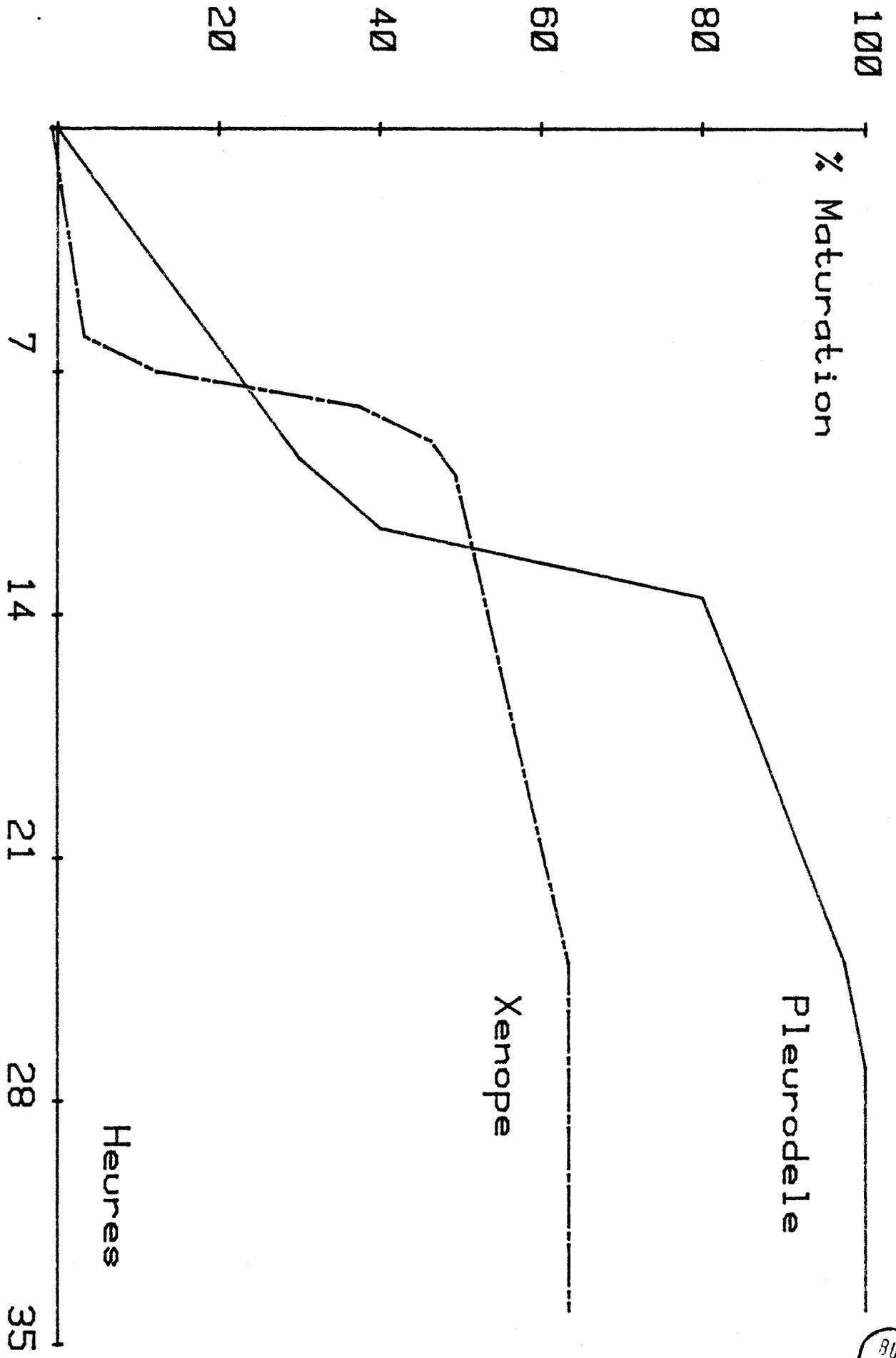
Les travaux de BRACHET et coll. (1970) décrivent l'évolution morphologique des ovocytes de *Xenopus laevis* au cours de la maturation. Ils montrent clairement que le contenu de la vésicule germinative se déverse dans le cytoplasme dès la reprise de la méiose et au cours de toute la période de migration vers la surface du pôle animal.

Nos propres observations sur les ovocytes de Xenope traités à la progestérone nous ont précisé que la formation de la tache de maturation ou tache de ROUX, qui représente le stade final du processus de maturation, ainsi qu'un changement de pigmentation au pôle animal sont les seuls remaniements visibles lors de la maturation de ces ovocytes.

Dans les trois expériences réalisées sur les ovocytes de Xenope, l'apparition des taches de maturation qui résultent de la rupture des vésicules germinatives, a lieu entre 5 et 6 heures d'incubation hormonale (courbe 1). Le pourcentage de maturation obtenu avec les ovocytes normaux incubés en présence de progestérone ne dépasse pas 60 % (Tableau I).

Ce taux de maturation est nettement inférieur à celui obtenu dans le cas des ovocytes défolliculés traités à la progestérone (Tableau I) Ce dernier résultat explique le pourcentage de maturation élevé obtenu par

Courbe 1 : Pourcentage de maturation des ovocytes de Pleurodèle et de Xenope en fonction du temps d'incubation dans la progestérogène 1 mg/ml.



certain auteurs (SCHORDERET-SLATKINE et DRURY, 1973) après traitement des ovocytes par la collagénase qui a pour effet d'enlever les cellules folliculaires.

Tableau I : Femelles de Xenope.

Différence de pourcentage de maturation entre les ovocytes normaux et les ovocytes défolliculés, incubés en présence de progestérone.

Femelles	Progestérone			Progestérone (ovocytes défolliculés)		
	ovocytes traités	ovocytes maturés	pourcentage			
20.10.82	40	18	45 %	25	16	64 %
24.11.82	40	20	50 %	40	27	67,5 %
23.02.83	100	64	64 %	—	—	—
Pourcentage moyen			56 %			66 %

B - Urodèles (Pleurodèle, Axolotl)

1 - Pleurodèle.

La figure A (Pl. I) représente un ovocyte de Pleurodèle en fin de croissance, dont le diamètre est légèrement inférieur à 1,5 mm.

Les lots d'ovocytes testés, dans un milieu OR₂ normal en présence de progestérone, proviennent de neuf femelles de Pleurodèle (Tableau II).

Pendant les premières heures d'incubation, aucun changement morphologique apparent ne se produit. Mais après 5 à 6 heures, les vésicules germinatives intactes migrent au pôle animal où elles affleurent sous la membrane plasmique, elles forment des taches circulaires et translucides, phénomène que nous n'observons pas chez le Xenope. Ce stade vésicule germinative (VG) est représenté Planche I, figure B.

Planche I : Morphologie externe des ovocytes de Pleurodèle pendant la maturation.

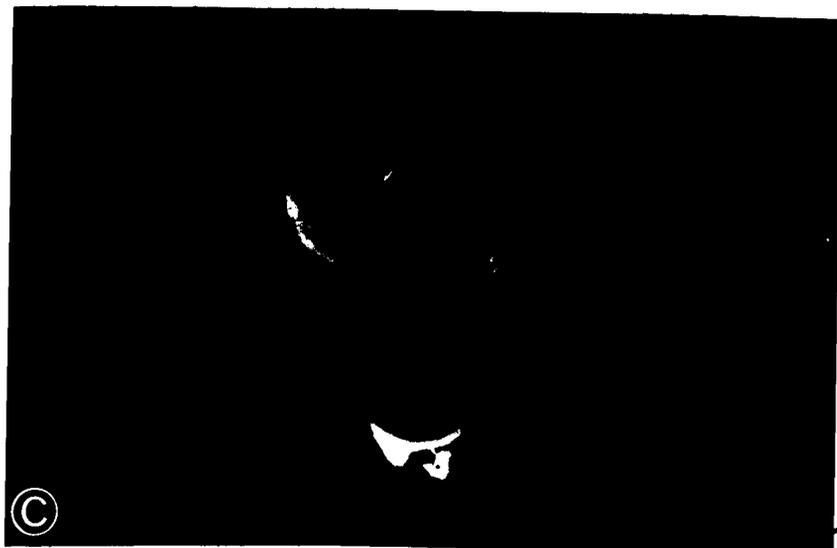
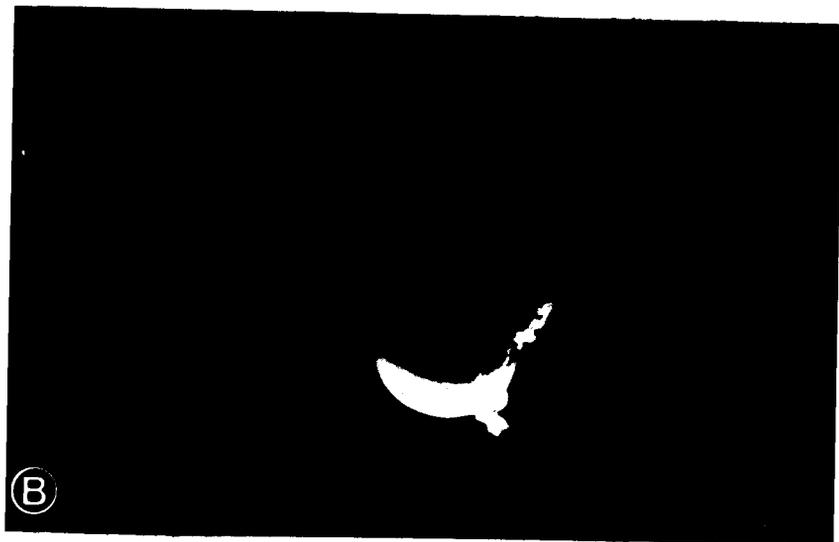
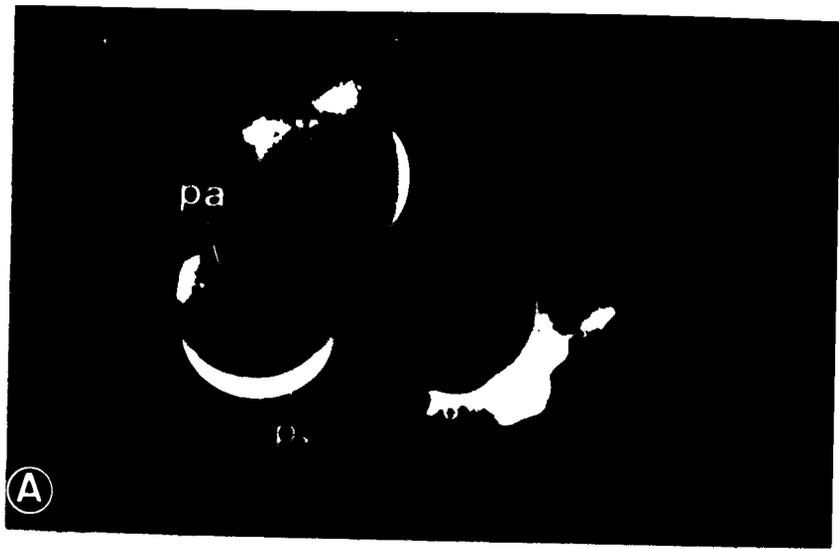
Figure A : Ovocytes témoins, pa : pôle animal, pv : pôle végétatif.
(X 14).

Figure B : Migration de la vésicule germinative au pôle animal après traitement des ovocytes à la progestérone. Ovocytes au stade VG, vg : vésicule germinative.

Figure C : Ovocytes après la rupture de l'enveloppe nucléaire. Apparition de la tache de maturation (tm), qui correspond au stade GVBD (Germinal vesicle breakdown).

Les figures A, B et C sont à la même échelle.





BUS
CIRLE

La tache devient de plus en plus réduite (au bout de 9 à 12 heures) puis disparaît pour faire place à une zone claire au centre de laquelle on observe un premier point sombre (Pl.I, Fig. C), l'ensemble correspond à ce qui est communément appelé la tache de maturation. Ce processus rend compte de la rupture de la vésicule germinative (stade GVBD : Germinal vesicle break down) qui se termine par la métaphase II avec l'émission du premier globule polaire. Dans le même temps les cellules folliculaires se détachent de l'ovocyte, la pigmentation se modifie, elle devient plus foncée et plus granuleuse, dans l'hémisphère animal.

Tableau II : *Ovocytes de Pleurodèle, provenant de neuf femelles différentes. Pourcentage de maturation en présence de progestérone.*

Femelles	Progestérone		
	Ovocytes traités	Ovocytes maturés	Pourcentage
15.01.81	40	40	100 %
22.01.81	40	40	100 %
09.02.81	22	18	81 %
24.02.82	40	40	100 %
02.03.82	30	22	73 %
08.03.82	36	35	97 %
17.03.82	37	37	100 %
22.04.82	40	36	90 %
22.09.82	40	39	97 %
	Pourcentage moyen		95 %

Par ailleurs, nous avons réussi chez le Pleurodèle à extraire manuellement l'enveloppe de cellules folliculaires de 24 ovocytes et nous avons obtenu 9 maturations sans apport hormonal, soit un taux de maturation de 33 % (Tableau III). Ce dernier résultat va dans le sens des travaux de VILAIN et coll. (1980) qui ont réalisé avec succès la reprise de la méiose des ovocytes de Xenope, Pleurodèle et Axolotl, par simple défolliculation manuelle et sans addition de progestérone.

Tableau III : *Femelle de Pleurodèle référencée 15 01 81.*
Pourcentage de maturation dans le cas d'ovocytes normaux traités à la progestérone et d'ovocytes défolliculés sans apport hormonal.

Femelle référéncée 15.01.81	Progestérone			Ovocytes défolliculés		
	Ovocytes traités	Ovocytes maturés	Pourcentage	Ovocytes défolliculés	Ovocytes maturés	Pourcentage
	40	40	100 %	24	9	33 %

2 - Axolotl.

La succession des événements qui ont lieu au cours de la maturation est la même que celle observée dans les ovocytes de Pleurodèle. La vésicule germinative intacte affleure sous la membrane plasmique au pôle animal (stade VG) après sa migration au bout de 4 à 5 heures d'incubation hormonale.

La rupture de la vésicule germinative intervient (stade GVBD) entre 6 et 7 heures d'incubation en présence de progestérone. Le pourcentage de maturation obtenu dans le cas des ovocytes d'Axolotl est voisin de 100 % (Tableau IV).

Tableau IV : Femelles d'*Axolotl*.

Pourcentage de maturation en présence de progestérone.

Femelles		Progestérone	
	Ovocytes traités	Ovocytes maturés	Pourcentage
06.05.82	40	40	100 %
24.05.82	40	38	95 %
	Pourcentage moyen		97,5 %

II. - OBSERVATIONS CYTOLOGIQUES ET CYTOCHIMIQUES DE LA MATURATION.

A - Aspects cytologiques.

1 - Anoure : Xenope.

L'examen des coupes histologiques effectuées sur les ovocytes de Xenope incubés en présence de progestérone permet de remarquer la latence du processus de migration de la vésicule germinative. Il n'y a pratiquement pas de différence concernant la position du noyau entre un ovocyte soumis pendant 2 heures à la progestérone et un ovocyte soumis pendant 4 heures.

Malgré le nombre de coupes réalisées sur des ovocytes à différentes heures d'incubation (0-12 à 24 heures), nous n'avons jamais observé de vésicule germinative intacte au pôle animal comparable au stade VG chez le Pleurodèle.

2 - Urodèles : Pleurodèle et Axolotl.

a) Pleurodèle

Des ovocytes entiers traités à la progestérone sont fixés et débités en coupes histologiques. Leur observation permet de faire une description générale des remaniements cytologiques qui ont lieu lors de la maturation.

En coupe histologique, l'ovocyte témoin se présente avec une membrane plasmique, une enveloppe vitelline et des cellules folliculaires qui l'entourent (Pl. II, fig. A). La polarité observée superficiellement est marquée par le gradient vitellin qui est croissant du pôle animal vers le pôle végétatif ainsi que par la position très excentrique du noyau ou vésicule germinative.

Après quelques heures d'incubation (entre 5 et 7 heures) dans la progestérone, le phénomène le plus évident et le plus connu qui se produit est la migration de la vésicule germinative vers la surface du pôle animal (Pl. II, fig. B) laissant derrière elle une trainée de matériel dépourvu de vitellus (Pl. II, fig. C). Ce stade correspond au stade VG.

La rupture de la vésicule germinative se produit ensuite entre 9 et 12 heures d'incubation hormonale suivant les ovocytes, cette rupture survient à la partie basale (Brachet, 1974), elle se termine par la métaphase II (Pl. III, figs B et C), avec l'émission du premier globule polaire (Pl. III, fig. A).

b) Axolotl

La succession des événements cytologiques est la même que chez le Pleurodèle.

La vésicule germinative située dans l'hémisphère animal, commence à migrer au pôle animal dès les premières heures d'incubation hormonale et atteint la surface entre 4 et 5 heures de traitement en présence de progestérone. Sa rupture a lieu entre 6 et 7 heures de traitement hormonal, lorsque la vésicule germinative est située, comme chez le Pleurodèle, au pôle animal.

Chez les urodèles (Pleurodèle, Axolotl), la migration de la vésicule germinative commence dès les premières heures d'incubation hormonale et continue jusqu'au stade VG, où l'on observe la vésicule germinative encore intacte au pôle animal. La rupture de l'enveloppe nucléaire (stade GVBD) se fait beaucoup plus tard, après le stade VG.

Chez le Xenope, la migration débute après un certain temps de latence (2 à 4 heures) et la rupture de la vésicule germinative se fait en cours de migration, par conséquent le stade VG observé chez le Pleurodèle n'existe pas.

Planche II : Premiers stades de la maturation de l'ovocyte de Pleurodèle.

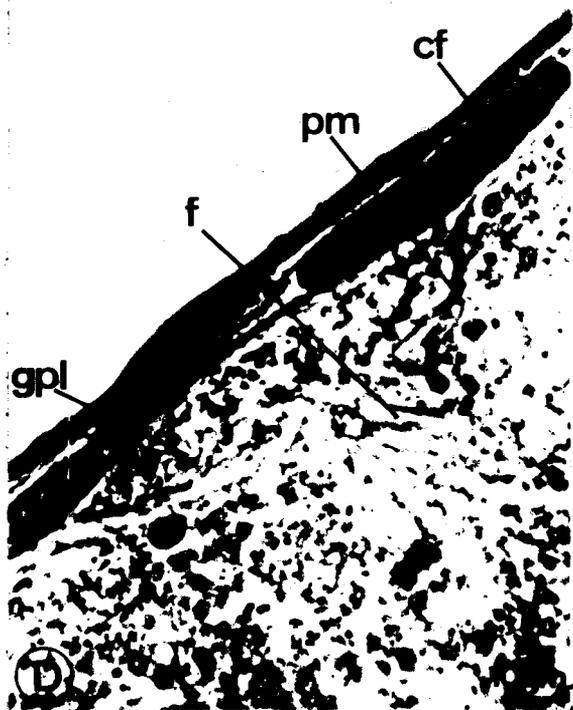
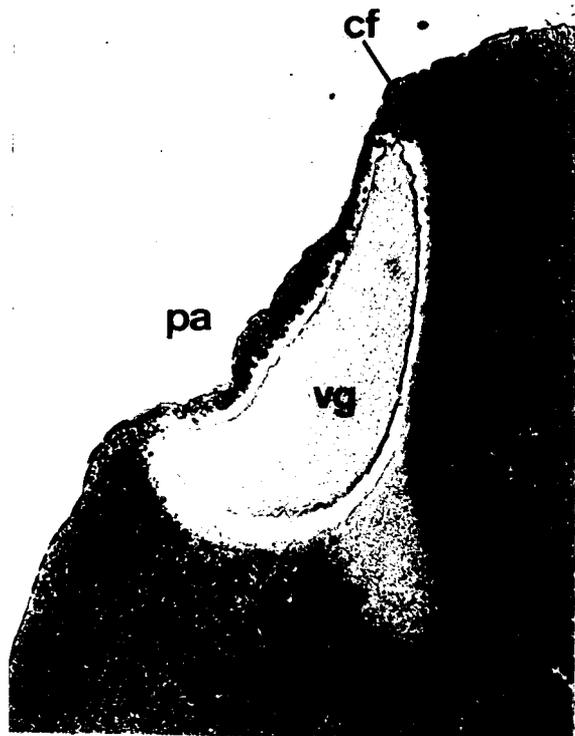
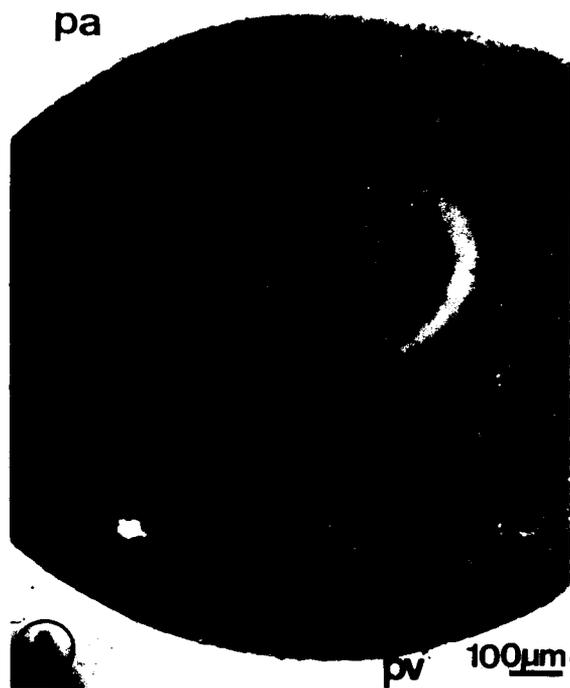
Figure A : Ovocyte témoin n'ayant subi aucun traitement hormonal. (X 70).

Figure B : Ovocyte soumis à la progestérone ; la vésicule germinative (vg) migre vers le pôle animal (pa), vi : vitellus. (X 70).

Figure C : En migrant la vésicule germinative (vg), avant la rupture de son enveloppe, laisse derrière elle une traînée de cytoplasme dépourvu de vitellus (flèche) ; cf : cellules folliculaires. (X 300).

Figure D : Première division de maturation qui donne naissance au premier globule polaire (gpl). cf : cellules folliculaires, f : fuseau de division, pm : plasmalemme. (X 750).





BUS
LILLE

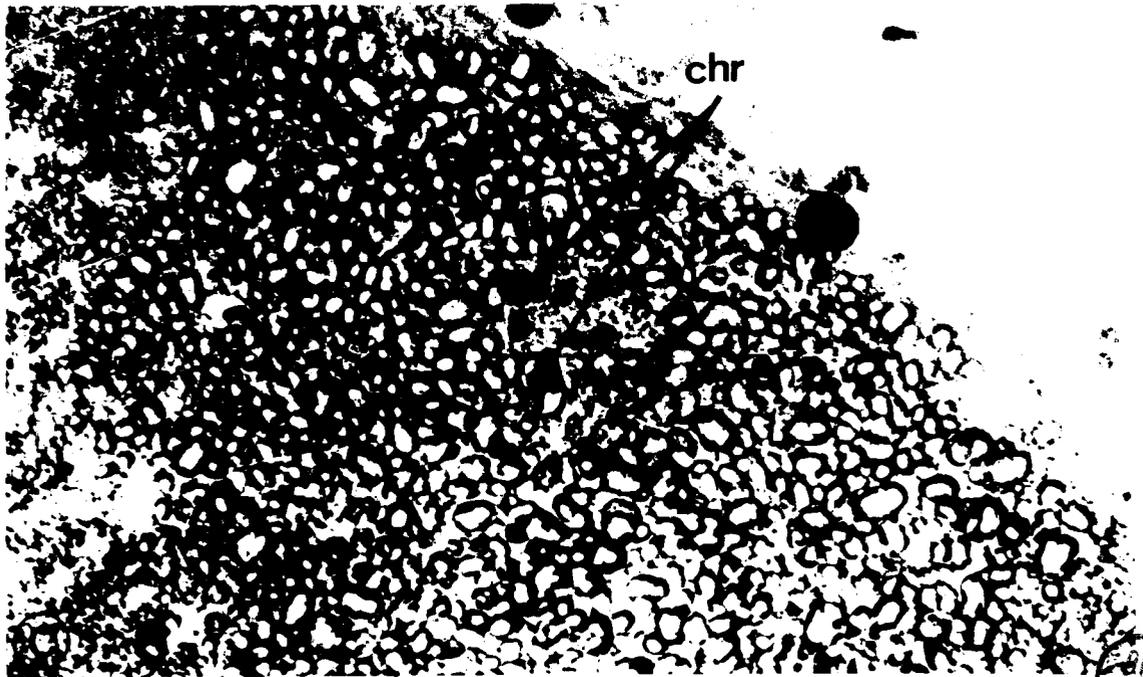
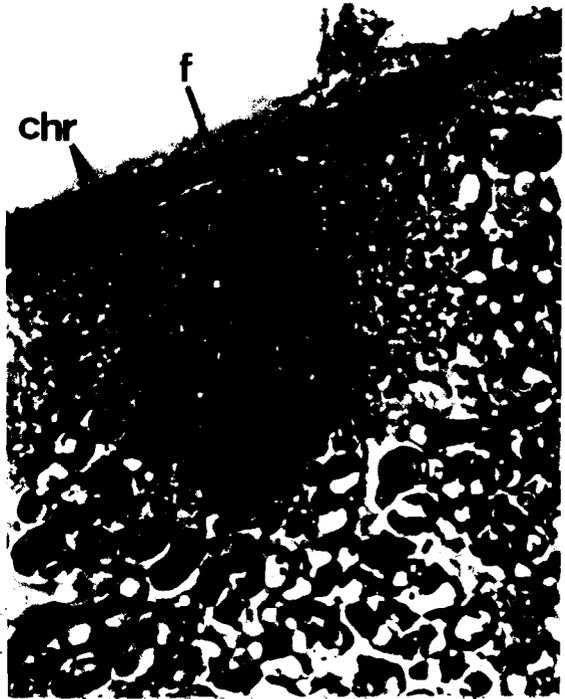
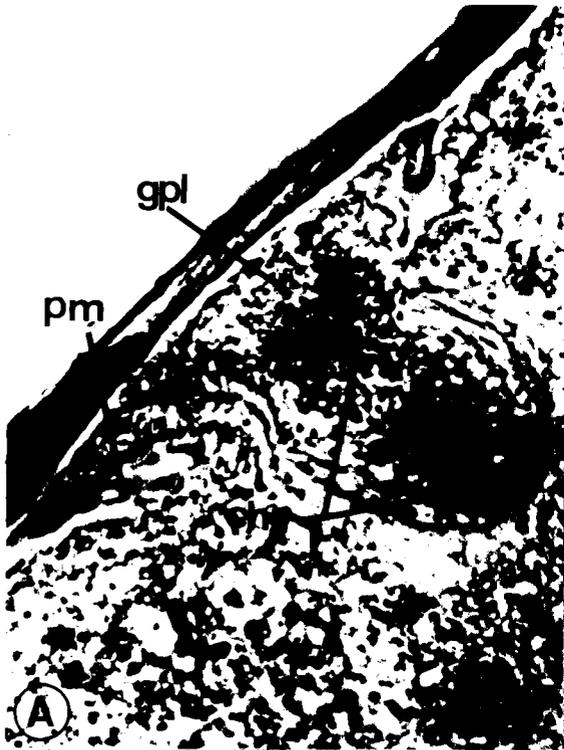
Planche III : Derniers stades de la maturation de l'ovocyte de Pleurodèle.

Figure A : Vue longitudinale de la télophase de la 1ère division méiotique. Formation du 1er globule polaire (gpl). Apparition des chromosomes (chr). (X 750).

Figure B : Vue longitudinale de la métaphase de la 2ème division. Les chromosomes (chr) sont bien individualisés. L'une des pointes du fuseau (f) vient affleurer la surface membranaire. (X 750).

Figure C : Vue polaire de la métaphase II. (X 750).





5115
L1111

B - Observations cytochimiques de la maturation.

1 - Pleurodèle

a) Ovocytes en fin de croissance.

- Réaction à l'acide périodique-schiff.

Dans les ovocytes de Pleurodèle en fin de croissance, la région nucléaire est caractérisée par la présence de substances PAS positives qui sont condensées, en grande partie dans la région basale, en forme de croissant (Pl. IV, figs A et B). Des substances de même nature sont dispersées dans le cytoplasme en particulier celui de l'hémisphère animal.

- Digestion enzymatique :

La digestion enzymatique à l'amylase pratiquée avant l'oxydation périodique, empêche la coloration de ces substances par le réactif de Schiff. Ces substances de nature glucidique sont donc digérées par l'amylase salivaire (Pl. IV, fig. C).

- Réaction à l'acide périodique-dimédon-Schiff (PAS-dimédon).

La pratique de cette technique montre que les substances PAS positives sont aussi PAS dimédon positives (Pl. IV, fig. D).

- Carmin de Best :

Le traitement des coupes par le carmin de Best, révèle la présence, dans la région nucléaire et dans le cytoplasme environnant, de substances qui se colorent en rouge carmin.

Ces réactions, à savoir le PAS-dimédon, le carmin de Best et le traitement par l'amylase donnent des résultats concordants. L'identification de ce matériel comme étant du glycogène a été établie à la suite de ces techniques de mise en évidence spécifique.

Dans l'ovocyte en fin de croissance, la répartition des particules de glycogène se présente sous deux formes différentes ; une partie est condensée dans la région basale de la vésicule germinative, en forme de croissant, l'autre partie est dispersée dans le reste du cytoplasme en particulier dans l'hémisphère animal.

Planche IV : Coupes d'ovocytes de Pleurodèle au terme de leur accroissement et au cours de leur évolution méiotique. Visualisation du glycogène par des techniques spécifiques de mise en évidence du glycogène en microscopie photonique.

Figure A et B : Ovocyte témoin. Les substances P.A.S. positives sont condensées en majeure partie dans la région périnucléaire (flèche).

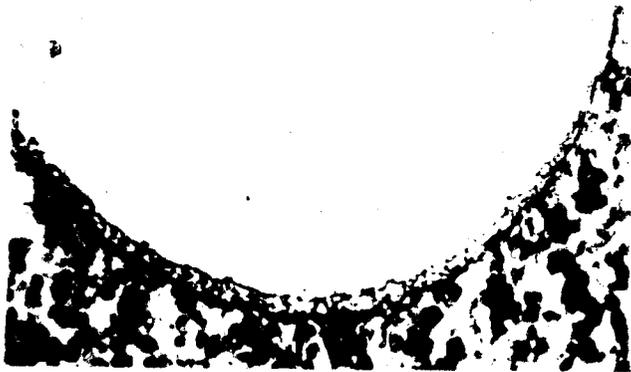
Figure A : (X 125).

Figure B : (X 350).

Figure C : Coupe au niveau de la zone périnucléaire d'un ovocyte témoin, traitée par l'amylase. La digestion enzymatique pratiquée avant la réaction P.A.S. empêche la coloration des substances par le réactif de Schiff. (X 310).

Figure D : Réaction P.A.S.-dimédon pratiquée sur coupe d'ovocyte témoin. La partie basale du cytoplasme périnucléaire contient des substances P.A.S.-dimédon positives : glycogène (flèche). (X 310).

Figure E : Réaction P.A.S.-dimédon pratiquée sur une coupe d'ovocyte après 8 heures d'incubation hormonale. Le glycogène (flèche) migre vers la surface du pôle animal. (X 125).



805
LALL

b) Ovocytes en cours de maturation.

- Réaction PAS-dimédon :

L'examen des coupes histologiques des ovocytes à différentes heures d'incubation hormonale, traités par les mêmes réactifs que précédemment et, en particulier par la réaction PAS-dimédon, montre la présence du glycogène dans la zone périnucléaire. Cette réaction donne une coloration particulièrement intense dans la région entourant le noyau encore intact des ovocytes en cours de méiose. La région du cytoplasme qui se trouve entre la vésicule germinative et le pôle animal montre une coloration plus importante que le cytoplasme de l'hémisphère végétatif (Pl. IV, fig. E).

Les granules de glycogène situés au départ dans l'hémisphère animal, subissent un mouvement d'ascension vers la surface du pôle animal (Pl. IV, fig. F) alors que les particules situées à proximité de l'enveloppe nucléaire accompagnent le noyau dans sa migration vers la surface ovocytaire au pôle animal.

c) Ovocytes à la fin de la maturation.

- Réaction PAS-dimédon :

Les observations faites sur les coupes histologiques effectuées à ce stade montre que la réaction PAS-dimédon est forte à l'extérieur du plasmalemme (Pl. V, fig. A). Ces particules sont digérées par l'amylase (Pl. V, fig. B).

Dès le début de la rupture de l'enveloppe nucléaire, un phénomène particulier se produit chez le Pleurodèle, le glycogène cytoplasmique et périnucléaire est expulsé à l'extérieur entre l'ovocyte et les cellules folliculaires qui se détachent à ce moment (Pl. V, fig. A).

- Carmin de Best.

La figure C de la planche V montre la coupe d'un ovocyte soumis pendant 12 heures à la progestérone et colorée par la technique du carmin de Best. Le résultat obtenu dans ce cas, est le même que celui obtenu avec la réaction PAS-dimédon, c'est à dire que les granules de glycogène colorés en rouge carmin sont observés à l'extérieur du plasmalemme. L'importance des paquets de granules varie suivant l'endroit. Au pôle animal, l'espace entre l'ovocyte et les cellules folliculaires est rempli de granules de glycogène, la quantité de particules est beaucoup moins importante au pôle végétatif (Pl. V, fig. D).

Planche V : Coupes d'ovocytes de Pleurodèle après la rupture de l'enveloppe de la vésicule germinative.

Figure A : Réaction P.A.S.-dimédon. Le glycogène (flèche) est expulsé du cytoplasme cortical entre l'ovocyte et les cellules folliculaires. (coupe au niveau du pôle animal). (X 320).

Figure B : Digestion enzymatique par l'amylase du glycogène expulsé par l'ovocyte (pôle animal). (X 125).

Figures C et D : Coupes traitées par le carmin de Best. La quantité de glycogène expulsé (flèche) par l'ovocyte est plus importante au pôle animal (fig. C) qu'au pôle végétatif (fig. D).

Figure C : (X 125)

Figure D : (X 125)





1962
JUL 10

Les techniques cytochimiques de mise en évidence du glycogène en microscopie photonique nous ont permis de suivre l'évolution de ces inclusions cytoplasmiques au cours de la maturation.

Dans l'ovocyte en fin de croissance, le glycogène est essentiellement condensé dans la région basale de la vésicule germinative. Une partie des particules est dispersée dans le cytoplasme environnant, en particulier au pôle animal.

Au cours du déclenchement de la méiose, le cytoplasme du pôle animal est envahi progressivement par les granules de glycogène qui migrent vers la surface en même temps que la vésicule germinative.

Ces granules rassemblés en grande partie au pôle animal sont ensuite expulsés à l'extérieur de l'ovocyte. Les coupes d'ovocytes, incubés en progestérone pendant 12 heures et plus, montrent nettement la présence de particules de glycogène à l'extérieur du plasmalemme.

2 - Axolotl.

La réaction PAS-dimédon montre l'existence de granules de glycogène dans la région basale de la vésicule germinative de l'ovocyte d'Axolotl en fin de croissance. Ces particules constituent une plage en forme de croissant (Pl. VI, fig. A).

Au cours de la méiose, on observe le même phénomène que chez le Pleurodèle, les particules de glycogène migrent en même temps que la vésicule germinative vers la surface du pôle animal.

Au moment de la rupture de la vésicule germinative, les techniques cytochimiques en microscopie photonique, ne révèlent aucune expulsion apparente du glycogène à l'extérieur de l'ovocyte (Pl. VI, fig. B).

3 - Comparaison avec le Xenope.

Les observations faites sur les coupes d'ovocytes de Xenope en fin de croissance traités par le PAS-dimédon, permettent de voir que les granules de glycogène sont répartis dans toute la région périnucléaire (Pl. VI, fig. C).

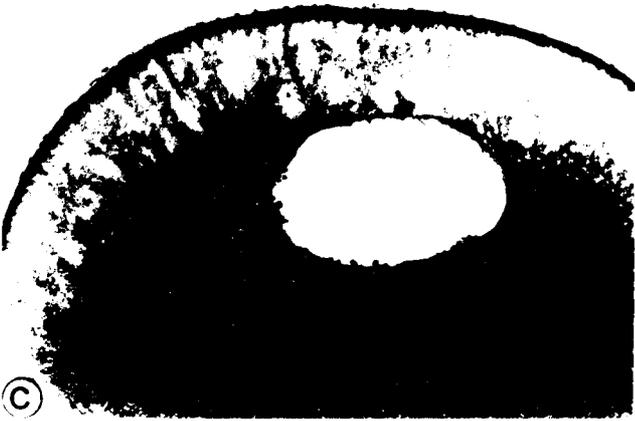
Planche VI : Réaction P.A.S.-dimédon pratiquée sur des ovocytes au terme de leur accroissement et des ovocytes en fin d'évolution méiotique d'Axolotl et de Xenope :

Figure A : Ovocyte en fin de croissance d'Axolotl. Le glycogène est condensé en forme de croissant à la partie basale de la vésicule germinative (flèche). (X 320).

Figure B : Ovocyte après la rupture de l'enveloppe nucléaire (pôle animal). Le glycogène a migré vers le cytoplasme cortical (flèche). (X 125).

Figure C : Ovocyte en fin d'accroissement de Xenope. Le glycogène est dispersé dans tout le cytoplasme périnucléaire (flèches). (X 90).

Figure D : Coupe d'ovocyte de Xenope après l'apparition de la tache de maturation (6 heures d'incubation hormonale) au pôle animal. La migration du glycogène (flèche) est très faible, il n'atteint pas le cytoplasme cortical. (X 90).



DHS
1911

Lorsque les ovocytes sont incubés en présence de progestérone, nous avons constaté que la migration de la vésicule germinative ainsi que celle du glycogène ne se produisent qu'après un temps de latence de l'ordre de 2 à 4 heures.

Sur les coupes fixées après l'apparition de la tache de maturation, et traitées par le PAS dimédon, il n'existe pas la moindre trace de glycogène à l'extérieur des ovocytes (Pl. VI, fig. D). Contrairement à ce qui se passe chez le Pleurodèle, la migration du glycogène est beaucoup moins spectaculaire, les particules occupent encore à ce stade une zone assez profonde dans l'hémisphère animal (Pl. VI, fig. D), et n'atteignent pas le cytoplasme périphérique comme c'est le cas chez l'Axolotl.

III. - ULTRASTRUCTURE DE L'OVOCYTE EN FIN DE CROISSANCE ET PENDANT LA MATURATION.

A - Ultrastructure de l'ovocyte en fin de croissance.

1 - Pleurodèle.

a) Enveloppes ovocytaires :

L'examen de coupes ultrafines d'ovocytes en fin d'accroissement permet d'observer 4 strates folliculeuses (Pl. VII et Pl. IX, fig. A) comparables à celles décrites par WARTENBERG et SCHMIDT en 1961, dans les oeufs de *Rana temporaria*. A la périphérie de l'ovocyte, nous reconnaissons de l'extérieur vers l'intérieur : le feuillet péritonéal, la strate conjonctive à fibrilles de collagène, les cellules folliculaires proprement dites et l'enveloppe vitelline.

L'enveloppe vitelline est traversée par deux types de prolongements, en sens contraire, les microvillosités de l'ovocyte et les macrovillosités des cellules folliculaires (Pl. VII, VIII), ainsi la membrane plasmique de l'ovocyte est ornée de très nombreuses microvillosités qui s'étendent à travers une partie de l'enveloppe vitelline. Elles sont constituées d'une substance dense analogue à celle du cytoplasme cortical (Pl. VIII, fig. A) où l'on peut distinguer des microtubules et des faisceaux fins parallèles au grand axe des microvillosités.

Les macrovillosités beaucoup moins abondantes, sont les prolongements des cellules folliculaires à la base desquelles elles prennent naissance (Pl. VII), elles traversent l'enveloppe vitelline et établissent des complexes jonctionnels avec la membrane plasmique (Pl. VII ; Pl. VIII B et C).

Ces jonctions entre les cellules folliculaires et l'ovocyte ont été pendant longtemps considérées comme des desmosomes chez les Amphibiens (WARTENBERG, 1962 ; HOPE et coll., 1963) et chez les mammifères (FRANCHI, 1960 ; ADAMS et HERTIG, 1964).

Des travaux récents ont montré l'existence de jonctions gap entre les cellules de la granulosa et l'ovocyte (ALBERTINI et ANDERSON, 1974). BROWNE et al. (1979) chez le Xenope, ont mis en évidence que les complexes jonctionnels entre les cellules folliculaires et l'ovocyte sont de type gap et qu'ils peuvent être régulés par l'action des hormones gonadotropes. Les travaux de VILAIN et coll. (1980) ont précisé qu'il s'agit de jonctions de faible résistance électrique chez le Pleurodèle et que la rupture de ces liaisons est à l'origine d'un stimulus positif, ressenti au niveau même de la membrane plasmique ovocytaire.

Dans le but de mettre en évidence l'évolution morphologique de ces jonctions au cours de la maturation, nous avons tenté une expérience de cryofracture des follicules entiers (Pl. XXI). Malgré le nombre de fractures effectuées, nous n'avons pas eu la chance d'observer de fracture au niveau jonctionnel. Etant donné l'importance des relations cellules folliculaires-ovocyte, il serait intéressant et nécessaire de continuer ce travail par la suite.

Par contre, des fractures du matériel au niveau basal des cellules folliculaires, nous permettent d'observer les zones d'émergence des macrovillosités à la base des cellules folliculaires (Pl. XXI, fig. E).

b) Cytoplasme cortical

Dans cette étude, nous avons limité nos observations au "cytoplasme cortical" ou cytoplasme périphérique de l'hémisphère animal. Il correspond à la couche cytoplasmique riche en mélanosomes, sous-jacente au plasmalemma jusqu'à la limite d'apparition des granules de vitellus.

Cette partie du cytoplasme de l'ovocyte renferme différents constituants cellulaires à savoir, de nombreuses mitochondries, des granules de mélanosomes, des dictyosomes, des vésicules de petite taille (Pl. IX, fig. A).

Le caractère le plus marquant du cytoplasme cortical est sa remarquable densité de texture. Il est constitué d'une substance fibreuse occupée par des granules de glycogène dispersés entre les organites. Il est caractérisé par la rareté des plaquettes vitellines et des vésicules lipidiques, plus abondantes dans le cytoplasme sous-jacent (Pl. VII).

Ce cytoplasme périphérique contient aussi des plages de lamelles annelées (Pl. IX, fig. A) qui ressemblent à des copies de l'enveloppe nucléaire dont elles dérivent (KESSEL ; 1963 a, b). Cet empilement de lamelles annelées peut être considérable comme le montre la figure B de la planche IX. Ces plages sont constituées par des amas de saccules allongés, à matrice claire ; les membranes limitant ces saccules présentent des anneaux caractéristiques ou pores annulaires.

En plus de tous ces organites et inclusions cytoplasmiques, le cytoplasme cortical contient des granules sphériques et denses aux électrons dont la taille varie entre 0,4 et 0,6 μm . De tels granules ont été signalés dans l'oeuf d' *Ambystoma mexicanum* par BLUEMINK (1970), qui les a décrits sous le terme de "so-called cortical granules".

c) Cytoplasme périnucléaire.

D'une façon générale, dans les ovocytes examinés, la bande de cytoplasme située du côté basal de la vésicule germinative contient une abondante quantité de granules (Pl. X, fig. B). L'enveloppe nucléaire fortement repliée à la base, s'insinue dans les amas de granules qui l'entourent. Ces granules sont de même nature que ceux disséminés dans le cytoplasme cortical (Pl. X, fig. A).

Grâce à la technique de THIERRY (1967), effectuée sur des coupes d'ovocytes incubés en présence de progestérone pendant 3 heures (Pl. XII) nous avons pu identifier la nature chimique de ces particules comme étant du glycogène β , conformément à leur morphologie (DROCHMANS, 1962).

Les granules de glycogène β sont dispersés dans le cytoplasme de l'hémisphère animal (Pl. X, fig. A), tandis que dans le cytoplasme périnucléaire, ces particules se présentent sous forme d'amas concentrés à la base de la vésicule germinative (Pl. X, fig. B).

Ces observations confirment et précisent au niveau ultrastructural, nos résultats obtenus avec les techniques cytochimiques en microscopie photonique (Pl. IV, figs A, B et D).

2 - Axolotl.

La nature des strates folliculeuses qui entourent l'ovocyte d'Axolotl en fin de croissance est comparable à celle du Pleurodèle. Des cloisons fibrillaires déterminent dans l'enveloppe vitelline une structure alvéolaire en nids d'abeille (Pl. XXII, fig. A). Cette structure est intermédiaire entre celle de l'enveloppe vitelline du Pleurodèle sans texture apparente et celle du Xenope qui paraît plus lâche (Pl. XXIV, fig. B).

La membrane plasmique de l'ovocyte est tapissée de nombreuses microvillosités plus développées et plus fines que celles du Pleurodèle (Pl. XXII, fig. A).

Le cytoplasme périphérique de l'ovocyte est constitué de deux couches de textures différentes : immédiatement sous la membrane plasmique, se trouve une première couche homogène et dense constituée par un enchevêtrement de fines fibrilles (Pl. XXII, fig. A), cette couche que nous qualifions de feutrage cortical s'étend sur une distance de 0,6 à 2 μm . Le cytoplasme sous-jacent qui constitue la deuxième partie présente une texture distendue beaucoup moins dense (Pl. XXII, fig. A). Cette deuxième couche représente la majeure partie du cytoplasme cortical.

Des granules de glycogène β beaucoup moins abondants que chez *Pleurodeles waltlii* sont dispersés aussi bien dans le feutrage cortical que dans le cytoplasme sous-jacent (Pl. XXII, fig. A).

Dans le cortex de l'ovocyte d'Axolotl en fin de croissance, on remarque la présence de granules denses comparables à ceux décrits par BLUEMINK (1970) sous le terme de "so-called-cortical granules".

3 - Comparaison avec le Xenope.

Chez le Xenope, la structure de l'enveloppe vitelline apparaît totalement différente de celle des deux espèces d'urodèles (Pl. XXIV, fig. 1). Elle présente une texture plus lâche formée de fibres groupées ensemble, denses aux électrons.

L'ultrastructure de l'ovocyte de *Xenopus laevis* en fin d'accroissement se distingue de celle des deux espèces précédentes par la présence

d'une rangée de granules corticaux sous-jacente à la membrane plasmique (Pl. XXIV, fig. A). Le cytoplasme cortical est constitué en majeure partie par des granules de glycogène β dispersés d'une façon homogène dans la substance fibrillaire occupant l'espace entre les différents constituants cytoplasmiques (Pl. XXIV, fig. A). La zone corticale contient également des empilements de lamelles annelées. Toutefois, des plages de lamelles sont aussi observées dans la région périnucléaire et au contact de l'enveloppe de la vésicule germinative (Pl. XXV, fig. A).

Dans la région périnucléaire, le glycogène ne présente pas une localisation préférentielle. Des amas de granules de glycogène β sont observés aussi bien dans la partie basale que dans tout le reste du cytoplasme entourant la vésicule germinative.

B - Modifications ultrastructurales au cours de la maturation.

1 - Pleurodèle.

a) Cytoplasme cortical.

L'étude des coupes d'ovocytes traités à la progestérone pendant une durée allant de 2 à 10 heures, nous permet de décrire l'évolution des inclusions cytoplasmiques au cours de la maturation.

Le système de microvillosités tapissant le plasmalemme, régresse progressivement au cours de cette période (comparez la planche VII et la figure A de la planche XI avec la figure B de la planche XVI). Le nombre des macrovillosités diminue, mais certaines d'entre elles forment toujours des jonctions avec le plasmalemme (6 heures d'incubation hormonale) (Pl. VIII, fig. D).

Les mitochondries augmentent en nombre dans le cytoplasme cortical. Une augmentation similaire a été observée par NORREVANG (1965) sur les ovocytes de *Priapulid* et par WISCHNITZER (1966) sur des ovocytes d'Amphibiens Anoures. Le mécanisme de multiplication des mitochondries peut s'expliquer de deux façons différentes : soit qu'il résulte d'une migration des mitochondries préexistantes dans le cytoplasme périnucléaire vers le cytoplasme cortical (WISCHNITZER, 1966), soit d'une division des mitochondries préexistantes dans le cytoplasme cortical. Les mélanosomes ne paraissent subir aucun remaniement morphologique important au cours de la maturation. Les granules

denses décrits dans les ovocytes en fin de croissance sont toujours présents (Pl. XVI, fig. B), quelques uns migrent vers la surface de l'ovocyte et viennent se mettre au contact de la membrane plasmique (Pl. XVI, fig. C).

Lors de la reprise de la méiose, les remaniements les plus importants concernent trois constituants cytoplasmiques :

* L'évolution des lamelles annelées.

* L'élaboration de vésicules.

* La répartition et la migration des granules de glycogène au pôle animal, constituent un phénomène cytologique important qui seront envisagées en détail.

α) Les lamelles annelées.

Leur présence a été observée d'une façon constante dans les ovocytes en cours de maturation (Pl. XVII). Ces éléments sont situés aussi bien dans le cytoplasme cortical (Pl. XVII, fig. A) que dans le cytoplasme interne (Pl. XVII, fig. B et C). Pendant le déroulement de la méiose, nous avons remarqué un plus grand nombre de sites de lamelles annelées.

Les lamelles annelées forment des associations de plusieurs éléments, séparés par un matériel dense (Pl. XVII, fig. A). D'une façon générale le nombre de pores annulaires de ces éléments est moins important dans des ovocytes qui évoluent jusqu'à la métaphase II que dans des ovocytes témoins. Quelques pores situés, soit au centre, soit aux extrémités des lamelles, disparaissent (Pl. XVII, figs A et B) laissant ainsi des segments de saccules ininterrompus. Ceci confère un aspect gonflé aux empilements de lamelles (Pl. XVII, fig. A).

β) Les vésicules.

Ces inclusions cytoplasmiques se présentent sous l'aspect de vésicules sensiblement sphériques, optiquement vides. Ce système de vésicules est localisé dans le cytoplasme cortical (Pl. XI, fig. B) au voisinage de certains empilements de lamelles (Pl. XVII, fig. C), des vésicules de plus grande taille sont observées au voisinage des amas de glycogène (Pl. XI, fig. B ; Pl. XII, fig. B et Pl. XIV, fig. A).

γ) Le glycogène.

L'identification des nombreux granules libres ou groupés en amas dans le cytoplasme, a été effectuée à l'aide de la technique de THIERRY (1967). (Pl. XII, figs A et B).

Dans les ovocytes de Pleurodèle, le glycogène se présente sous la forme de particules sphériques de 30 à 50 μ de diamètre, sans structure interne apparente et présentant une densité aux électrons assez uniforme (FAWCETT, 1958 ; REVEL et coll., 1960).

Ces particules correspondent à la forme élémentaire β de glycogène selon la nomenclature établie par DROCHMANS en 1962.

Dès les premières heures d'incubation hormonale (2 à 3 heures) les formations de glycogène deviennent extrêmement abondantes, elles s'assemblent pour former de larges amas dans le cytoplasme cortical au pôle animal.

L'ovocyte au début de la maturation (2 à 3 heures d'incubation hormonale).

Les observations faites sur des ovocytes incubés pendant deux heures en présence de progestérone (Pl. XI) montrent que la majorité des granules de glycogène contenus dans le cytoplasme périphérique forment à ce stade des associations sous forme de plages plus ou moins compactes (Pl. XI, fig. A).

Dans la figure B de la planche XI on remarque la présence d'un groupe de particules de glycogène englobées dans une vésicule à membrane lisse ; ainsi que des vésicules semblables sans contenu interne.

A trois heures d'incubation hormonale, des coupes traitées par la technique de Thierry (1967), montrent des granules de glycogène dans l'espace périvitellin et dans les voies de passages des macrovillosités à travers l'enveloppe vitelline (Pl. XII, fig. A). Des particules de même nature sont dispersées à l'intérieur de l'ovocyte. La figure B de la planche XII montre la présence des granules de glycogène dans la partie basale des cellules folliculaires et dans les espaces intercellulaires de celles-ci.

L'ovocyte en cours de maturation.

* Entre 4 et 8 heures d'incubation hormonale :

Des groupes compacts de granules de glycogène délimités par une membrane sont observés dans l'espace périvitellin (Pl. XIII).

De nombreux granules sans limites membranaires, libres ou associés, sont dispersés des deux côtés du plasmalemme. Cependant, des particules du même type traversent l'enveloppe vitelline en direction des cellules folliculaires (Pl. XII).

Une coupe au niveau du cytoplasme cortical du pôle animal au bout de 8 heures d'incubation hormonale (Pl. XIV) permet de décrire trois types d'arrangement des particules de glycogène :

- des granules de glycogène sont groupés en petits amas au contact de vésicules vides (fig. A) ;
- des groupes de glycogène se font phagocyter par une vésicule (fig. C) ;
- des particules de glycogène déjà délimitées par une membrane sont englobées dans une vacuole (fig. B).

La planche XV illustre l'ultrastructure d'un ovocyte à 8 heures d'incubation en présence de progestérone. La figure A montre un groupe compact de granules de glycogène délimité par une double membrane, situé au contact du plasmalemme. Tandis que la figure B permet d'observer des paquets de particules de glycogène limités par une membrane dans l'espace périvitellin.

* Entre 8 et 10 heures d'incubation hormonale.

Les différentes formations de glycogène (amas délimités par une membrane, vésicules remplies de glycogène et englobées dans des vacuoles) semblent disparaître du cortex de l'ovocyte (Pl. XVI, fig. B). Néanmoins, la quantité de glycogène contenue dans le cytoplasme périphérique reste assez importante. Tandis que quelques granules seulement de glycogène sont dispersés dans l'espace périvitellin et à travers l'enveloppe vitelline (Pl. XVI, fig. B).

Description du phénomène sécrétoire du glycogène.

Dans l'ovocyte de Pleurodèle en fin de croissance, les premières particules de glycogène apparaissent dans le cytoplasme cortical en dehors de toute structure organisée (Pl. VII et Pl. X, fig. A), elles sont disséminées dans le cytoplasme cortical au pôle animal, et forment rarement de petits amas délimités par une membrane. La localisation préférentielle du glycogène est la région juxtanucléaire (Pl. X, fig. B) où il forme des petits amas qui, en coupe, constituent des plages denses autour du noyau.

Dès le début de la reprise de la méiose ovocytaire, la quantité de glycogène contenue dans le cytoplasme cortical augmente (Pl. XI et Pl. XII), ce phénomène observé au microscope électronique concorde avec la migration du glycogène au pôle animal constatée lors des observations effectuées en microscopie optique. Les granules de glycogène se groupent en amas constituant ainsi des plages denses et compactes. Dans le même temps, des vésicules sans contenu apparent commencent à envahir le cytoplasme périphérique à proximité des amas de glycogène (Pl. XI, fig. B ; Pl. XII, fig. B et Pl. XIV, fig. A). Ceux-ci sont ensuite phagocytés par les vésicules (Pl. XIV, fig. C) dans lesquelles ils se trouvent englobés en totalité. Le cytoplasme cortical contient aussi des vacuoles englobant des vésicules entières remplies de glycogène (Pl. XIV, fig. B).

En résumé, le cytoplasme cortical contient à ce stade de maturation (8 heures de progestérone) deux types de vésicules englobant les particules de glycogène : des vésicules à membrane simple et des vésicules à membrane double.

A l'extérieur du plasmalemma, dans l'espace périvitellin, nous avons trouvé :

- du glycogène sous forme de particules libres,
- du glycogène en amas compacts délimités par une membrane (Pl. XIII et Pl. XV, fig. B).

Des vésicules à membrane double remplies de glycogène viennent au contact de la membrane plasmique de l'ovocyte (Pl. XV, fig. A). La membrane externe de ces vésicules fusionne avec le plasmalemma et le contenu encore entouré de la membrane interne est libéré dans l'espace périvitellin (Pl. XIII et Pl. XV, fig. B) par un phénomène d'exocytose. Ensuite dans l'espace périvitellin, la membrane entourant le paquet de glycogène se rompt et les particules se trouvent ainsi libérées dans cet espace. Les particules libérées dans l'espace périvitellin traversent l'enveloppe vitelline en empruntant les voies de passages des macrovillosités (Pl. XII, fig. A), et atteignent ainsi les cellules folliculaires (Pl. XII, fig. B) et vont même jusqu'à s'insinuer dans les espaces intercellulaires.

La formation d'amas de glycogène ainsi que sa sécrétion n'existent pas dans les ovocytes traités à la progestérone pendant la période de repos sexuel (mai-août).

b) Cytoplasme périnucléaire.

La vésicule germinative, intacte à ce stade de la méiose (8 heures d'incubation hormonale), émet, à sa partie basale, de nombreuses invaginations à travers les masses denses de glycogène situées dans le cytoplasme périnucléaire riche en mitochondries (Pl. XVI, fig. A). Ce résultat concorde parfaitement avec celui observé en microscopie optique par la technique du PAS-dimédon.

2 - Axolotl.

L'examen des coupes ultrafines d'ovocytes d'Axolotl en cours de maturation (4 heures d'incubation en présence de progestérone) (Pl. XXIII) permet de voir les remaniements importants qui se produisent à ce stade de la méiose ovocytaire.

Le cortex de l'ovocyte au pôle animal comme le montre la figure A de la planche XXIII, devient plus dense et plus homogène que celui de l'ovocyte en fin de croissance. Les granules de glycogène constituent des plages plus ou moins compactes occupant les espaces entre les différents organites cytoplasmiques. Au voisinage de ces amas de glycogène on observe la présence de vésicules de différentes tailles et sans contenu apparent (Pl. XXIII, fig. A).

Les ovocytes d'Axolotl en cours de méiose (entre 2 et 5 heures d'incubation en présence de progestérone) offrent une image comparable à celle du Pleurodèle, en ce qui concerne l'évolution de la répartition des granules de glycogène, mais le phénomène reste beaucoup moins intense chez l'Axolotl. Les formations de glycogène deviennent extrêmement abondantes dans le cytoplasme cortical au pôle animal, ce qui est en accord avec les résultats obtenus en microscopie photonique. Elles s'assemblent pour former de larges plages dans le cytoplasme périphérique (Pl. XXIII, fig. A). Ces amas de granules de glycogène sont phagocytés par des vésicules de la même façon que chez le Pleurodèle (Pl. XXIII, fig. B).

Des groupes de granules délimités par des membranes sont observés dans l'espace périvitellin (Pl. XXIII, fig. A).

Malgré la grande condensation des particules de glycogène dans le cytoplasme périphérique au pôle animal, les granules de glycogène sous forme de particules libres ne sont pas observés dans l'espace périvitellin ni à travers l'enveloppe vitelline, il n'y a que quelques vésicules

remplies de glycogène qui sont expulsées à l'extérieur du plasmalemme. Bien que le phénomène sécrétoire semble comparable à celui du Pleurodèle, il est cependant moins spectaculaire chez l'Axolotl. Ceci explique le fait que cette expulsion ne soit pas détectable en microscopie photonique par la réaction PAS-dimédon.

3 - Comparaison avec le Xenope.

Au cours de la maturation des ovocytes de Xenope, on remarque une légère augmentation de la quantité des granules, qui est due à la migration vers la surface du pôle animal des granules déjà présents dans l'hémisphère animal, comme le mettent en évidence les observations en microscopie photonique.

Les observations réalisées sur des coupes ultrafines d'ovocytes de Xenope incubés en présence de progestérone pendant 2, 4 et 6 heures, montrent que le glycogène situé dans la région corticale est toujours sous forme de granules β dispersés dans le cytoplasme, il ne se forme jamais de groupes compacts ni de vésicules remplies de glycogène (Pl. XXIV, fig. B), bien que l'on assiste dans le même temps à l'apparition de vésicules de faible taille dans le cytoplasme cortical. La quantité de glycogène contenue dans le cytoplasme périphérique de l'ovocyte de Xenope à ce stade de la méiose est nettement inférieur à celle que l'on trouve chez les deux espèces d'urodèles.

C - Ultrastructure de l'ovocyte en fin de maturation.

1 - Pleurodèle.

a) Pôle animal.

Dans les ovocytes en fin de maturation (12 à 24 heures après le début du traitement par la progestérone), lorsque survient la rupture de l'enveloppe nucléaire, la surface ovocytaire ne présente plus de véritables microvillosités (Pl. XVIII), mais des protubérances très peu saillantes, conférant au plasmalemme de l'ovocyte un aspect ondulé. L'enveloppe vitelline subit un léger décollement par rapport à la membrane plasmique et par suite de la régression des microvillosités l'espace périvitellin devient plus important. Dans le même temps, les macrovillosités régressent, les jonctions ovocyte-cellules folliculaires disparaissent .

Le cytoplasme cortical de l'ovocyte est envahi par des masses considérables de vésicules optiquement vides dont la taille varie entre 0,5 et 1 μm (Pl. XVIII). De ce fait, tous les organites cytoplasmiques décrits aux stades antérieurs sont refoulés vers l'intérieur de l'ovocyte. Les granules de glycogène groupés en petits amas sont dispersés entre les vésicules (Pl. XVIII). Les différentes étapes du phénomène sécrétoire du glycogène observées précédemment disparaissent dès la rupture de la vésicule germinative puisqu'en effet, nous n'avons rencontré que de très rares vésicules remplies de glycogène (Pl. XIX, fig. A). Les observations effectuées sur de nombreuses coupes ultrafines illustrant l'ovocyte au moment de la rupture de la vésicule germinative, ne montrent pas de glycogène dans l'espace périvitellin ni dans l'enveloppe vitelline. Toutes les coupes réalisées à ce stade ne permettent jamais de reconnaître l'empilement caractéristique des lamelles annelées, cela laisse supposer que les lamelles annelées ont été transformées ou ont disparu.

Dans la partie profonde du cytoplasme cortical, on remarque la présence d'un deuxième type de vésicules (Pl. XIX, figs A et B). Ces vésicules de petite taille (0,03 à 0,09 μm de diamètre) sont groupées, leur morphologie rappelle celle des nids de vésicules décrits dans les oeufs de *Xenopus laevis* (BALINSKY et DEVIS, 1963 ; BALINSKI, 1966).

b) Pôle végétatif.

Des vésicules de taille variable entre 1 et 1,5 μm occupent uniformément le cytoplasme périphérique au pôle végétatif (Pl. XX, fig. A). Des granules de glycogène libres sont dispersés entre ces vésicules.

A un grossissement plus fort (Pl. XX, fig. B), il existe une différence marquée entre les vésicules du pôle végétatif et celles décrites au pôle opposé. Les premières présentent une double membrane alors que les secondes sont limitées par une simple membrane.

Au pôle végétatif les microvillosités ont considérablement régressé (Pl. XX, fig. A). Des jonctions cellules folliculaires-ovocyte sont encore présentes (Pl. XX, fig. A), ce qui paraît logique car l'enveloppe folliculaire se décolle d'abord au pôle animal.

2 - Axolotl.

A la fin de la maturation au moment de la rupture de l'enveloppe nucléaire (entre 6 et 7 heures d'incubation hormonale), les microvillosités régressent en taille et en nombre (Pl. XXII, fig. B), mais leur régression est moins forte que celle qui se produit dans les ovocytes de Pleurodèle.

Des vésicules moins nombreuses et plus petites (0,3 à 0,4 μm de diamètre) envahissent le cytoplasme cortical après la rupture de la vésicule germinative (Pl. XXII, fig. B). Le glycogène sous forme de granules β libres, est dispersé entre les vésicules. A ce stade de la maturation, les lamelles annelées ont totalement disparu.

3 - Comparaison avec le Xenope.

Le cytoplasme cortical de l'ovocyte de Xenope en fin de maturation est occupé par d'abondantes vésicules de taille sensiblement identique (Pl. XXVI, figs A et B). Ces vésicules sont souvent groupées ensemble pour former de grandes plages vésiculeuses (Pl. XXVI, fig. C).

Les ovocytes de Xenope subissent une modification du relief à la fin de la maturation comparable à celle des deux espèces d'urodèles. Les microvillosités régressent ainsi que les macrovillosités (Pl. XXVI, fig. A). Les granules corticaux se déplacent vers la surface de l'ovocyte et viennent au contact du plasmalemme (Pl. XXVI, fig. A).

A la fin de la maturation, les ovocytes de Pleurodèle se caractérisent par l'existence de deux types de vésicules dans le cytoplasme cortical de l'hémisphère animal. De ce fait, on peut décrire deux parties différentes dans le cortex :

- La partie périphérique qui se trouve au contact du plasmalemme est caractérisée par la présence de vésicules de grande taille (0,5 à 1 μm de diamètre) qui occupent uniformément cette région et refoulent les organites cytoplasmiques vers l'intérieur (Pl. XVIII).

- La partie interne du cytoplasme cortical, où l'on observe la présence de groupes de vésicules de petite taille (0,03 à 0,09 μm de diamètre) (Pl. XIV, fig. A et B) et des organites cytoplasmiques tels que les mitochondries et les dictyosomes (Pl. XIX, fig. C).

Dans le cas des ovocytes de Xenope, toutes les vésicules qui envahissent le cytoplasme cortical à la fin de la maturation présentent une structure et une morphologie identiques.

CHAPITRE IV

DISCUSSION GÉNÉRALE

I. - MECANISME DE SECRETION DU GLYCOGENE.

Les résultats obtenus sur *Pleurodeles waltlii* ont comme principal intérêt d'illustrer la variabilité et la particularité des remaniements cytologiques et cytochimiques impliqués dans la réinitiation de la méiose, par rapport aux autres espèces d'Amphibiens.

Nous avons tenté de situer le début de l'accumulation du glycogène β dans le cortex du pôle animal, et du phénomène sécrétoire de ces particules en fonction des étapes successives de la maturation ; ce processus représente un événement dominant qui se produit dès les premières heures d'incubation hormonale.

Dans les ovocytes en fin d'accroissement, les particules de glycogène sont rares dans le cytoplasme cortical, mais fortement condensées dans le cytoplasme périnucléaire. Il se forme ensuite, dans la région du cytoplasme périphérique de l'ovocyte, des petits amas compacts de granules de glycogène β dès le déclenchement de la maturation. Les amas de granules sont phagocytés par des vésicules, sans contenu apparent, présentant une simple ou une double membrane. Le phénomène sécrétoire se termine par l'expulsion du glycogène à l'extérieur du plasmalemme, qui s'effectue par fusion de la membrane externe des vésicules à double membrane avec la membrane plasmique de l'ovocyte. Des groupes de particules de glycogène encore entourés de la membrane interne sont libérés dans l'espace périvitellin, cette membrane se rompt et le glycogène se trouve ainsi sous forme de particules libres.

Chez l'*Axolotl*, le mécanisme de sécrétion est moins intense et incomplet, puisque le glycogène qui se trouve dans l'espace périvitellin est toujours sous forme de groupes limités par une membrane. De ce fait, le glycogène expulsé par l'ovocyte d'*Axolotl* en cours de maturation ne représente pas une quantité assez importante pour être détecté par les techniques cytochimiques de microscopie photonique, comme c'est le cas chez le *Pleurodèle*.

Cette accumulation et cette sécrétion de glycogène jouent certainement chez ces deux espèces d'Urodèles un rôle important pour le déroulement de la maturation, bien qu'il reste difficile à préciser.

Ces observations sont à rapprocher de celles réalisées sur les oeufs de *Xenopus laevis* lors de la première segmentation. KALT (1971) a

décrit un processus de sécrétion des granules de glycogène englobés dans des vésicules à double membrane. Dans ce système sécrétoire qu'il a qualifié de processus apocrine, la membrane externe des structures sphériques à double membrane entourant les amas de granules de glycogène fusionne avec le plasmalemma. Le glycogène encore entouré par la membrane interne est libéré dans le milieu externe. Dès leur libération, ces paquets de glycogène peuvent se rompre et les particules se trouvent ainsi mélangées aux autres substances extracellulaires.

Dans le cas de la maturation des ovocytes de Pleurodèle et d'Axolotl, le glycogène est expulsé à l'extérieur du plasmalemma par un mécanisme semblable au processus apocrine décrit par KALT (1971) et RHODIN (1971).

Le même mécanisme est sans doute responsable de la présence de grandes quantités de glycogène extracellulaire trouvées lors de la segmentation des embryons de Xenope (VAN GANSEN, 1966 ; 1967 ; VAN GANSEN et SCHRAM, 1969) et des embryons de poulet. Les travaux de EYAL-GILADI et coll. (1979) sur l'embryon de poulet montrent trois types de groupements des particules de glycogène : des amas non limités, des vésicules contenant de courtes chaînes de particules et des vésicules remplies de glycogène qui sont englobées dans de plus grandes vésicules contenant un matériel flocculaire. D'après ces auteurs, il semble y avoir deux vagues de synthèse et de dégradation du glycogène. La première vague de synthèse a lieu dans l'ovocyte avant l'ovulation, elle est suivie d'une dégradation au cours de l'ovulation et pendant les premières heures de passage dans l'oviducte. La deuxième vague de synthèse commence avant la segmentation et la dégradation comme dans la première vague a lieu à l'intérieur des structures membranaires contenant le matériel flocculaire. Cette deuxième vague de dégradation dépend de la fécondation, et il est possible d'après ces auteurs qu'elle soit régulée par une information spécifique produite dans le noyau diploïde. La formation de la zone pellucide, le premier événement morphogénétique chez l'embryon de poulet, coïncide avec la deuxième vague de dégradation. Cette corrélation pourrait indiquer d'après ces auteurs que l'énergie nécessaire à la formation de la zone pellucide, qui implique une activité métabolique élevée, est fournie par la deuxième vague de dégradation du glycogène. Les travaux de ces auteurs montrent aussi qu'il existe une relation entre le métabolisme du glycogène et l'évolution de certaines structures membranaires,

dans lesquelles peuvent être localisées les enzymes impliquées dans ce processus puisque la synthèse de glycogène selon ces auteurs a lieu à l'intérieur de vésicules de différents types. Cependant, aucun schéma concernant cette relation n'a été accepté en général.

Au cours de nos observations, nous avons remarqué que les relations les plus nettes que présentent les particules de glycogène avec les éléments figurés du cytoplasme se situent au niveau des vésicules à membranes lisses.

Cette localisation du glycogène au contact des structures membranaires est comparable à celle décelée dans le muscle de rat (HEUSON-STIENNON et DROCHMANS, 1967). Les observations réalisées sur des muscles striés embryonnaires de rat ont permis à ces auteurs de localiser les particules de glycogène dès leur apparition dans le myoblaste et de suivre leur évolution jusqu'au stade de la fibre musculaire. Des associations entre particules de glycogène et membrane du réticulum sarcoplasmique ont été observées principalement aux stades des myotubes et des jeunes fibres musculaires, par la présence très fréquente de membranes lisses au sein même des masses glycogéniques et aussi sous forme de "corps glycogéniques". Ces exemples de relations entre glycogène et membranes lisses dans les cellules musculaires embryonnaires témoignent de l'importance des remaniements morphologiques et biochimiques qui se produisent dans le tissu musculaire vers la fin de la vie intra-utérine (HEUSON-STIENNON et DROCHMANS, 1967). Les mêmes observations ont été faites sur les cellules visuelles (CARASSO, 1960) et les cellules hépatiques (STADHOUEHRS, 1965 ; VRENSEN et KUYPER, 1969).

STEINERT et coll. (1974) ont montré l'existence de vacuoles remplies de glycogène dans les ovocytes de *Xenopus laevis* pendant ce qu'ils ont appelé une pseudomaturation. Celle-ci est caractérisée par la rupture de la vésicule germinative au pôle basal comme c'est le cas lors d'une vraie maturation. En outre, les chromosomes ne subissent jamais de condensation et le cytoplasme cortical subit une fragmentation. Mais ces vacuoles n'ont jamais été signalées au cours de la maturation proprement dite des ovocytes de cette espèce.

Il est intéressant de noter que des mécanismes identiques concernant le glycogène se produisent pendant les divisions cellulaires telles que la maturation des ovocytes d'Urodèles (Pleurodèle et Axolotl) d'une

part, et la segmentation des oeufs de Xenope d'autre part.

La sécrétion du glycogène pendant les premières heures de la méiose ovocytaire des Urodèles traduit l'évidence d'un changement important du métabolisme.

Lors de la reprise de la méiose, un facteur cytoplasmique actif apparaît avant la rupture de l'enveloppe nucléaire (DETLAFF et coll., 1964 ; MASUI et MARKERT, 1971 ; SCHORDERET-SLATKINE et DRURY, 1973 ; REYNHOUT et SMITH, 1974 ; WASSERMAN et MASUI, 1975 a). Ce facteur (MPF) est capable d'induire la reprise méiotique lorsqu'il est microinjecté dans un ovocyte "receveur". La maturation se déroule alors normalement jusqu'à la métaphase.

II.

Les mécanismes biochimiques, consécutifs à l'action de la progestérone et aboutissant à l'activation du MPF sont connus, mais la séquence des événements demeure incertaine. Cependant un certain nombre d'arguments expérimentaux sont en faveur d'un rôle des ions calcium de l'AMP cyclique et des protéines kinases dépendantes de l'AMP cyclique. La présence d'ions divalents extracellulaires est nécessaire pour la reprise méiotique induite par la progestérone (ECKER et SMITH, 1971 ; MERRIAM, 1971 a ; MAROT et coll., 1976). Des changements dans la distribution du calcium intracellulaire ont lieu après la stimulation hormonale (MERRIAM, 1971 b). L'injection d'EGTA bloque la maturation produite par la progestérone (MOREAU et coll., 1976).

O'CONNOR et coll. (1977) ont mesuré les échanges calciques au cours de la maturation. Leurs résultats indiquent que :

- Le flux entrant est augmenté de façon détectable 1 ou 2 heures avant la rupture de l'enveloppe nucléaire.

- Le flux sortant est augmenté 40 minutes après la stimulation. Utilisant la technique des microélectrodes sensibles aux ions et celle de l'aequorine, MOREAU et coll. (1980) ont montré que la concentration en calcium libre augmente environ 30 à 60 minutes après le traitement à la progestérone.

Il est possible d'envisager une relation entre l'augmentation du calcium intracellulaire et les changements de la répartition du glycogène

dans le cytoplasme ovocytaire qui commencent dès la première heure qui suit la stimulation hormonale. En effet, certains auteurs ont montré le rôle important du calcium dans le muscle (CLAUSEN, 1975 ; ELBRINK et BIHLER, 1975). Les travaux de BIHLER et coll. (1982) suggèrent que la stimulation du transport des hexoses est parallèle à l'augmentation du taux de calcium intracellulaire dans les erythrocytes de pigeon. Ceci est clairement illustré par l'effet stimulateur de l'ionophore A 23187 du calcium, lequel est dépendant de l'augmentation du flux de calcium ou de sa libération des sites de stockage.

Aucun argument ne permet de faire la moindre relation entre, la libération du calcium intracellulaire, la migration et l'accumulation du glycogène vers l'hémisphère animal des ovocytes de Pleurodèle, d'Axolotl et de Xenope. Cependant cette nouvelle répartition du glycogène dans la partie périphérique du cytoplasme ovocytaire au pôle animal semble témoigner d'une activité métabolique importante qui se déclenche dans le cytoplasme de l'ovocyte dès les premières heures d'incubation hormonale, disparaît avant la rupture de l'enveloppe nucléaire et au moment présumé de l'apparition du MPF chez les Urodèles, la signification de l'expulsion du glycogène devra être clarifiée.

II. - EVOLUTION DE LA SURFACE OVOCYTAIRE ET DES RELATIONS OVOCYTE -CELLULES, FOLLICULAIRES.

Dans les ovocytes de Pleurodèle traités à la progestérone, les microvillosités qui se projetaient vers les cellules folliculaires se rétractent progressivement, pour disparaître à la fin de la maturation. Les mêmes observations ont été faites sur les ovocytes de *Xenopus laevis* (VAN GANSEN, 1966) et sur les ovocytes d'Amphibiens en général (WISCHNITZER, 1966).

L'analyse ultrastructurale de la maturation des ovocytes de Pleurodèle montre que les jonctions cellules folliculaires-ovocyte semblent intactes d'un point de vue morphologique jusqu'à 6 heures après le début du traitement par la progestérone, mais rien ne permet d'affirmer si ces

jonctions gap sont encore physiologiquement fonctionnelles à ce stade. Les travaux de VILAIN et coll. (1980) assurent que ces relations subissent un découplage physiologique 80 minutes après le début du traitement par la progestérone. Les jonctions entre l'ovocyte de *Xenopus laevis* et les cellules folliculaires qui l'entourent ont été identifiées comme étant des jonctions gap (BROWNE et coll., 1979), ces auteurs ont montré que ces complexes jonctionnels sont régulés par les hormones gonadotropes.

III. - EVOLUTION DES LAMELLES ANNELEES.

Les ovocytes d'Amphibiens ont représenté un système intéressant dans le passé pour l'étude de l'origine et la morphogenèse des lamelles annelées. Ainsi des rangées de lamelles annelées se constituent dans les ovocytes pendant la période de prévitellogénèse de *Necturus maculosus* à partir de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire (KESSEL, 1963 b ; 1968 ; 1973). L'origine et la distribution des lamelles annelées dans les ovocytes de *Rana pipiens* ont été étudiées par KESSEL (1969) . Il a observé une continuité de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire avec des empilements de lamelles annelées d'une largeur variable qui s'étendent dans le cytoplasme périnucléaire. La transformation des lamelles annelées en plages vésiculeuses a été montrée par WARTENBERG et SCHMIDT (1961) qui ont décrit des "dichte cytoplasmabezirke" dans les oeufs de *Rana temporaria*. BALINSKY et DEVIS (1963) ont également décrit la transformation des lamelles "pitted membranes" en plages de vésicules dans les oeufs de *Xenopus laevis*.

Dans ce travail, nous apportons l'évidence que ces plages vésiculeuses se forment pendant la maturation dans les ovocytes de *Xenopus* traités à la progestérone.

Les travaux de KESSEL et SUBTELNY (1981) sur les ovocytes de *Rana pipiens* montrent que les lamelles annelées qui se différencient très tôt pendant l'ovogenèse tendent à devenir préférentiellement condensées dans l'axe de l'ovocyte entre la vésicule germinative et la membrane plasmique au pôle animal des ovocytes en fin de croissance (diamètre 1,7 mm). Ces auteurs ont montré que les lamelles annelées subissent une fragmentation entre 9 et 12 heures d'incubation hormonale, et qui a lieu avant la rupture

de la vésicule germinative dans les ovocytes de *Rana pipiens*.

Nos observations sur les ovocytes de *Xenopus laevis* sont comparables aux résultats obtenus par KESSEL et SUBTELNY (1981), la fragmentation des lamelles annelées en plages vésiculeuses s'effectue avant la rupture de la vésicule germinative chez le Xénope.

STEINERT et coll. (1974), dans une étude ultrastructurale des ovocytes de *Xenopus laevis* injectés de cytoplasme d'ovocytes soumis à la progestérone, ont trouvé que les lamelles annelées semblaient être remplacées par de grands groupes de citernes du réticulum endoplasmique. Les pores annulaires ont disparu dans certaines lamelles mais les vésicules à membranes lisses n'étaient pas observées dans les ovocytes de *Xenopus laevis* injectés par un extrait cytoplasmique contenant un facteur induisant la pseudomaturation (PIF) et qui subissent une maturation incomplète (STEINERT et coll., 1974).

Ainsi, la transformation des lamelles annelées en plages vésiculeuses semble être l'un des changements cytoplasmiques qui a lieu pendant la vraie maturation chez les Anoures.

Il a été observé dans les ovocytes de Triton en cours de croissance que les empilements de lamelles annelées apparaissent dans le cytoplasme aux stades précoces de la vitellogénèse, augmentent rapidement, atteignent un certain niveau dans les ovocytes en fin de croissance et augmentent à nouveau légèrement par la suite. Leur distribution dans le cytoplasme est uniforme (IMOH, 1982 ; IMOH et TERAHARA, cités par IMOH, 1982).

Contrairement aux observations faites sur les espèces Anoures (BALINSKY et DEVIS, 1963 ; KESSEL, 1968), la vésiculisation des lamelles annelées n'est pas observée chez les espèces d'Urodèles (Pleurodèle et Axolotl). Nos résultats sont comparables à ceux de IMOH (1982), cet auteur n'a pas observé de plages vésiculeuses résultant de la fragmentation des lamelles annelées dans les ovocytes de *Cynops* pendant la maturation. Des groupes de vésicules cytoplasmiques apparaissent dans la zone subcorticale de l'hémisphère animal dans les oeufs de *Cynops* juste après leur fécondation (IMOH, 1980). Pour les oeufs fécondés d'Anoures, de telles observations n'ont pas été rapportées.

Dans les ovocytes de Pleurodèle en cours de maturation (2 à 8 heures d'incubation hormonale), nous avons remarqué que les lamelles

annelées augmentent légèrement en nombre par rapport aux ovocytes témoins, cependant, elles perdent leur intégrité et disparaissent du cytoplasme du pôle animal entre 9 et 12 heures d'incubation en présence de progesté-
rone. Avant la disparition des lamelles annelées, les pores annulaires s'estompent en certains endroits, et l'on observe ainsi des segments de lamelles ininterrompus. Ces observations pouvaient conduire à la conclusion que les lamelles annelées produisent une forme vésiculaire du réticulum endoplasmique par un processus de vésiculation comme il a été montré précédemment. La disparition des lamelles annelées et l'apparition de cytoplasme vésiculé sont deux événements séparés dans le cas du Pleurodèle. Il est certain que la disparition des lamelles annelées comme inclusions cytoplasmiques distinctes n'est pas responsable de l'apparition des grandes masses de vésicules dans la partie périphérique du cytoplasme, puisqu'elles n'apparaissent qu'après la rupture de la vésicule germinative (entre 12 et 24 heures d'incubation hormonale). Par contre, la présence des petites vésicules groupées ensemble dans le cytoplasme interne peut être attribuée à la désintégration des lamelles annelées.

Les résultats obtenus sont évidemment trop fragmentaires pour proposer une interprétation cohérente du processus de vésiculation. Ces vésicules pourraient selon BLUEMINK (1970) avoir un rôle dans la régulation du calcium intracellulaire, elles constitueraient des "pièges" à ions calcium, mais cette hypothèse n'a jamais été confirmée.

L'ensemble de ces recherches fournit ainsi des données de base sur les diverses modifications morphologiques au cours de la méiose chez les Urodèles et en particulier chez le Pleurodèle. Outre l'intérêt comparatif, cette espèce présente des particularités qui pourront s'avérer utiles dans les recherches ultérieures. L'aspect qui semble le plus singulier est sans doute l'existence de ce changement dans la distribution des particules de glycogène contenues dans le cytoplasme ovocytaire. Si les phénomènes tels que la libération du calcium intracellulaire, la synthèse de protéines et la baisse de l'AMP cyclique, conduisent à l'apparition d'un facteur intracytoplasmique (MPF) responsable de la rupture de l'enveloppe nucléaire vers la fin de la maturation, le rejet du glycogène par l'ovocyte doit intervenir à un autre niveau.

L'étude ultrastructurale de la maturation ovocytaire des Urodèles était jusqu'à présent quasi-inexistante, ce travail a été entrepris afin de mieux percevoir les modifications morphologiques de la membrane plasmique avec les structures environnantes.

La régression des microvillosités en présence de progestérone tend à diminuer la surface d'échange. Ce processus va dans le même sens que les travaux de MOREAU et coll. (1976 b) qui décrivent une augmentation de la résistance électrique membranaire traduisant une chute de la perméabilité de membrane des ovocytes de *Xenopus* soumis à la progestérone. En outre, le découplage physiologique des cellules folliculaires dès la reprise de la méiose introduit un changement des propriétés de la membrane plasmique des ovocytes (VILAIN et coll., 1980). et la simple défolliculation manuelle des ovocytes entraîne la reprise de la méiose. L'ensemble de ces résultats suggère que les jonctions gap situées entre les macrovillosités des cellules folliculaires et l'ovocyte constituent sans doute le support morphologique de la régulation hormonale du couplage et du découplage physiologique des cellules folliculaires avec l'ovocyte proposée par BROWNE et coll. (1979) et VILAIN et coll. (1980). L'injection de "Lucifer yellow" selon la technique de STEWART (1981) et l'étude complémentaire en cryofracture des jonctions macrovillosités folliculaires-ovocyte pourraient apporter quelques données nouvelles concernant la régulation hormonale de ces jonctions gap.

La nouvelle répartition du glycogène ainsi que le mécanisme de sécrétion observés *in vitro* doivent être confirmés *in vivo*. Des interactions entre l'ovocyte et la paroi de l'oviducte peuvent exister par l'intermédiaire du glycogène ; il faut rappeler que la maturation prépare à la fécondation, ces interactions peuvent modifier la structure et les propriétés de l'enveloppe vitelline ; les Urodèles sont des Amphibiens polyspermiques qui ne présentent pas de granules corticaux typiques.

Planche VII : Vue d'ensemble d'un ovocyte de Pleurodèle au terme de sa croissance. Coupe réalisée au pôle animal.

L'enveloppe vitelline (ev) est traversée par les microvillosités (mv) de l'ovocyte (ov), ainsi que par les macrovillosités (ma) qui sont les prolongements cellulaires des cellules folliculaires (cf). Le cytoplasme contient des mélanosomes (ml), des plaquettes vitellines (vi), des vésicules lipidiques (l), des mitochondries concentrées en majeure partie dans la zone corticale du cytoplasme et des lamelles annelées (la). (X 8 000).



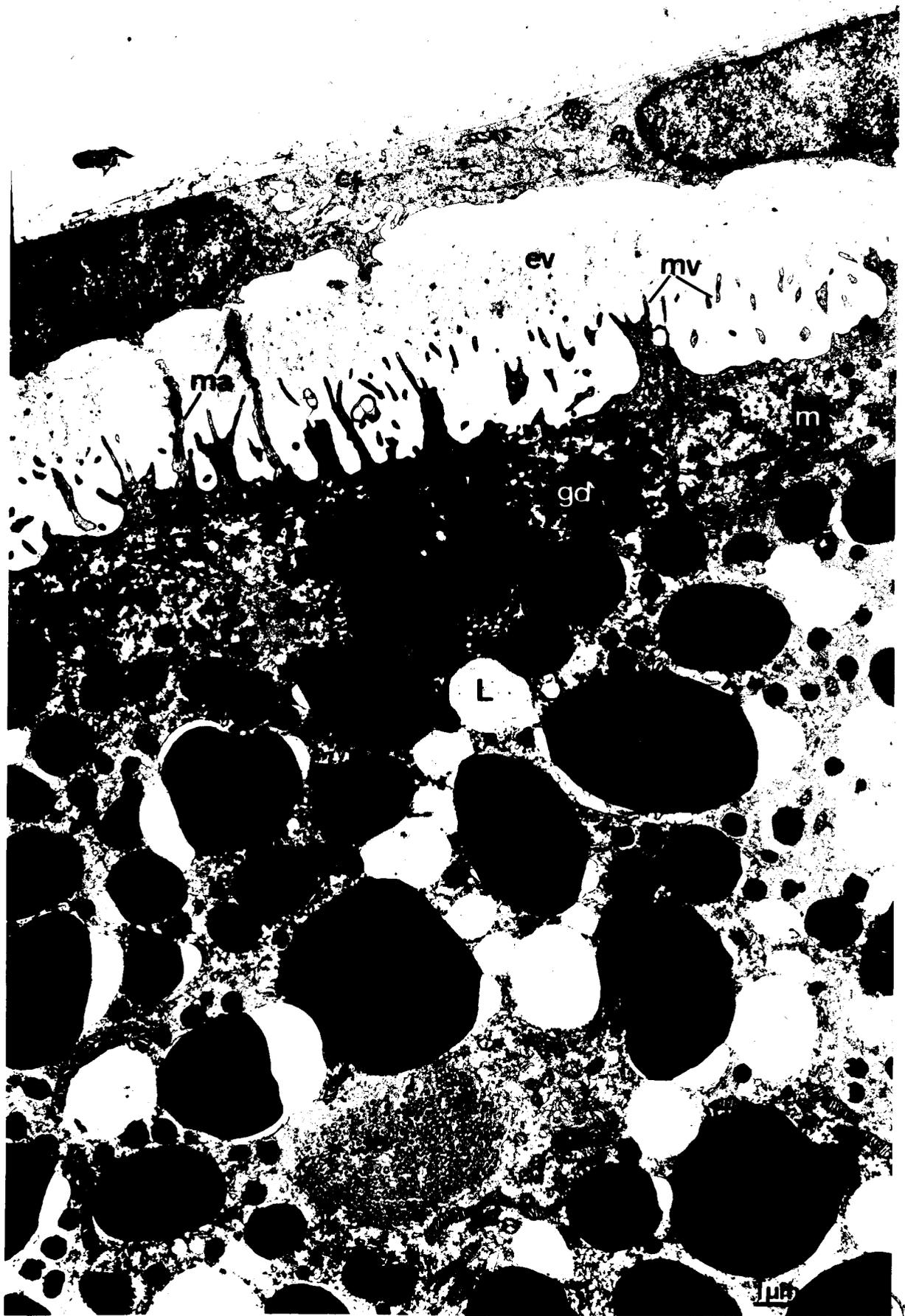


Planche VIII : Morphologie des microvillosités et des relations ovocyte-cellules folliculaires.

Figure A : Les microvillosités ovocytaires (mv) sont constituées d'une substance dense où l'on peut distinguer de fins faisceaux fibrillaires et des microtubules (mt) parallèles au grand axe de la microvillosité. (X 42 000).

Figure B et C : Ces figures illustrent des jonctions (flèches) entre l'ovocyte (ov) et les cellules folliculaires, par l'intermédiaire des macrovillosités (ma) qui viennent au contact du plasmalemme (pm). (B) X 74 000, (C) X 57 000.
Les figures A, B et C représentent des coupes d'ovocytes témoins.

Figure D : Jonction (flèches) après 6 heures d'incubation en présence de progestérone. (X 56 000).

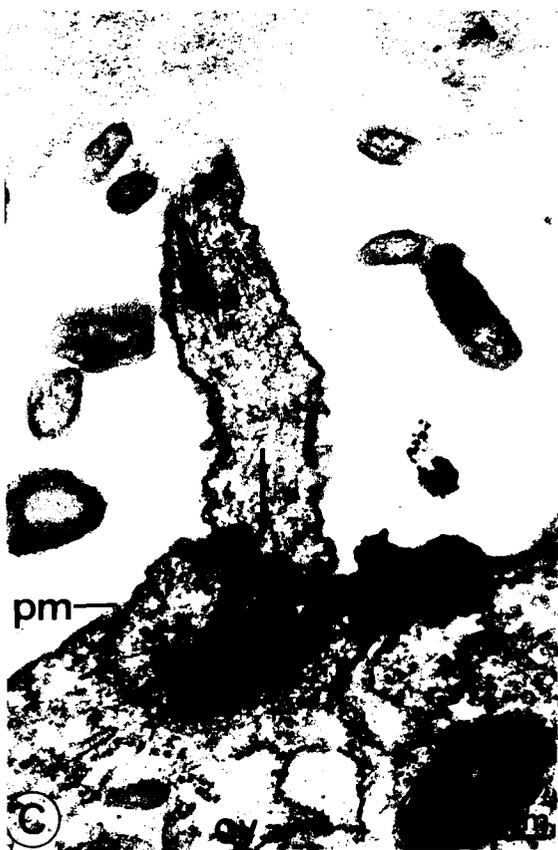
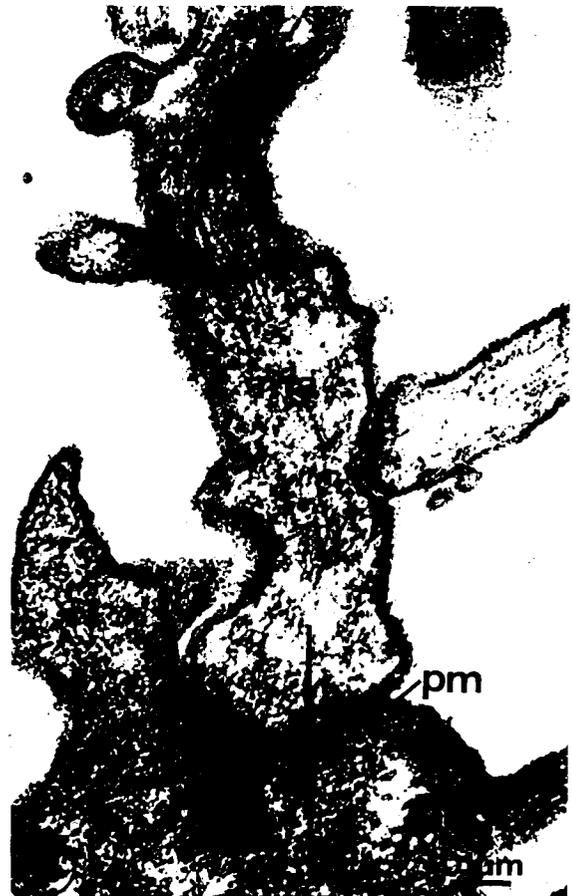


Planche IX : Coupes ultrafines de la zone corticale du pôle animal d'un ovocyte témoin de Pleurodèle.

Figure A : Quatre strates folliculeuses entourent l'ovocyte de Pleurodèle. De l'extérieur vers l'intérieur, on observe le feuillet péritonéal (fp), la strate conjonctive à fibrilles de collagène (tc) les cellules folliculaires (cf) et l'enveloppe vitelline (ev). Dans le cytoplasme cortical, on note la présence de lamelles annelées (la). (X 5 400).

Figure B : Un empilement considérable de lamelles annelées (la), dans le cytoplasme cortical (X 50 000).



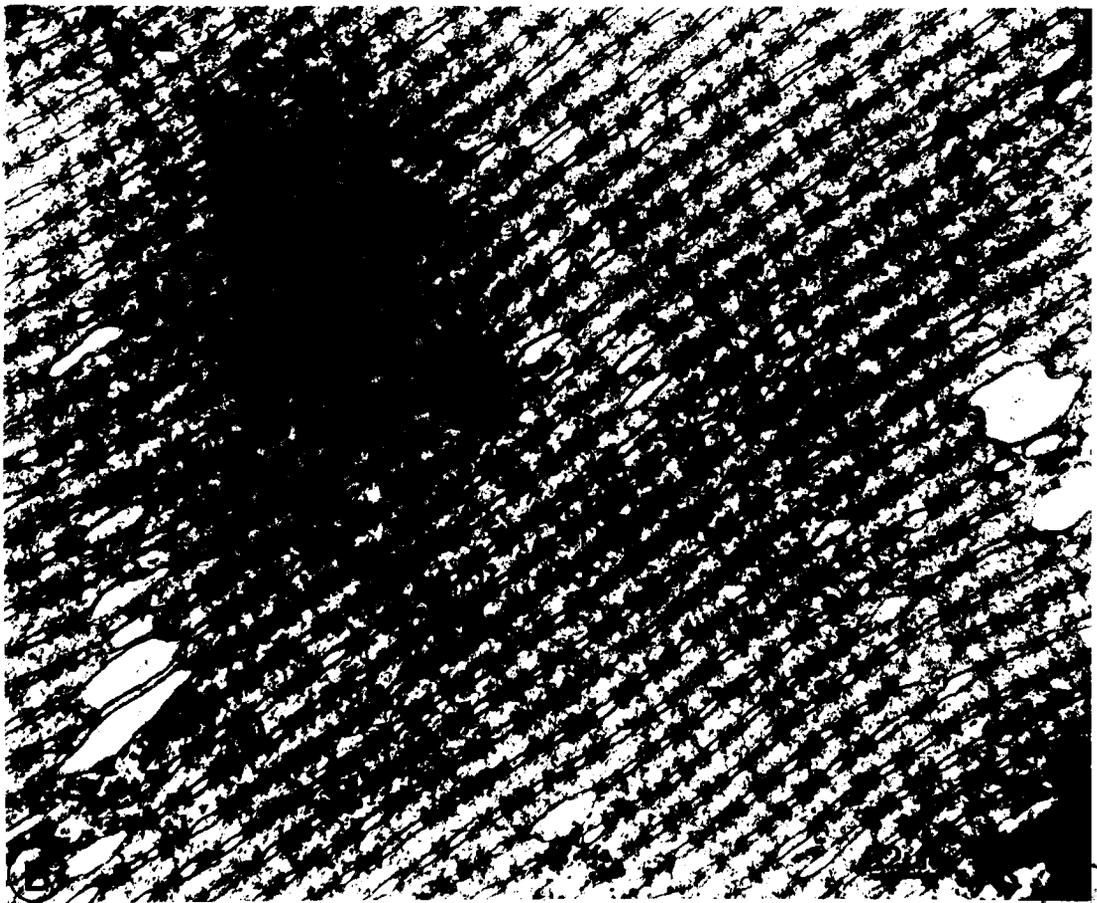
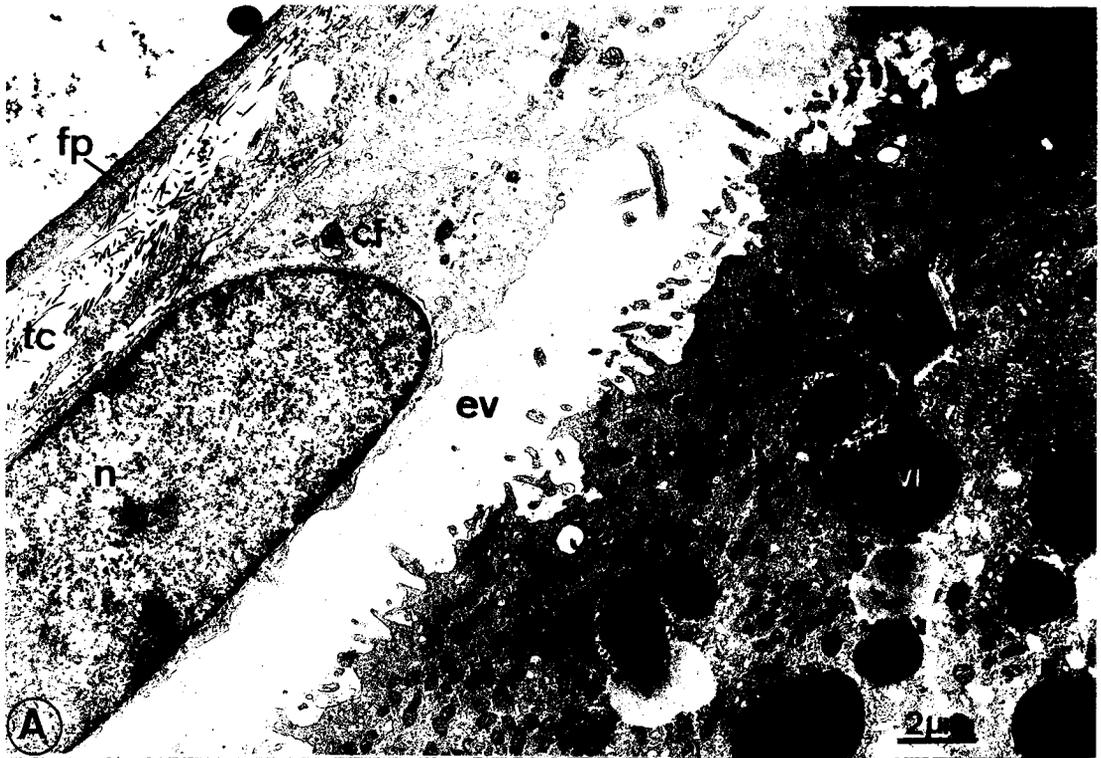


Planche X : Distribution des granules de glycogène dans l'ovocyte de Pleurodél
en fin de croissance.

Figure A : Dans le cytoplasme cortical, les granules de glycogène (gl) sont dispersés entre les organites et inclusions cytoplasmiques. (X 16 000).

Figure B : Dans la région basale du cytoplasme périnucléaire, les granules de glycogène (gl) sont groupés en amas compacts, l'enveloppe nucléaire (en) présente de nombreuses invaginations. (X 17 000).



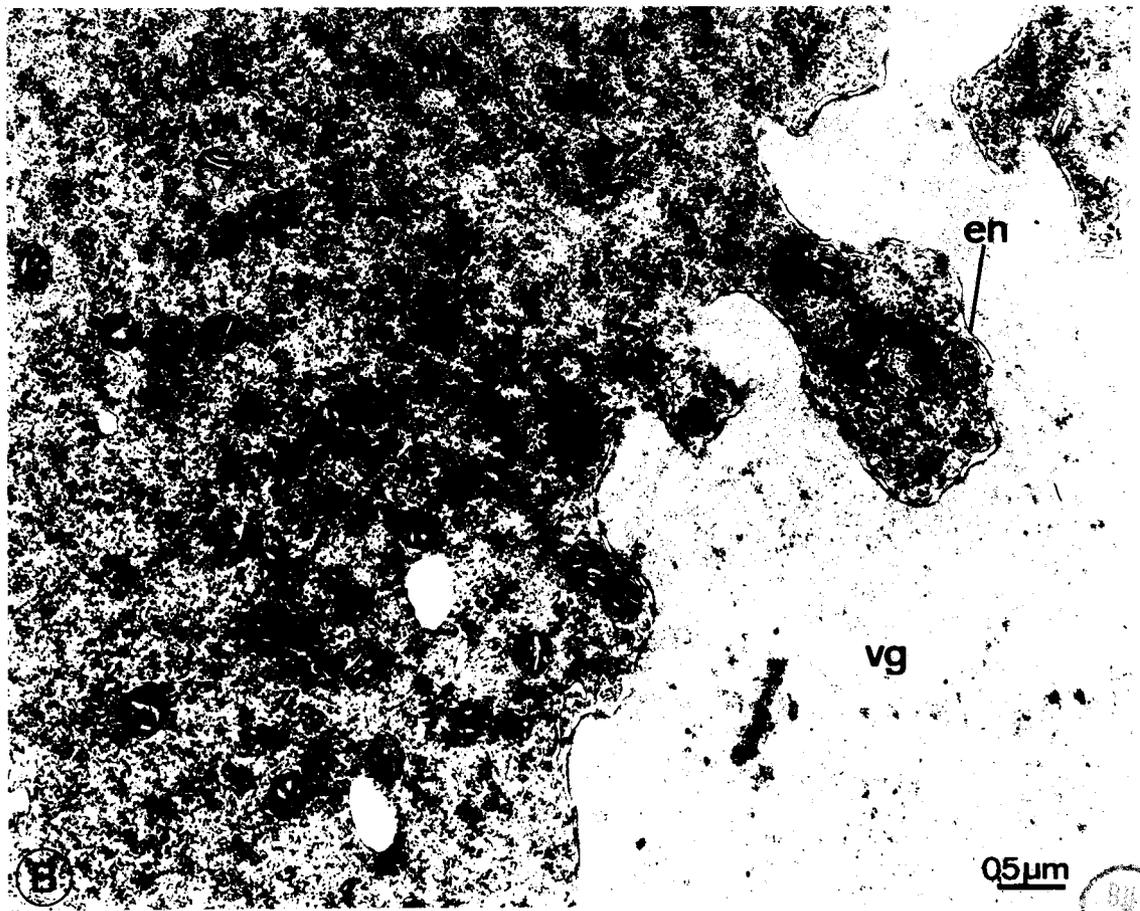
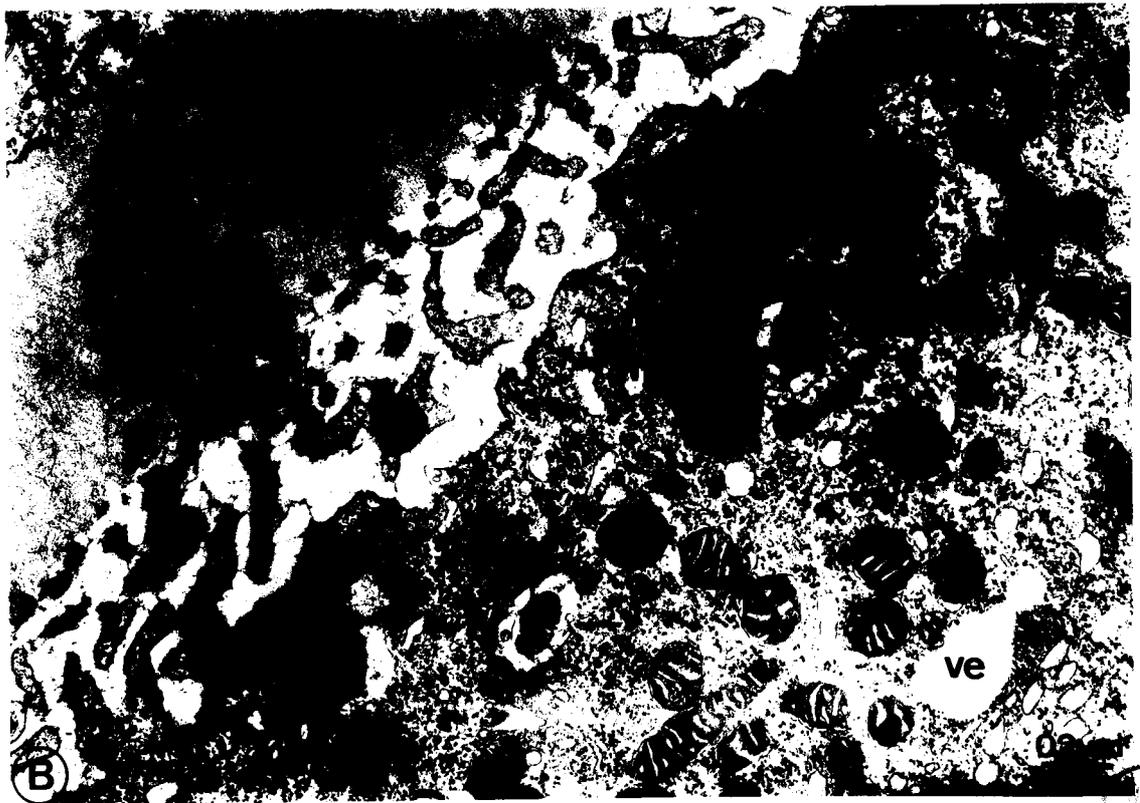
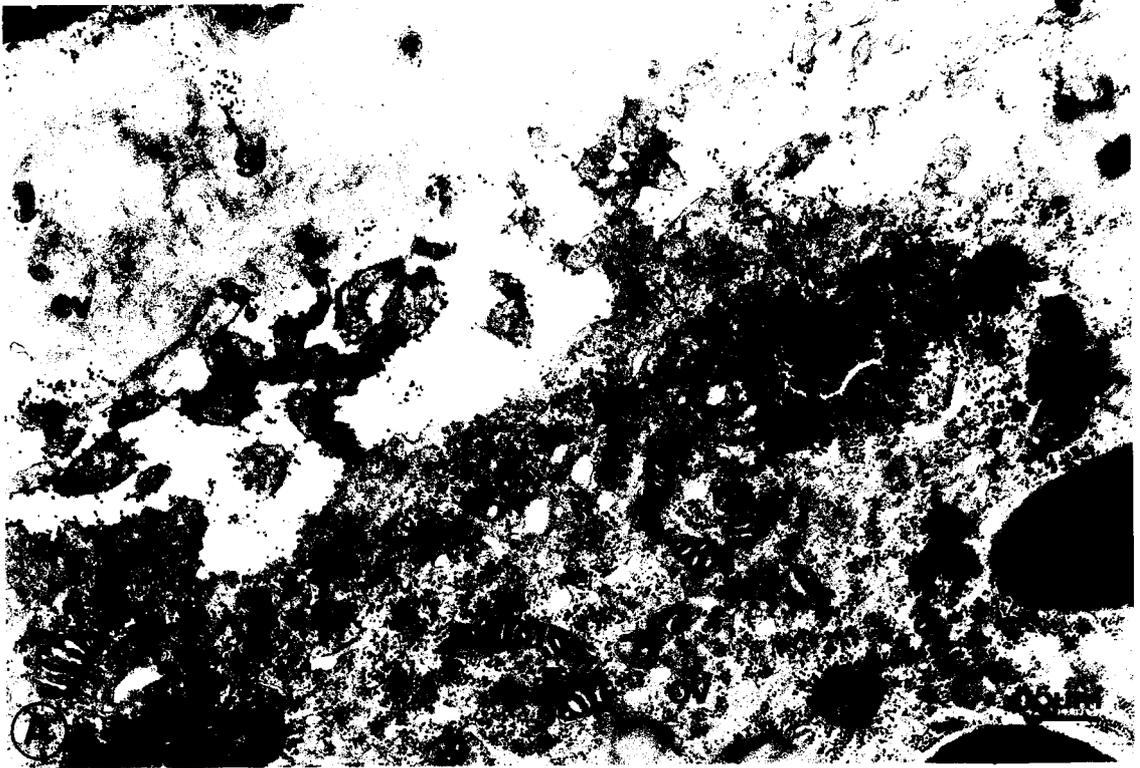


Planche XI : Coupes au niveau du cytoplasme cortical du pôle animal d'ovocytes après 2 heures d'incubation en progestérone. Condensation du glycogène en amas compacts.

Figure A : On observe la présence d'une plage compacte de glycogène (gl) dans le cytoplasme cortical de l'ovocyte, des particules de glycogène dans l'espace périvitellin et au niveau de l'enveloppe vitelline (ev). (X 20 000).

Figure B : Dans le cytoplasme cortical un amas de granules de glycogène (gl) est englobé dans une vésicule (ve), on note la présence de vésicules à membranes lisses (ve) au contact des granules de glycogène encore libre dans le cytoplasme (en bas à droite). (X 40 000).





JIS
LIFE

Planche XII : Vue d'ensemble du pôle animal d'ovocytes de Pleurodèle après 3 heures de traitement hormonal. Détection du glycogène par la technique de la thiocarbohydrazide-protéinate d'argent (THIERRY).

Figure A : Des petits amas de particules de glycogène β (gl) sont extrêmement abondants dans le cytoplasme cortical. On remarque la présence de granules de glycogène β dans l'espace périvitellin et à travers l'enveloppe vitelline (ve). (X 21 000).

Figure B : Des granules de glycogène β (gl) traversent l'enveloppe vitellin (ve) en direction des cellules folliculaires (cf). Dans le cytoplasme cortical, on note la présence de vésicules (ve) au contact des granules de glycogène (flèche). (X 18 000).

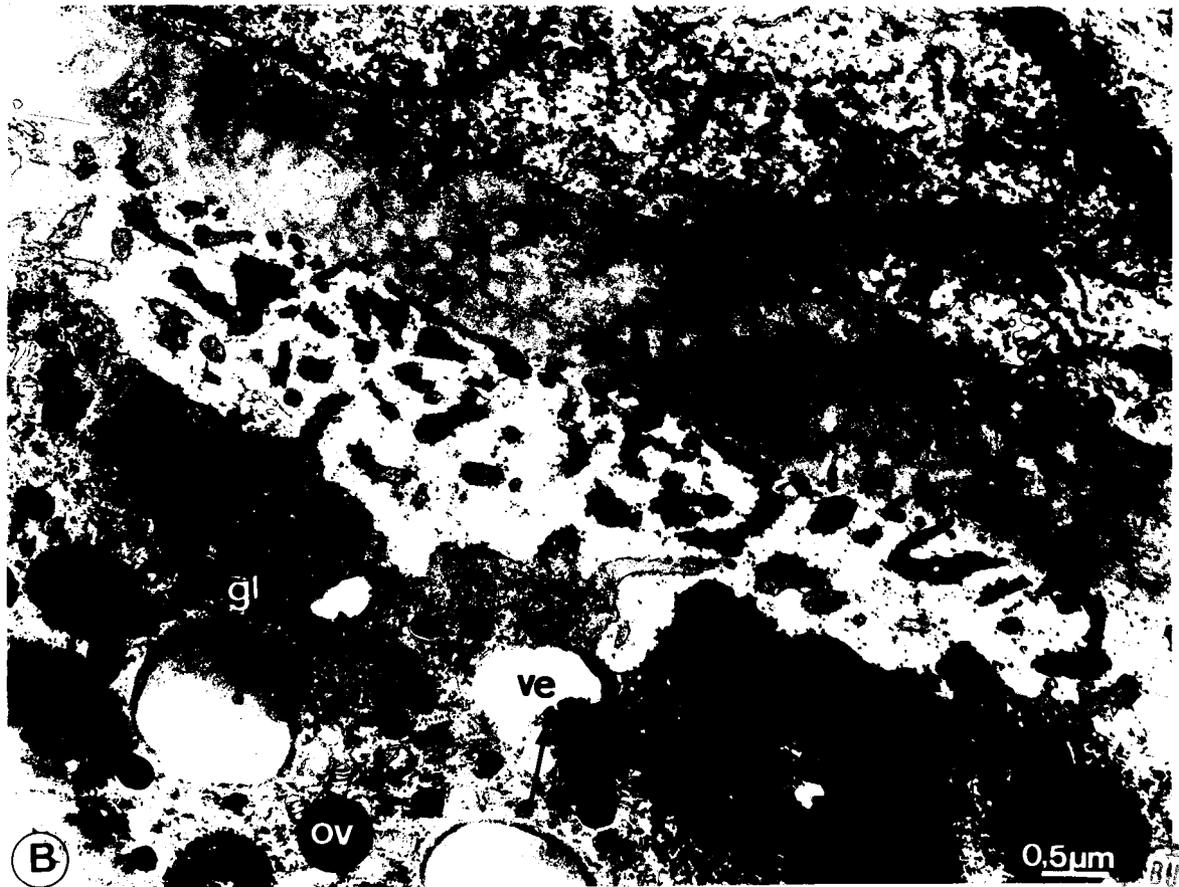


Planche XIII : Ovocyte de Pleurodèle après 6 heures d'incubation dans la progestérone (pôle animal).

A ce stade de la maturation, des amas compacts de granules de glycogène β (gl) sont expulsés dans l'espace périvitellin. Des groupes de granules sans limites membranaires sont aussi observés dans le cytoplasme cortical. On remarque la présence d'un corps multivésiculaire (cmv) dans l'espace périvitellin. (X 42 000).



211



Planche XIV : Coupe d'un ovocyte de Pleurodèle après 8 heures d'incubation en présence de progestérone. Les premières étapes du processus de sécrétion des granules de glycogène β .

Figure A : Vue d'ensemble de la zone corticale de l'ovocyte. Des vésicules (ve) sans contenu apparent sont au contact de petits groupes de granules de glycogène β (gl). Une vésicule (ve) phagocyte un amas de glycogène (gl) ; un groupe de granules de glycogène délimité par une membrane est englobé dans une vésicule. (X 46 000).

Figure B : Vue de détail de la vésicule (ve) englobant l'amas de glycogène (gl) délimité par une membrane (mve). (X 108 000).

Figure C : Vue de détail d'une vésicule (ve) qui phagocyte un groupe compact de granules de glycogène (gl). (X 134 000).

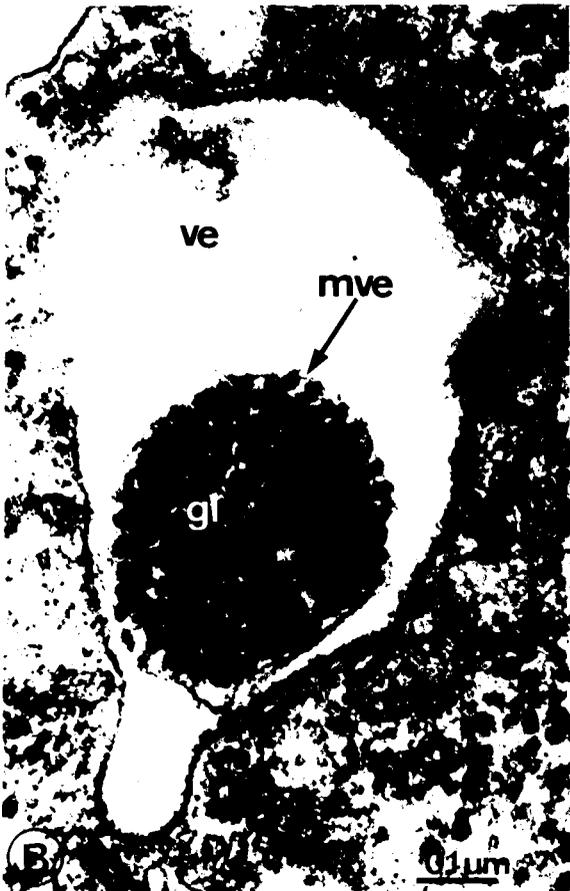
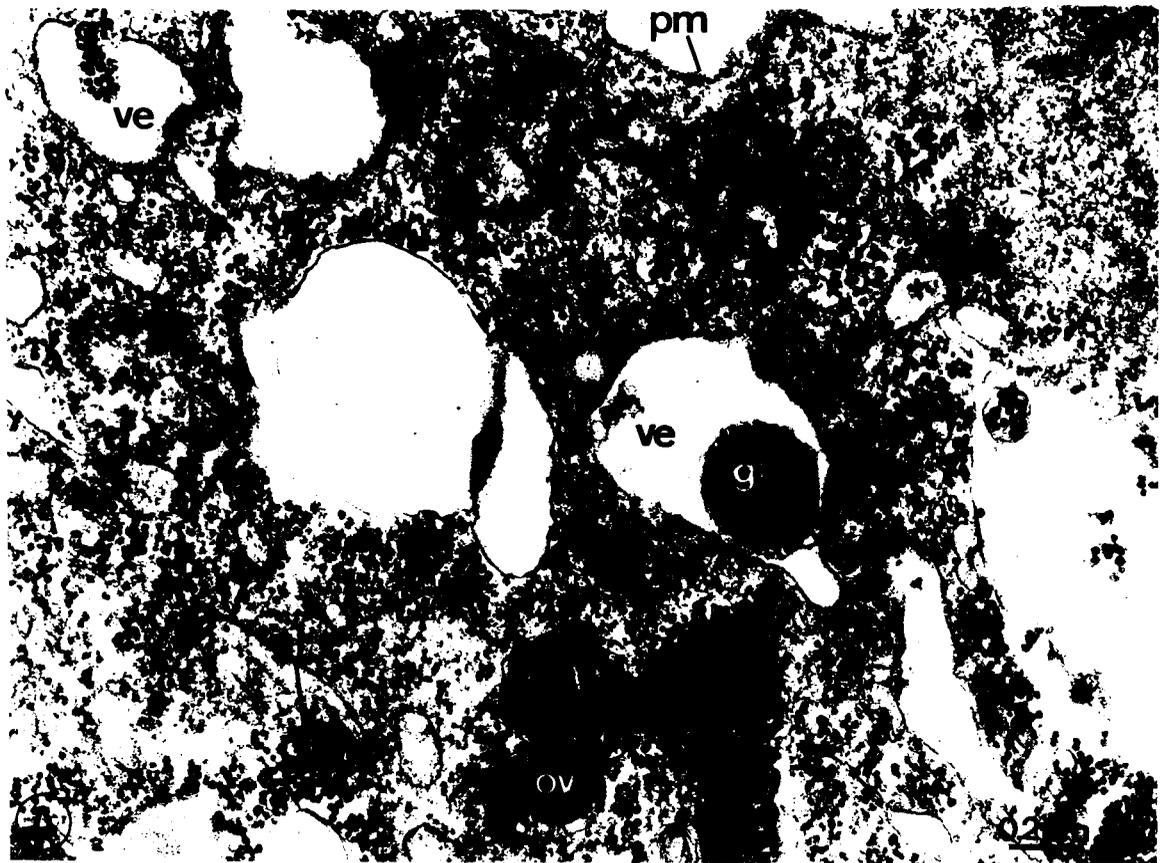
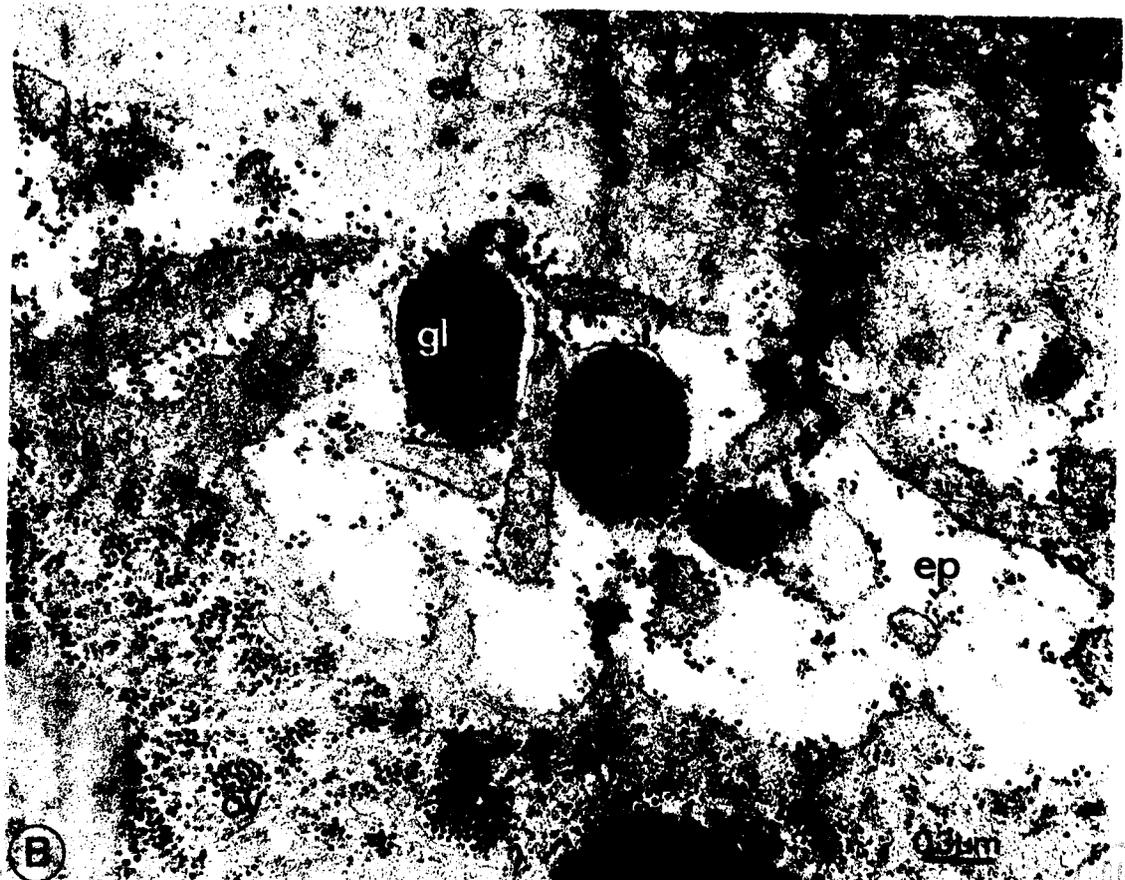
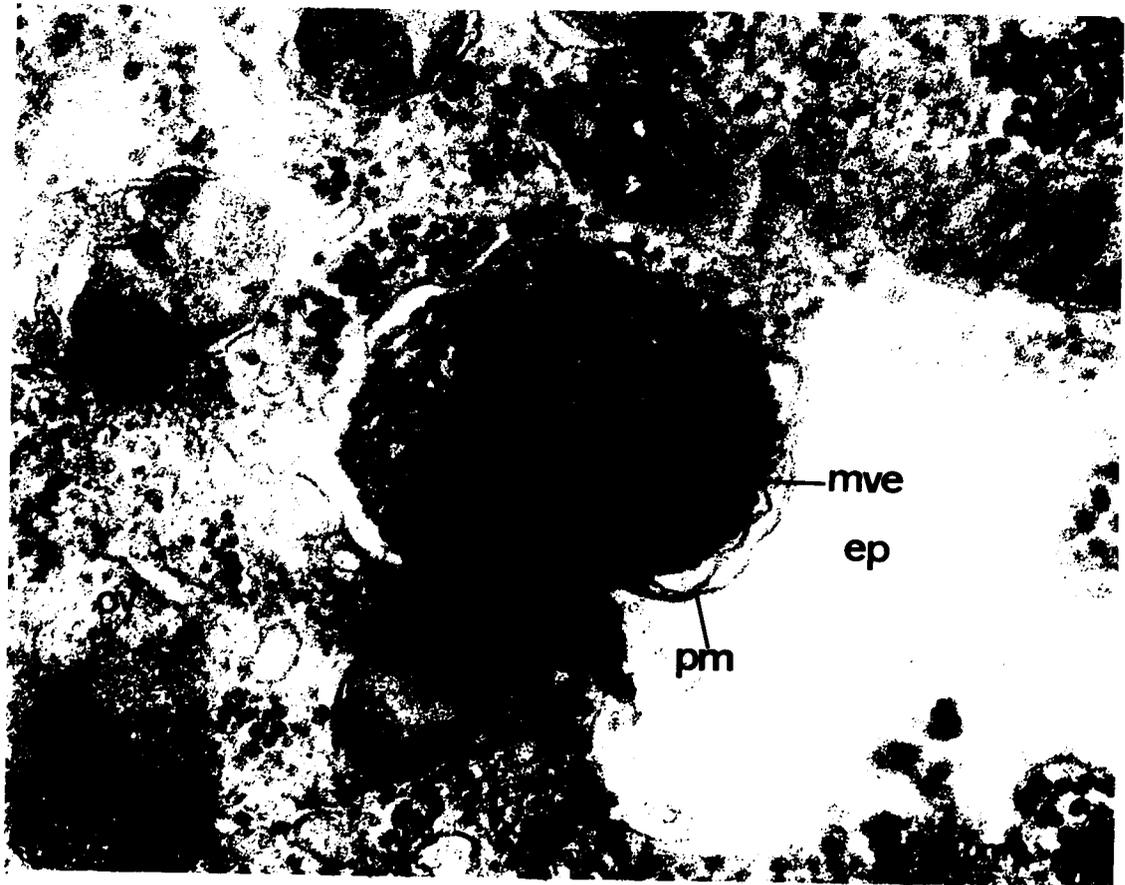


Planche XV : Ovocytes soumis pendant 8 heures à la progestérone. Les dernières étapes du processus de sécrétion des granules de glycogène B.

Figure A : Une vésicule à double membrane (mve) remplie de glycogène B (gl) vient au contact du plasmalemme (pm). ep : espace périvitellin. X 90 000.

Figure B : Des groupes de granules de glycogène (gl) encore entourés de la membrane vésiculaire interne sont expulsés dans l'espace périvitellin (ep). (X 30 000).



(B)

MS
FILE

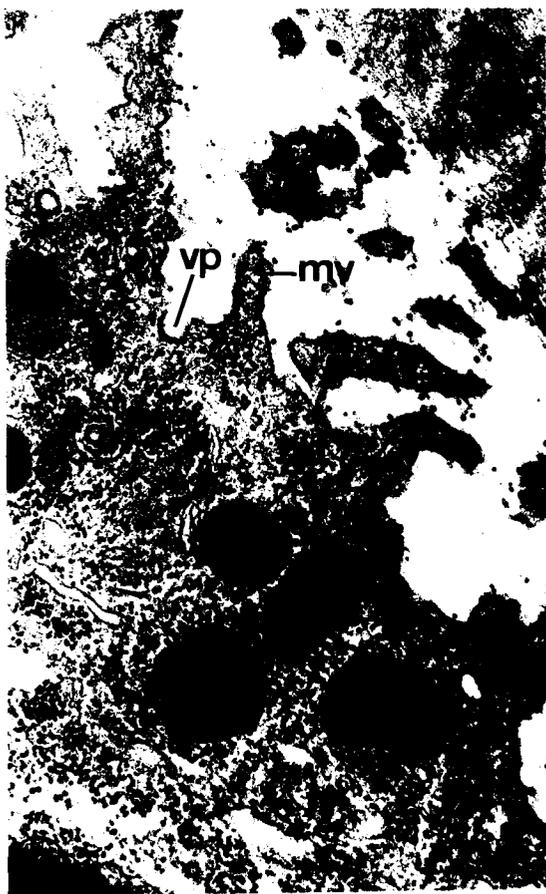
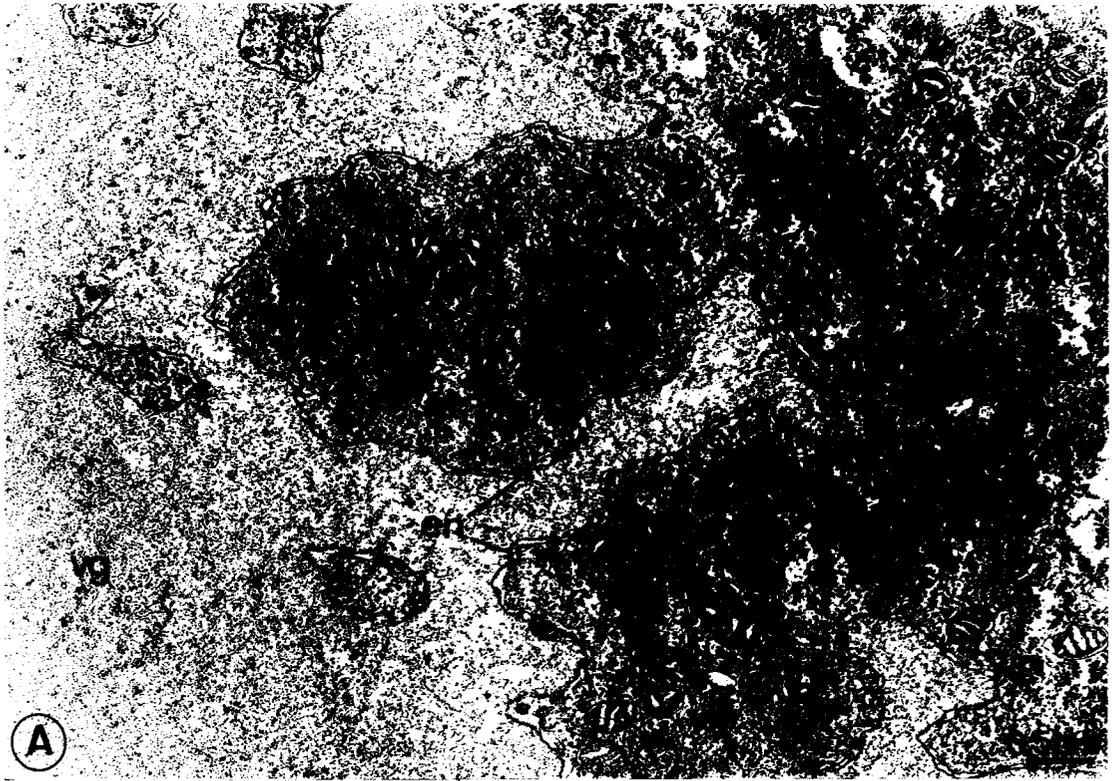
Planche XVI : Ovocytes de Pleurodèle après 8 à 10 heures de traitement hormonal.

Figure A : Morphologie de l'enveloppe nucléaire et du cytoplasme périnucléaire.

L'enveloppe nucléaire (en) présente encore à ce stade de la maturation (8 heures d'incubation hormonale) de nombreux replis à sa partie basale. Le cytoplasme périnucléaire est très riche en granules de glycogène B (gl) et en mitochondries (m). (17 000).

Figure B : Après 9 heures d'incubation hormonale, les microvillosités régressent légèrement (mv), la membrane plasmique présente de nombreuses figures de pinocytoses (vp). Dans le cytoplasme cortical on remarque la présence des granules denses (gd) près de la membrane plasmique. Les différentes formations de glycogène ont disparu, quelques granules restent dispersés dans le cytoplasme cortical et dans l'espace périvitellin. (X 21 000).

Figure C : Vue de détail d'un granule dense (gd) situé au contact du plasma lemme (pm). (X 100 000).



MS
GELS

Planche XVII : Morphologie des lamelles annelées dans des ovocytes soumis à la progestérone pendant 6 à 8 heures d'incubation.

Figure A : Empilement de lamelles annelées (la) situé dans le cytoplasme cortical. On remarque la disparition de quelques pores annulaires au milieu et aux extrémités des lamelles (flèche). (60 000).

Figure B et C: Empilements de lamelles annelées (la) situées dans le cytoplasme interne.

Figure B : (X 42 000).

Figure C : (X 21 000).



Planche XVIII : Morphologie de la surface ovocytaire et du cytoplasme cortical (pôle animal) après la rupture de l'enveloppe de la vésicule germinative (12 heures d'incubation hormonale).

La membrane plasmique (pm) ne présente plus de véritables microvillosités.

Le cytoplasme cortical dépourvu d'organites cytoplasmiques est envahi par des masses considérables de vésicules (ve, étoile) de différente taille. Le glycogène (gl) cytoplasmique forme des petits groupes compacts sans limite membranaire. Un granule dense (gd) situé près du plasmalemma est encore présent à ce stade. (X 42 000).



ev

pm

ve

ov

2µm



Planche XIX : Morphologie du cytoplasme interne (pôle animal) de l'ovocyte après la rupture de l'enveloppe nucléaire.

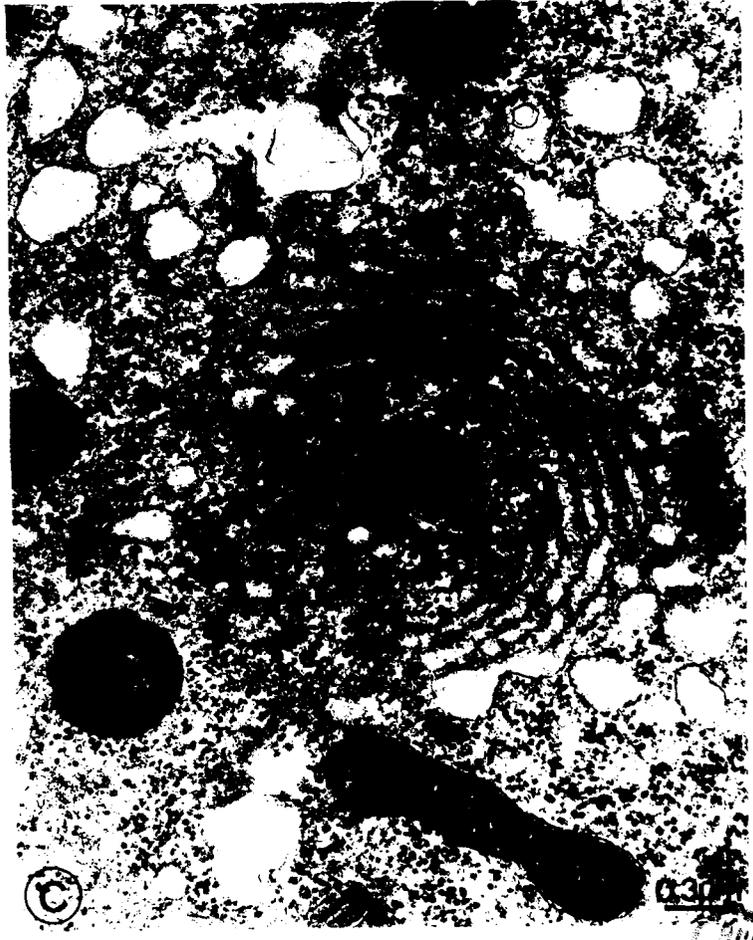
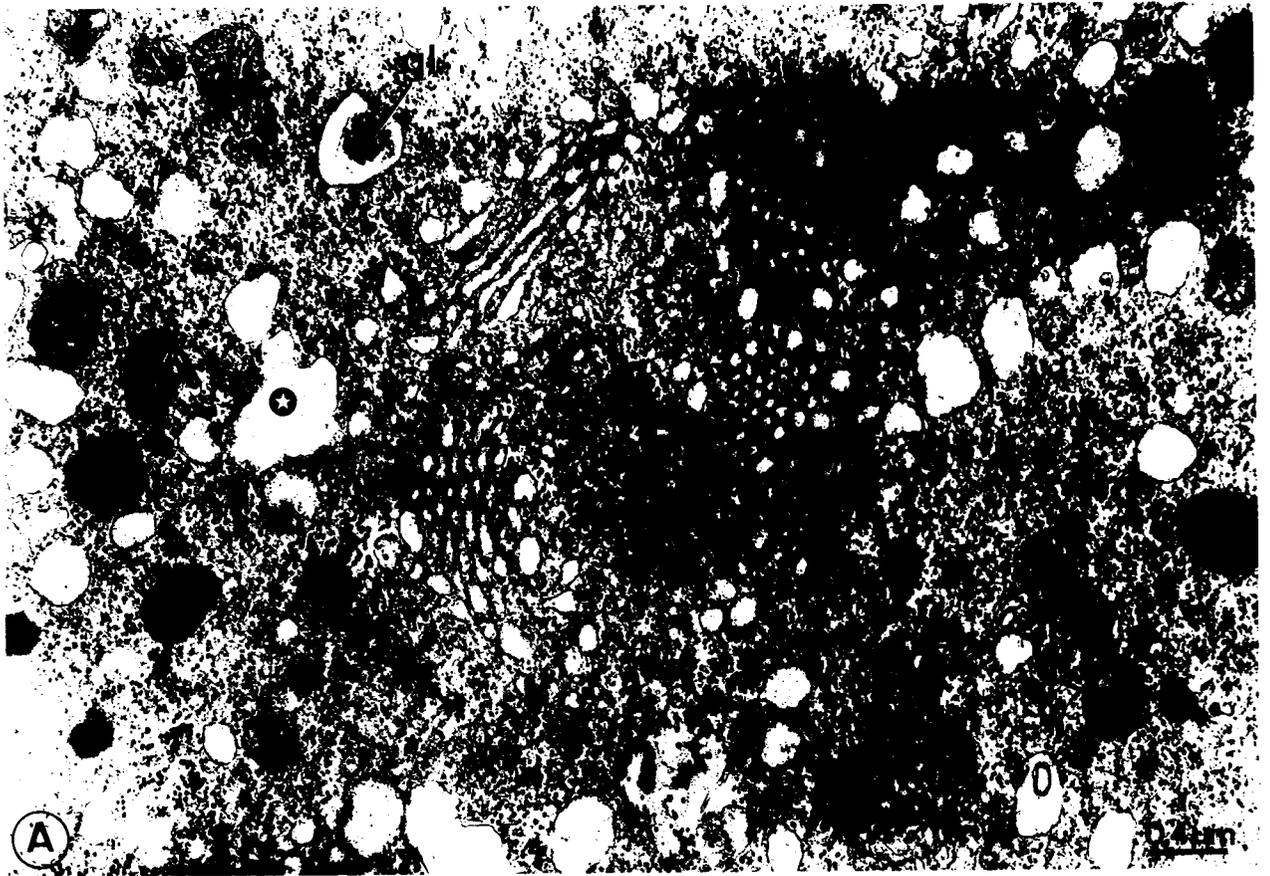
Figure A et B : On note la présence de deux types de vésicules, des vésicules (étoile) identiques à celles décrites dans le cytoplasme cortical (Pl. XVIII) et des vésicules (ve) de petite taille formant des petits groupes dans le cytoplasme interne. Dans cette partie du cytoplasme, on remarque encore la présence d'une vésicule remplie de glycogène (gl), du glycogène dispersé et des organites cytoplasmiques.

Figure A : (X 23 500).

Figure B : (X 19 500).

Figure C : Vue générale d'un dictyosome de l'appareil de Golgi (g), présentant des saccules à contenu de faible densité. Des vésicules se détachent sur les extrémités des saccules. (X 35 000).





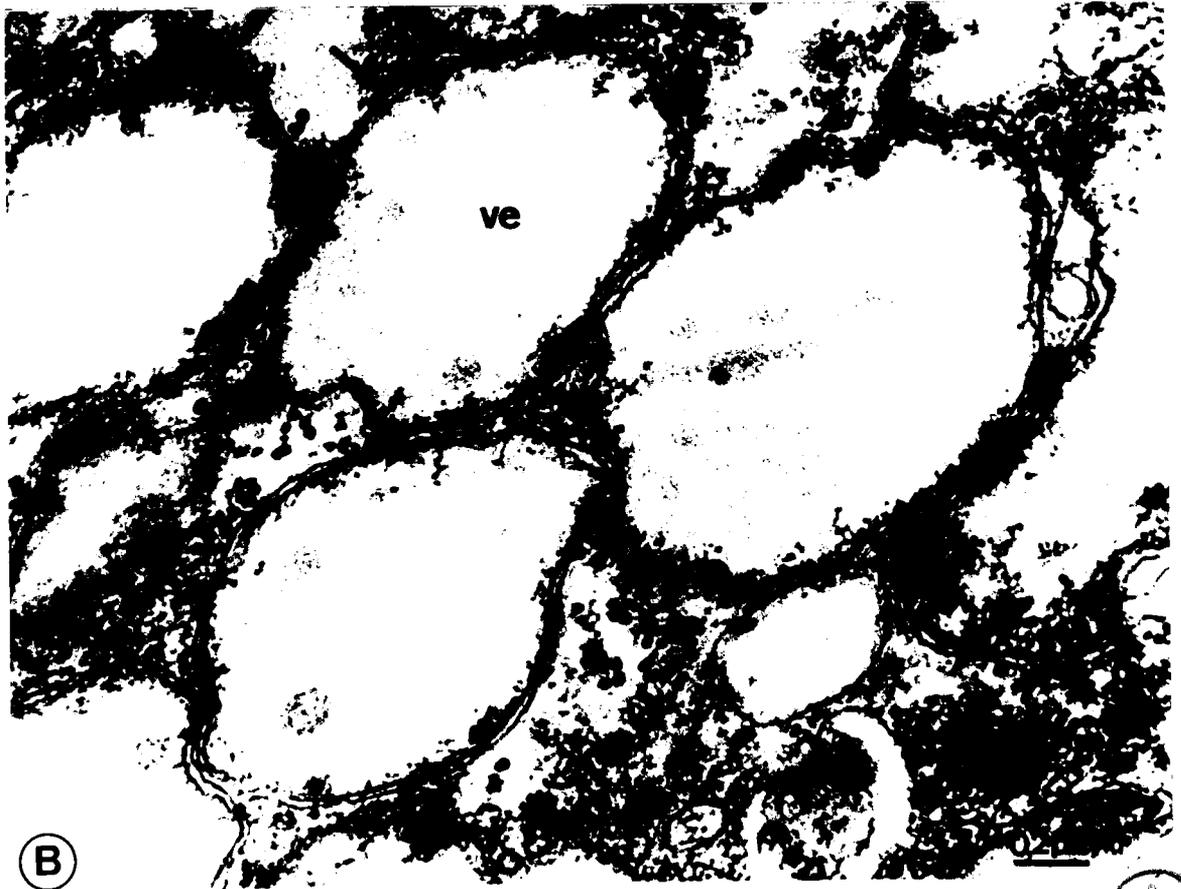
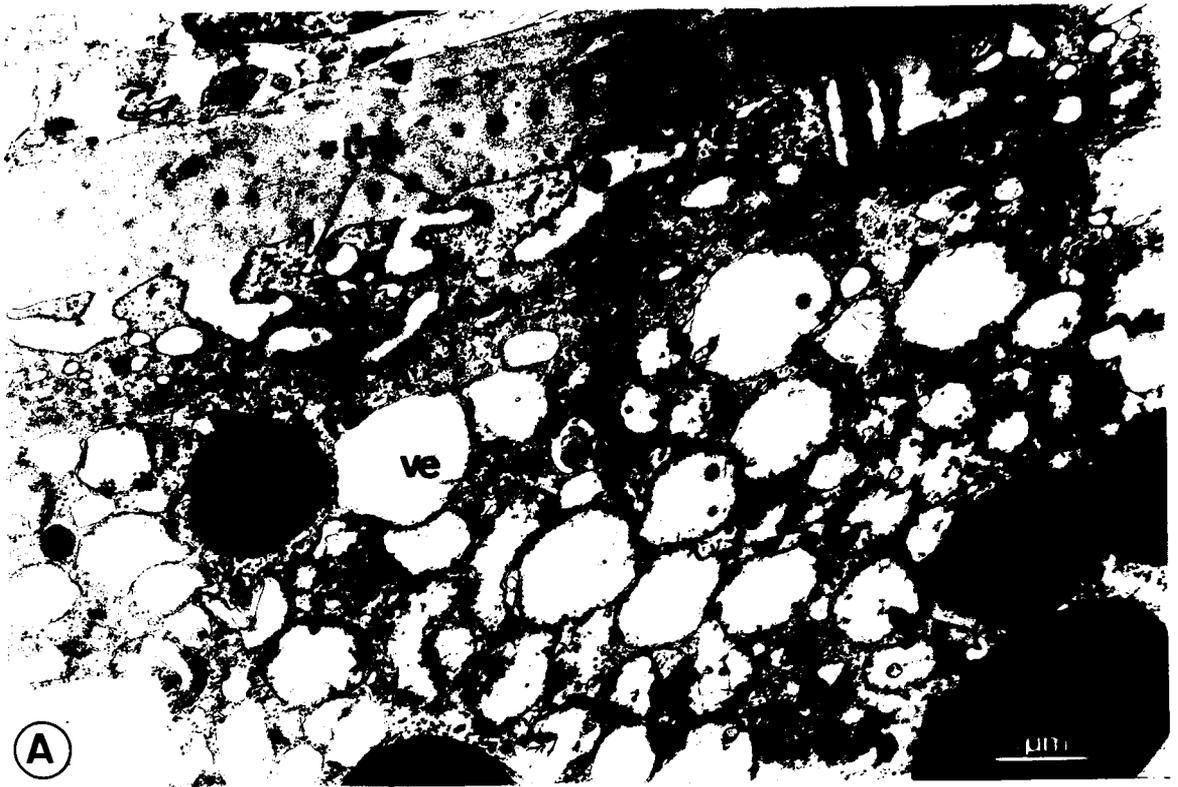
BUSS
LILLE

Planche XX : Morphologie du cytoplasme cortical au pôle végétatif après la rupture de l'enveloppe nucléaire (12 heures d'incubation hormonale).

Figure A : Les microvillosités (mv) ont considérablement regressé, des jonctions gap entre l'ovocyte et quelques macrovillosités des cellules folliculaires (ma) peuvent encore subsister à ce stade. Le cytoplasme cortical est très riche en vésicule (ve), des granules de glycogène (gl) sont disséminés entre ces vésicules. (X 13 500).

Figure B : vue de détail des vésicules (ve) qui possèdent une double membrane (flèche). (X 50 000).





BMS
L113

Planche XXI : Analyse de la surface ovocytaire et de quelques constituants cytoplasmiques par cryofracture. Ovocyte témoin.

Figure A : *Lamelles annelées cytoplasmiques (X 13 400).*

Figure B : *Structure d'un granule de vitellus. (X 16 000).*

Figure C : *Vue de détail des lamelles annelées. (X 40 000).*

Figure D : *Fracture au niveau du plasmalemme. Face P : face adjacente au cytoplasme ovocytaire (ov). (X 40 000).*

Figure E : *Fracture au niveau de la base des cellules folliculaires. Face P face adjacente au cytoplasme et sa complémentaire ou face E. Les flèches indiquent les zones d'émergence de macrovillosités. (X 13 400)*

Les grosses flèches indiquent la direction de l'ombrage.

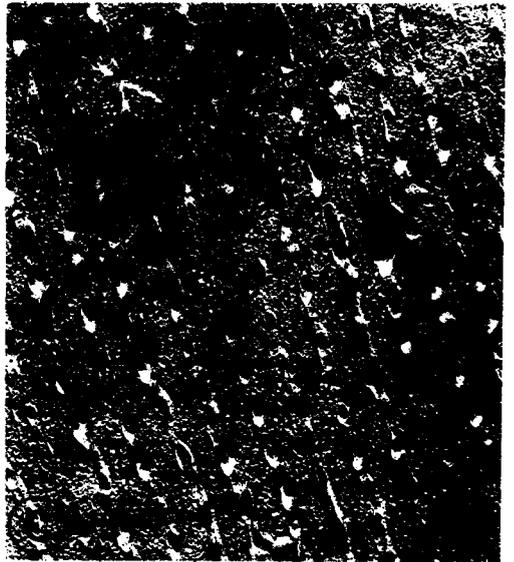
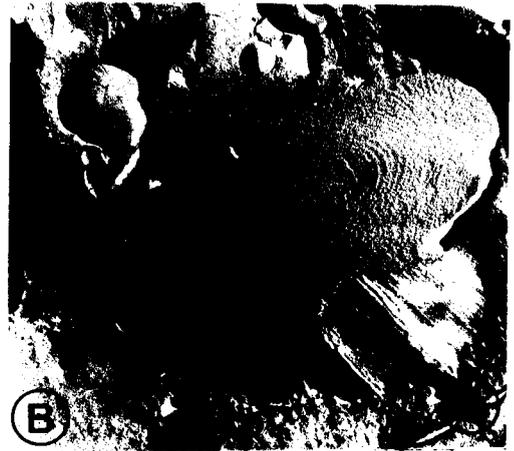
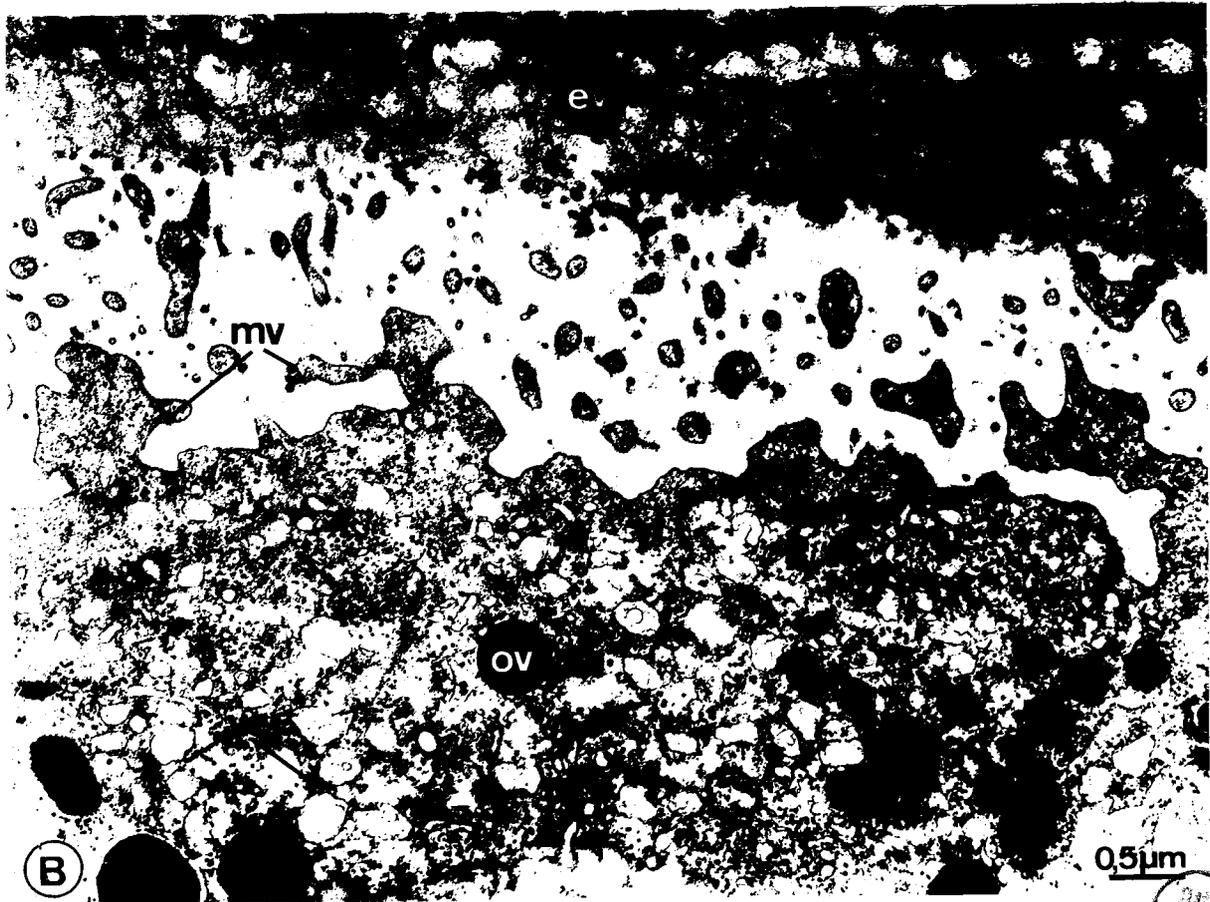
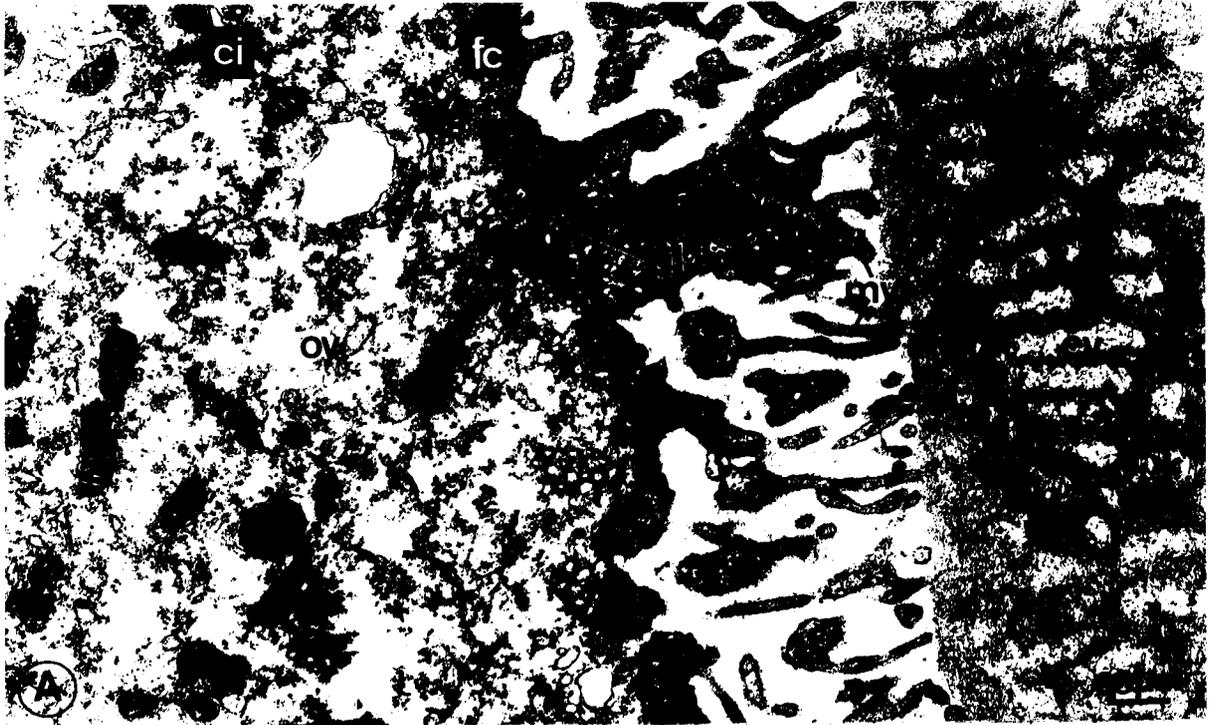


Planche XXII : Coupes d'ovocytes d'Axolotl réalisées au pôle animal.

- Figure A : Ovocyte témoin.
La membrane plasmique forme de nombreuses microvillosités (mv) qui s'étendent vers l'enveloppe vitelline (ev) et occupent ainsi tout l'espace périvitellin. L'enveloppe vitelline présente une structure en nid d'abeille (astérisque). Le cytoplasme cortical de l'ovocyte (ov) est constitué de deux parties, une structure dense constituée d'un feutrage cortical (fc) situé sous le plasmalemma et une structure sous-jacente plus lâche forme le cytoplasme interne (ci). Des granules de glycogène (gl) sont disséminés aussi bien dans le feutrage cortical que dans le cytoplasme interne. (X 16 000).
- Figure B : Morphologie de l'ovocyte après la rupture de l'enveloppe nucléaire.
Les microvillosités (mv) ont régressées. Le cytoplasme est caractérisé par la présence de vésicules de petite taille (ve). On note aussi la présence d'un groupe de granules denses (gd). (X 18 500).



MS
FILE

Planche XXIII : Ovocyte d'Axolotl en cours de maturation.

Figure A : Le cytoplasme cortical de l'ovocyte (ov) renferme des granules de glycogène (gl) qui se présentent soit sous forme de groupes compacts non délimités soit phagocytés par des vésicules (ve). On note aussi la présence d'un amas de granules de glycogène limité par une membrane dans l'espace périvitellin. (X 16 000)

Figure B : Vue de détail d'une vésicule (ve) phagocytant un groupe de granules de glycogène (gl). (X 40 000).



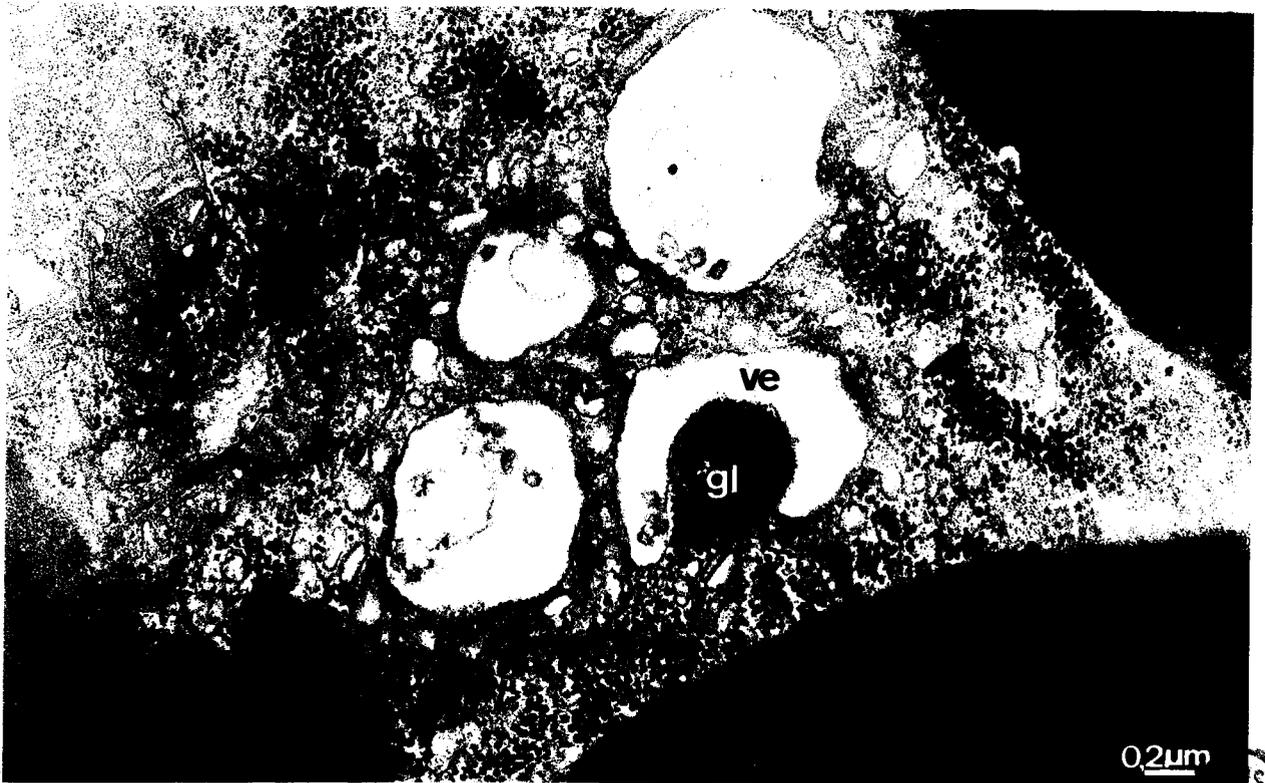
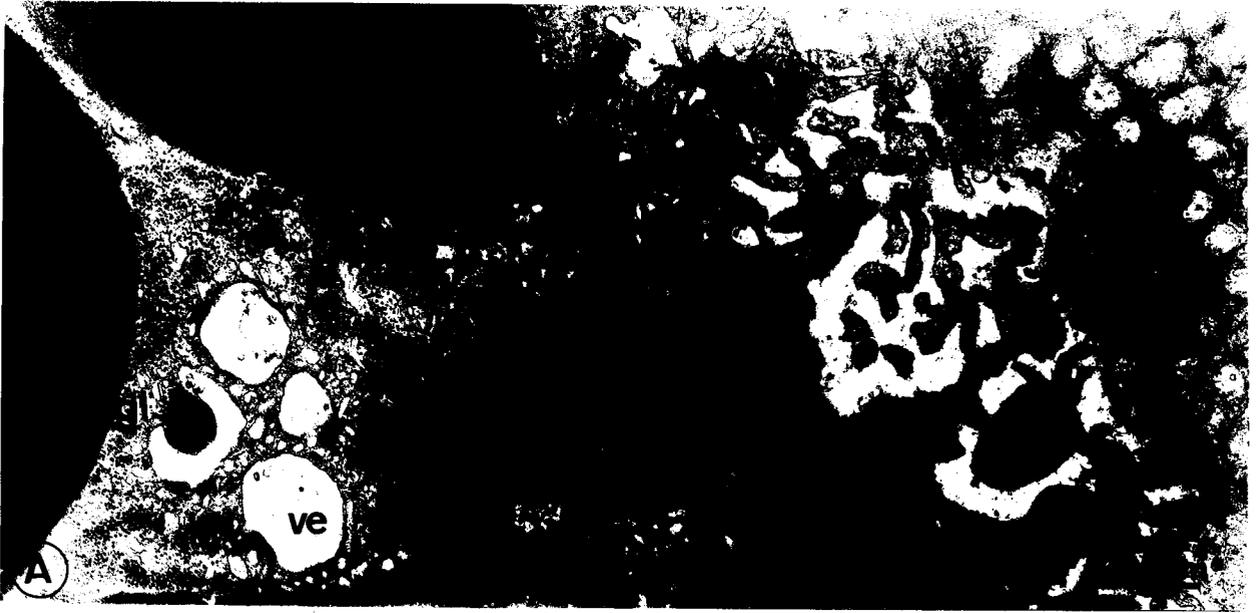


Planche XXIV : Morphologie de l'ovocyte de Xenope. Coupe réalisée au pôle animal.

- Figure A : Ovocyte témoin.
La membrane plasmique forme de nombreuses microvillosités (mv)
Entre les granules corticaux (gc) et tous les autres organites
(vésicules lipidiques (l), mitochondries (m), mélanosomes (ml),
les granules de glycogène occupent uniformément le cytoplasme
cortical (gl). (X 16 000).
- Figure B : Ovocyte en cours de maturation (5 heures d'incubation hormonale)
L'enveloppe vitelline (ev) présente une texture plus lâche que
celle des Urodèles.
A ce stade, de la maturation les microvillosités (mv) ont regres
en partie.
Dans le cytoplasme de l'ovocyte (ov) apparaissent des vésicules
(ve) de petite taille. (X 16 000).



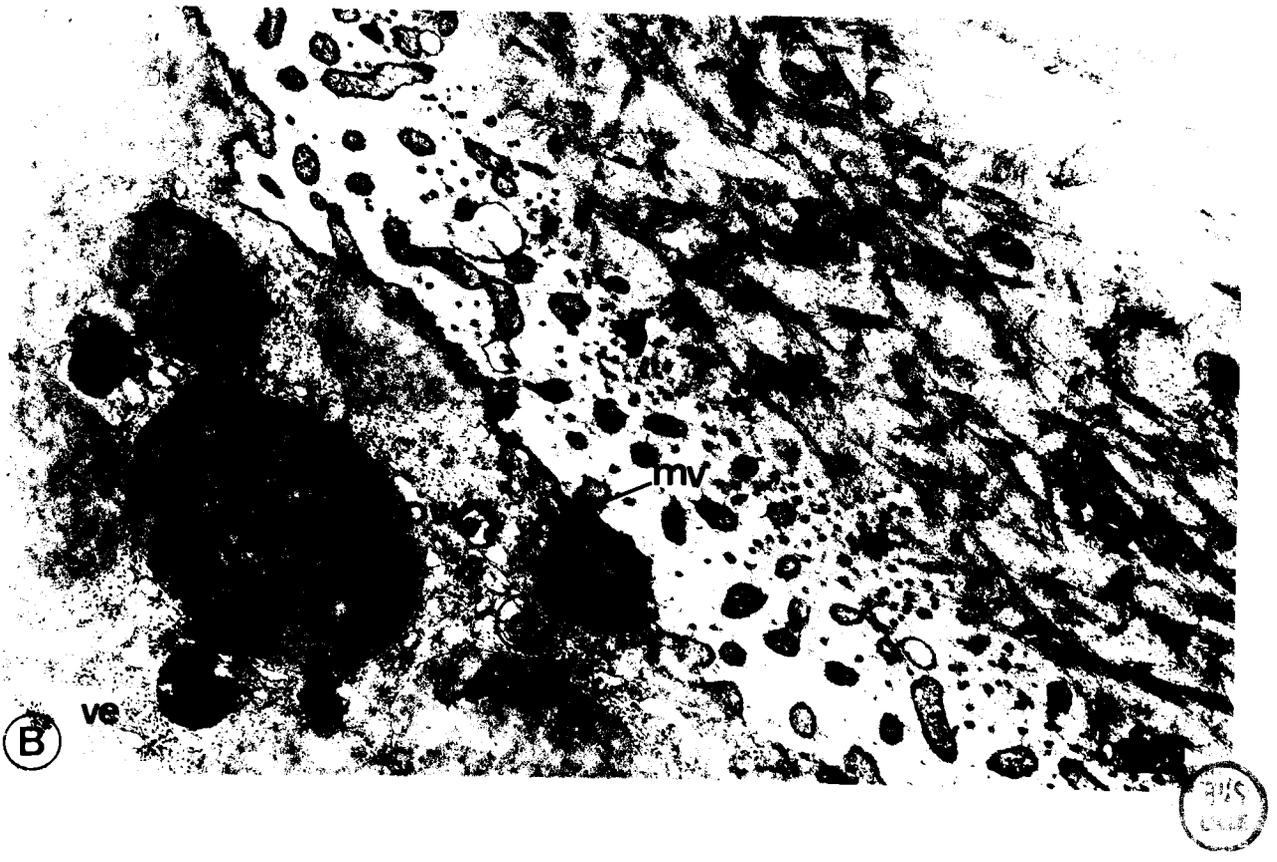
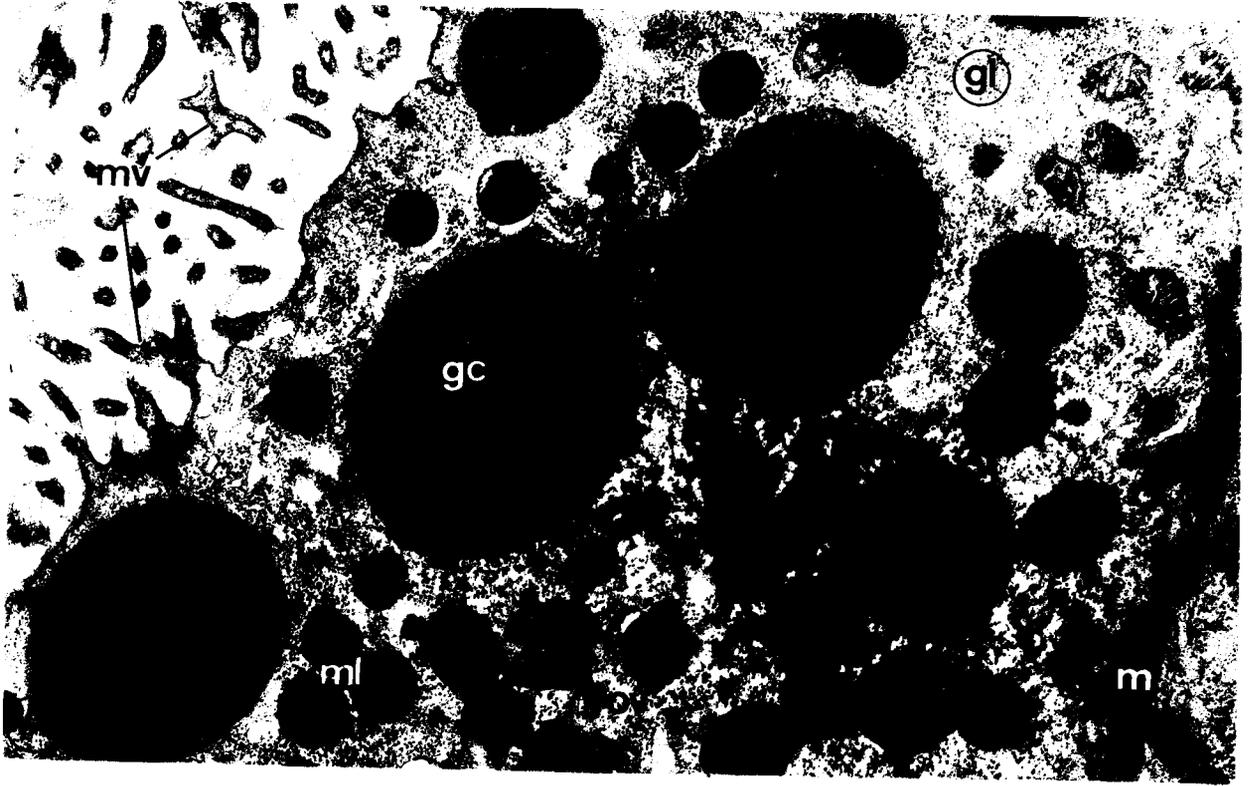


Planche XXV : Morphologie des lamelles annelées dans les ovocytes de Xenope.

Figure A et B : Lamelles annelées (La) "bourgeonnement" à partir de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire (en) d'un ovocyte témoin.

Figure A : (X 15 000).

Figure B : (X 15 000).

Figure C : Lamelles annelées cytoplasmiques d'un ovocyte en cours de maturation. On assiste à un début de vésiculation de ces lamelles (flèche) par disparition de certains pores annulaires. (X26 500).

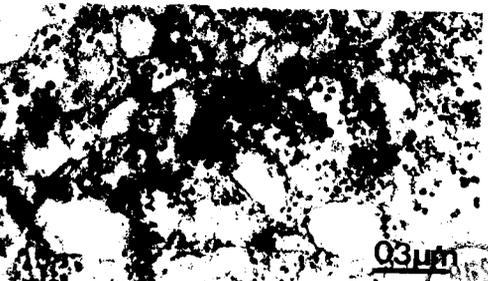
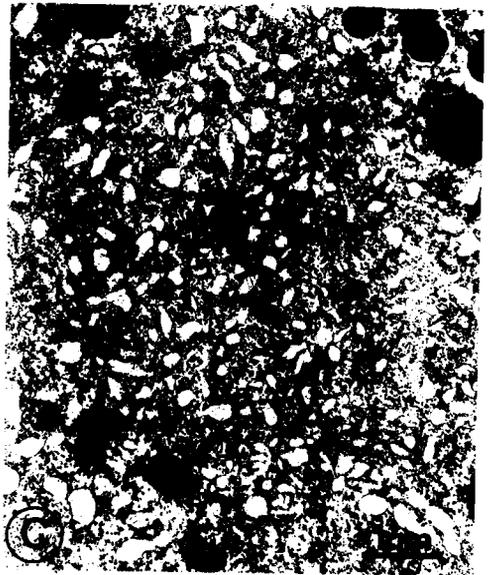
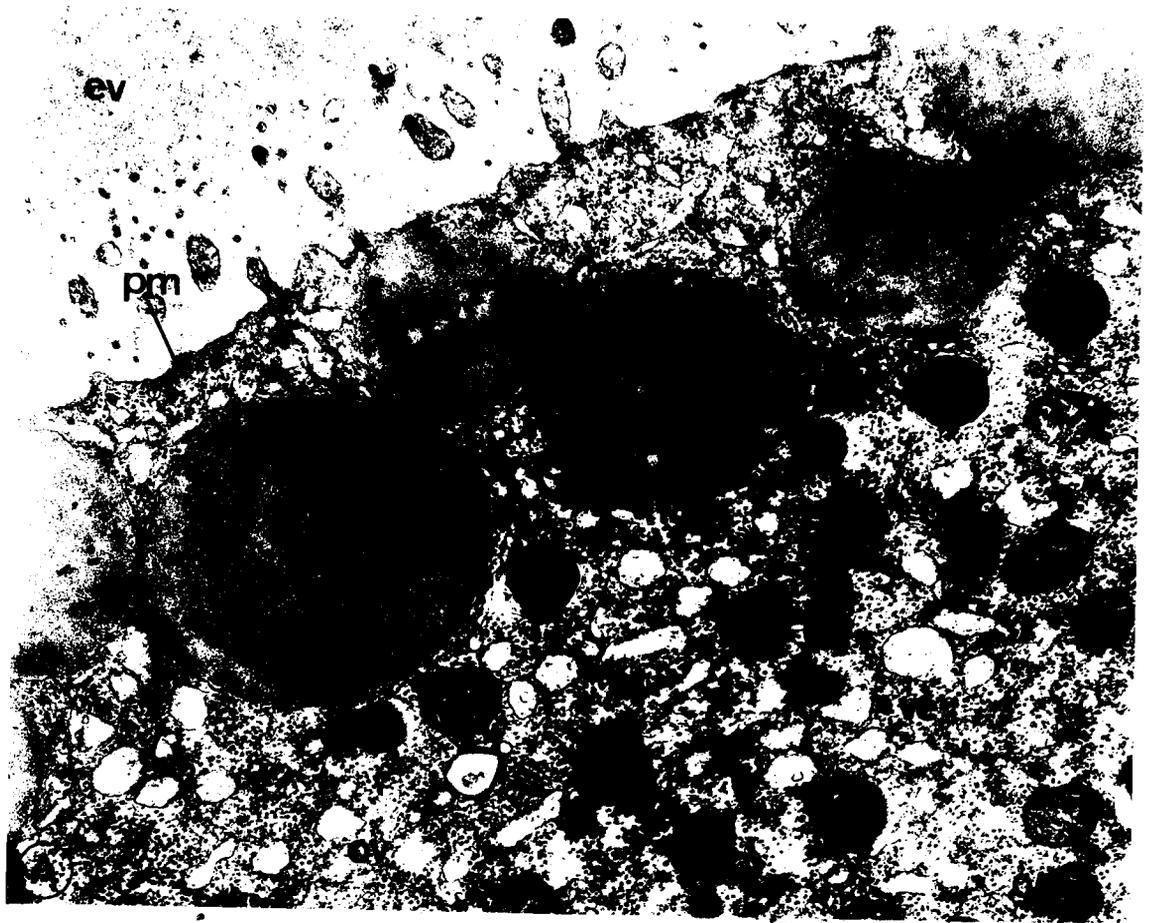
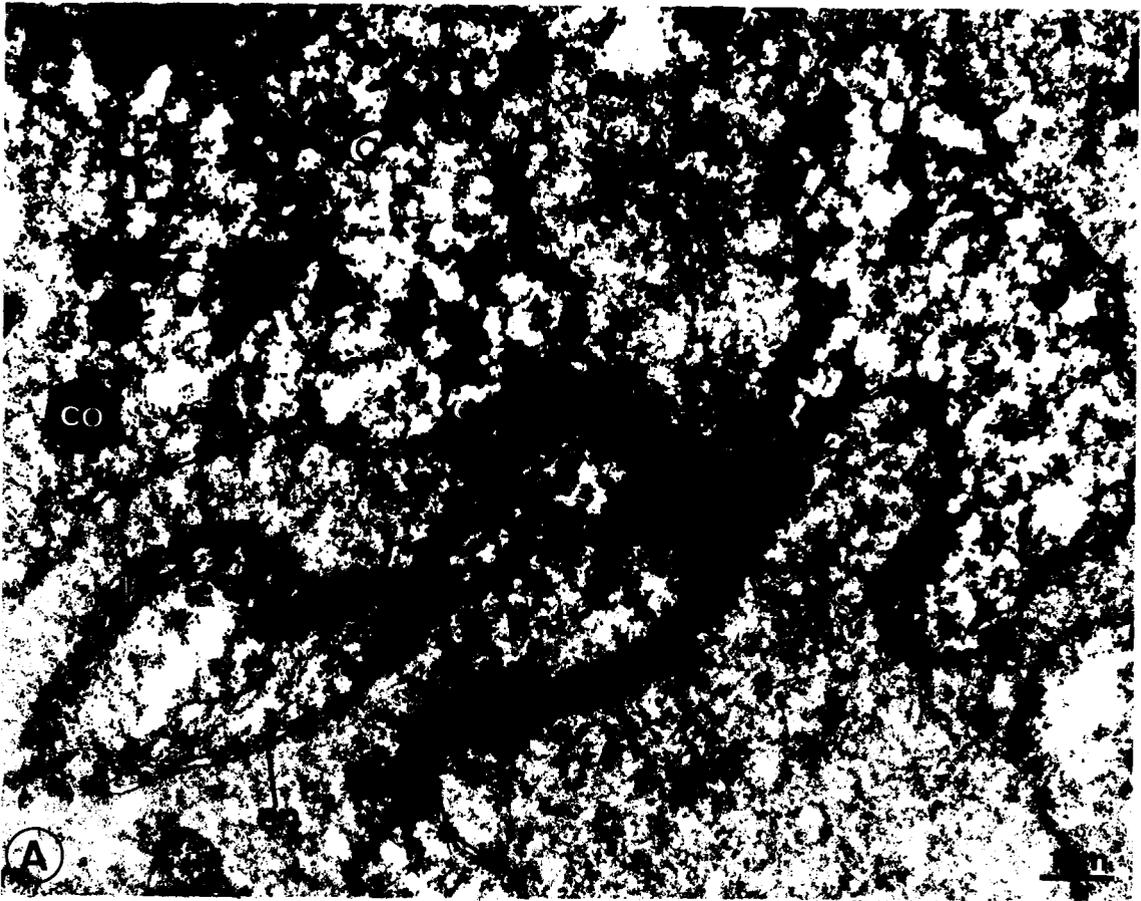


Planche XXVI : Morphologie de l'ovocyte de Xenope au moment de l'apparition de la tache de maturation au pôle animal.

- Figure A : Vue générale de la surface ovocytaire et du cytoplasme cortical. Le plasmalemme (pm) présente de très rares microvillosités. Les granules corticaux (gc) contenu dans le cytoplasme ovocytaire (ov) ont migrés vers la surface. Le cytoplasme cortical est occupé par des vésicules (ve) de taille sensiblement identique. La quantité des granules de glycogène répartis entre les organites est la même que dans l'ovocyte témoin. (X 20 000).
- Figure B : Vue de détail des vésicules (ve) et des granules de glycogène (gl) occupant le cytoplasme cortical. (X 33 000).
- Figure C : Un ensemble de vésicules (ve) forme une plage vésiculeuse. (X 10 000).





FILED
2011

CHAPITRE V

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMS, E.C. & HERTIG, A.T., 1964. - Studies on Guinea-pig oocytes. I. Electron microscopic observations on the development of cytoplasmic organelles in oocytes of primordial and primary follicles. *J. Cell Biol.*, 21, 397-427.
- AFZELIUS, B.A., 1955. - The ultrastructure of the nuclear membrane of the sea urchin oocyte as studied with the electron microscope. *Exp. Cell Res.*, 8, 147-158.
- ALBERTINI, D.F. & ANDERSON, E., 1974. - The appearance and structure of intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junctions. *J. Cell Biol.*, 63, 234-250.
- ANDO, S., 1960. - Physiological study on egg formation of the fish. I. Accumulation of carbohydrates and proteins during oogenesis. *Embryologia*, 5, 239-246.
- BAL, A.K., JUBINVILLE, F., COUSINEAU, G.H., et INOUE, S., 1968. - Origin and fate of annulate lamellae in *Arbacia punctulata* eggs. *J. Ultrastruct. Res.*, 25, 15-28.
- BALINSKY, B.I., 1966. - Changes in the ultrastructure of Amphibian eggs following fertilization. *Acta Embryol. Morphol. Exp.*, 9, 132-154.
- BALINSKY, B.I., DEVIS, R.J., 1963. - Origin and differentiation of cytoplasmic structures in the oocytes of *Xenopus laevis*. *Acta Embryol. Morphol. Exp.*, 6, 55-108.
- BARER, R.S., JOSEPH, S. & MEEK, G.A., 1960. - The origin and fate of the nuclear membrane in meiosis. *Proc. Roy. Soc. B* 125, 353-366.
- BARSACCHI-PILONE, G. & HUMPHRIES, A.A., 1975. - Progesterone induced *in vitro* maturation in oocytes of *Notophthalmus viridescens* (Amphibia Urodela) and some observations on cytological aspects of maturation. *J. embryol. Exp. Morphol.*, 34 451-466.
- BAULIEU, E.E., GODEAU, F., SCHORDERET, M. & SCHORDERET-SLATKINE, S., 1978. - Steroid-induced meiotic division in *Xenopus laevis* oocyte surface and calcium. *Nature*, 275, 593-598.

- BENZO, C.A., DE GENNARO, L.D. & STEARNS, S.B., 1975. - Glycogen metabolism in the developing chick glycogen body : functional significance of the direct oxidative pathway. *J. Exp. Zool.*, 193, 161-166.
- BERGAMI, M., MANSOUR, T.E. & SCARANO, E., 1968 - Properties of glycogen phosphorylase before and after fertilization in the sea urchin eggs. *Exp. Cell Res.*, 49, 650-655.
- BIHLER, I., CHARLES, P. et SAWH, P.C., 1982. - Role of calcium in the regulation of sugar transport in the avian erythrocyte : Effects of the calcium ionophore, A 23187. *Cell Calcium*, 3, 243-262.
- BLUEMINK, J.G., 1970. - The first cleavage of the amphibian egg. An electron microscopic study of the onset of cytokinesis in the egg of *Ambystoma mexicanum*. *J. Ultrastruct. Res.*, 32, 142-166.
- BRACHET, J., 1965 a. - Emission of Feulgen-positive particles during the *in vitro* maturation of toad oocytes. *Nature*, London 208, 596-597.
- BRACHET, J., 1965 b. - Le rôle des acides nucléiques dans la morphogénèse. *Ann. Biol.*, 4, 21-48.
- BRACHET, J., 1967. - Action de l'actinomycine et de la puromycine sur la maturation des ovocytes d'Amphibiens. *Exp. Cell Res.*, 48, 233-236.
- BRACHET, J., 1974. - Observations cytologiques et cytochimiques sur la maturation de l'ovocyte chez les Urodèles. *Ann. Biol.*, 13, 271-284.
- BRACHET, J., HANOCQ, F. & VAN GANSEN, P., 1970. - An cytochemical and ultrastructural analysis of *in vitro* maturation in Amphibian oocytes. *Develop. Biol.*, 21, 157-195.
- BRANTON, D., BULLIVANT, S., GILULA, N.B., KARNOWSKY, M.J., MOOR, H., MUHLETHALER, K., NORTHCOTE, D.H., PACKER, L., SATIR, P., SPETH, V., STAEHLIN, L.A., STEERE, R.L. & WEINSTEIN, R.S., 1975. Freeze etching nomenclature. *Science*, 190, 55-56.
- BROWNE, C.L., WILEY, H.S. & DUMONT, J.N., 1979. - Oocyte-follicle cell gap junction in *Xenopus laevis* and the effects of gonadotropin on their permeability. *Science*, 203, 182-183.

- CARASSO, N., 1960. - Rôle de l'ergastoplasme dans l'élaboration du glycogène au cours de la formation du paraboloïde des cellules visuelles. *C.R. Acad. Sci. PARIS*, 250, 600-602.
- CLAUSEN, T., 1975. - The effect of insulin on glucose transport in muscle cells. *Current Topics in Membr. and Transp.*, 6, 169-226.
- CLOUD, J.G. & SCHUETZ, A.W., 1977. - Interaction of progesterone with all or isolated portions of the Amphibian (*Rana pipiens*) oocyte surface. *Develop. Biol.*, 60, 359-370.
- CORVAJA, N., MEGHERINI, P.C., & POMPEIANO, O., 1971. - Ultrastructure of glycogen-membrane complexes in sensory nerve fibres of cat muscle spindles. *Z. Zellforsch.*, 121, 199-217.
- DAVIDOWITZ, J., PHILLIPS, G.H., PACTER, B.R. & BREININ, G.M., 1975. - Citernal distention in membrane-glycogen complexes of rabbit extraocular muscle. *J. Ultrastruct. Res.*, 51, 307-313.
- DETLAFF, T.A., 1966. - Action of actinomycin and puromycin upon frog oocyte maturation. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 16, 183-195.
- DETLAFF, T.A., NIKITINA, L.A. & STROEVA, O.G., 1964. - The role of the germinal vesicle in oocyte maturation in Anurans as revealed by the removal and transplantation of nuclei. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 12, 851-873.
- DROCHMANS, P., 1962. - Morphologie du glycogène. Etude au microscope électronique de colorations négatives de glycogène particulaire. *J. Ultrastruct. Res.*, 6, 151-163.
- DRURY, K.C. & SCHORDERET-SLATKINE, S., 1975 a. - Les effets du cortisol et de la progestérone directement injectés à l'intérieur de l'ovocyte de *Xenopus laevis*. *C. R. Acad. Sci. PARIS*, 280, 1273-1275.
- ECKER, R.E. & SMITH, L.D., 1971. - Influence of exogenous ions on the events of maturation in *Rana pipiens* oocytes. *J. Cell Physiol.*, 77, 61-70.
- ELBRINK, J. & BIHLER, I., 1975. - Membrane transport : Its relation to cellular metabolic rates. *Science*, 188, 1177-1184.

- EYAL-GILADI, H., RAVEH, D., FEINSTEIN, N. & FRIEDLANDER, M., 1979. - Glycogen metabolism in the Prelaid chick embryos. *J. Morphol.*, 161, 23-38.
- FAWCETT, D.W., 1958. - Identification of particulate glycogen and ribonucleo-protein in electron micrographs. *J. Histochem. Cytochem.*, 6, 95-96.
- FOUCHET, C., SERRES, C., BELLE, R., OZON, R., 1975. - Mechanism of action of progesterone on Amphibian oocyte : uptake and metabolism of progesterone by isolated oocyte of *Pleurodeles waltlii* and of *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 52, 205-210.
- FRANCHI, L.L., 1960. - Electron microscopy of oocyte-follicle cell relationships in the rat ovary. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 7, 397.
- GABE, M., 1968. - Techniques histologiques. *Masson et Cie, ed. PARIS*
- GODEAU, J.F., SCHORDERET-SLATKINE, S., HUBERT, P. & BAULIEU, E.E., 1978 a - Induction of maturation in *Xenopus laevis* oocytes by a steroid linked to a polymer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75, 2353-2357.
- GULYAS, B.J., 1971. - The rabbit zygote : formation of annulate lamellae. *J. Ultrastruct. Res.*, 35, 112-126.
- GUSSEK, D.J. & HEDRICK, J.L., 1972. - The enzymatic characteristics and control of glycogen phosphorylase during early amphibian development. *J. Biol. Chem.*, 247, 6603-6609.
- HAY, E.D., 1966. - Polygranular arrays of glycogen that mimic polyribosomes in *Xenopus* eggs and embryos. *J. Cell Biol.*, 31, 45A-46A.
- HEUSON-STIENNON, J.A. & DROCHMANS, P., 1967. - Morphogenèse de la cellule musculaire striée, étudiée au microscope électronique. II. Localisation et structure du glycogène. *J. Microscopie*, 6, 639-656.
- HOPE, J., HUMPHRIES, A.A., Jr. & BOURNE, G.H., 1963. - Ultrastructure studies on developing oocytes of the Salamander *Triturus viridescens*. I. The relationship between follicle cells and developing oocytes. *J. Ultrastruct. Res.*, 9, 302-324.
- HUEBNER, E., TOBE, S.S. & DAVEY, K.G., 1975. - Structural and functional dynamics of oogenesis in *Glossina austeni* : vitellogenesis with special reference to the follicular epithelium. *Tissue and cell*, 7, 535-558.

- IMOH, H., 1980. - Occurrence and fine structure of subcortical cytoplasmic islets in fertilized eggs of *Cynops pyrrhogaster*. *Develop. Growth. Differ.*, 17, 197-207.
- IMOH, H., 1982. - Behaviour of annulate lamellae during the maturation of oocytes in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 70, 153-169.
- ISHIKAWA, K., KNAOKA, Y., KONDO, Y. & IMAI, K., 1977. - Primary action of steroid hormone at the surface of Amphibian oocyte in the induction of germinal vesicle breakdown. *Mol. Cell Endocrinol.*, 9, 91-100.
- JACOBELLI, S., HANOCQ, J., BALTUS, E. & BRACHT, J., 1974. - Hormone-induced maturation of *Xenopus laevis* oocytes : effects of different steroid and study of the properties of a progesterone receptor. *Differ.*, 2, 129-135.
- KALT, M.R., 1971. - The relationship between cleavage and blastocoel formation in *Xenopus laevis*. II. Electron microscopic observations. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 26, 51-66.
- KEMP, N.E., 1956 a. - Electron microscopy of growing oocytes of *Rana pipiens*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 281.
- KEMP, N.E., 1956 b. - Differentiation of cortical cytoplasm and inclusions in oocytes of the frog. *J. Biophys. Biochem. Cytol. (suppl.)* 2, 187.
- KEMP, N.E., 1961. - Cortical changes in fertilized eggs of *Rana pipiens*. *J. Appl. Phys.*, 32, 1643 (Abstr).
- KEMP, N.E. & ISTOCK, N.L., 1967. - Cortical changes in growing oocytes and in fertilized or pricked eggs of *Rana pipiens*. *J. Cell Biol.*, 34, 111-122.
- KESSEL, R.G., 1963 a. - The formation and subsequent differentiation of cytoplasmic vesicles in oocytes of *Necturus*. *Anat. Record.*, 145, 363.
- KESSEL, R.G., 1963 b. - Electron microscope studies on the origin of annulate lamellae in oocytes of *Necturus*. *J. Cell Biol.*, 19, 391-414.

- KESSEL, R.G., 1968. - Annulate lamellae. *J. Ultrastruct. Res. Suppl.*, 10, 5-82.
- KESSEL, R.G., 1969. - The effect of glutaraldehyde fixation on the elucidation of the morphogenesis of annulate lamellae in oocytes of *Rana pipiens*. *Z. Zellforsch.*, 94, 454-461.
- KESSEL, R.G., 1973. - Structure and function of the nuclear envelope and related cytomembrane. *Progress in Surface and Membr. Sci.*, 6, 243-329.
- KESSEL, R.G. & BEAMS, H.W., 1969. - Annulate lamellae and "Yolk nuclei" in oocytes of the dragonfly, *Libellula pulchella*. *J. Cell Biol.*, 42, 185-201.
- KESSEL, R.G. & SUBTELNY, S., 1981. - Alteration of annulate lamellae in the *in vitro* progesterone-treated, full-grown *Rana pipiens* oocyte. *J. Exp. Zool.*, 217, 119-135.
- KISHIMOTO, T. & KANATANI, H., 1976. - Cytoplasmic factor responsible for germinal vesicle breakdown and meiotic maturation in starfish oocyte. *Nature*, 260, 321-322.
- LISON, L., 1960. - Histochemie et cytochimie animales Gauthier-Villard. Ed. Paris.
- MAC MANUS, J.F.A., 1946. - Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, 158, 202.
- MAGISTRINI, M., 1977. - Etude ultrastructurale du follicule ovarien de *Xenopus laevis* au cours de la maturation. Mémoire de D.E.A. de physiologie de la reproduction, Université Pierre et Marie Curie.
- MARCHER, K., 1978. - Etude des caractéristiques électriques de la membrane de l'ovocyte de *Xenopus laevis*. Mémoire de D.E.A. de physiologie de la reproduction, Université Pierre et Marie Curie.
- MAROT, J., BELLÉ, R. & OZON, R., 1976. - Recherches sur la maturation de l'ovocyte de *Xenopus laevis*. Arguments en faveur du rôle des ions calcium. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 282, 1301-1304.
- MARTOJA, R. & MARTOJA, M., 1967. - Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie, Paris.

- MASUI, Y., 1967. - Relative roles of the pituitary, follicle cells and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. *J. Exp. Zool.*, 166, 365-376.
- MASUI, Y. & MARKERT, C., 1971. - Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.*, 177, 129-146.
- MC CULLOCH, D., 1952. - Fibrous structures in the ground cytoplasm of the *Arbacia* egg. *J. Exp. Zool.*, 119, 47-64.
- MERRIAM, R.W., 1959. - The origine and fate of annulate lamellae in maturing sand dollar eggs. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 5, 117-122.
- MERRIAM, R.W., 1971 a. - Progesterone-induced maturational events in oocytes of *Xenopus laevis*. I. Continuous necessity for diffusible calcium and magnesium. *Exp. Cell Res.*, 68, 75-81.
- MERRIAM, R.W., 1971 b. - Progesterone-induced maturational events in oocytes of *Xenopus laevis*. II. Change in intracellular calcium and magnesium distribution at germinal vesicle breakdown. *Exp. Cell Res.*, 68, 81-87.
- MOREAU, M., DOREE, M. & GUERRIER, P., 1976 a. - Electrophoretic introduction of calcium ions into the cortex of *Xenopus laevis* oocytes triggers meiosis reinitiation. *J. Exp. Zool.*, 197, 443-449.
- MOREAU, M., GUERRIER, P. & DOREE M., 1976 b - Modifications précoces des propriétés électriques de la membrane plasmique des ovocytes de *Xenopus laevis* au cours de la réinitiation méiotique induite par la progestérone, le parachloromercuribenzoate (PCMB) où l'ionophore A 23187. *C.R. Acad. Sci.*, 282, 1308-1312.
- MOREAU, M., VILAIN, J.P. & GUERRIER, P., 1980. - Free calcium changes associated with hormone action in Amphibian oocytes. *Develop. Biol.*, 78, 201-214.
- NØRREVANG, A., 1968. - Electron microscopic morphology of oogenesis. *Int. Rev. Cytol.*, 23, 113-186.
- O'CONNOR, C.M., ROBINSON, K.R. & SMITH, L.D., 1977. - Calcium, potassium and sodium exchange by full-grown and maturing *Xenopus laevis* oocytes. *Develop. Biol.*, 61, 28-40.
- OKADA, E. & WADDINGTON, C.H., 1959. - The submicroscopic structure of the *Drosophila* egg. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 7, 583-597.
- OZON, R., BELLÉ, R., SERRES, C. & FOUCHET, C., 1975. - Mechanism of action of progesterone on Amphibian oocytes. A possible biological role for progesterone metabolism. *Mol. Cell Endocrinol.*, 3, 221-231.

- PALAY, S.L. & KARLIN, L.J., 1959. - An electron microscopic study of the intestinal villus. I. The fasting animal. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 5, 363.
- PERRY, M., 1967. - Identification of glycogen in thin sections of Amphibian embryos. *J. Cell Sci.*, 2, 257-264.
- REBHUN, L.I., 1961. - Some electron microscope observations on membranous basophilic elements of invertebrate eggs. *J. Ultrastruct. Res.*, 5, 208-225.
- REVEL, J.P., NAPOLITANO, L. & FAWCETT, D.W., 1960. - Identification of glycogen in electron micrographs of thin tissues sections. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 8, 575-590.
- REYNHOUT, J.K. & SMITH, L.D., 1973. - Evidence for steroid metabolism during the *in vitro* induction of maturation in oocytes of *Rana pipiens*. *Develop. Biol.*, 30, 392-402.
- REYNHOUT, J.K. & SMITH, L.D., 1974. - Studies on the appearance and nature of a maturation-inducing factor in the cytoplasm of Amphibian oocytes exposed to progesterone. *Develop. Biol.*, 38, 394-400.
- REYNOLDS, E.S., 1963. - The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 208-211.
- RHODIN, J.A.G., 1971. - Ultrastructure of rat adrenal cortex under normal and experimental conditions. *J. Ultrastruct. Res.*, 34, 23-71.
- SASSE, D., 1975. - Dynamics of liver glycogen. The topochemistry of glycogen synthesis, glycogen content and glycogenolysis under the experimental conditions of glycogen accumulation and depletion. *Histochem.*, 45, 237-254.
- SCHORDERET-SLATKINE, S. & DRURY, K.C., 1973. - Progesterone induced maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. Appearance of maturation promoting factor in enucleated oocytes. *Cell Differ.*, 2, 247-254.
- SMITH, L.D. & ECKER, R.E., 1969. - Role of the oocyte nucleus in physiological maturation in *Rana pipiens*. *Develop. Biol.*, 19, 281-309.
- SMITH, L.D. & ECKER, R.E., 1971. - The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the inductions of maturation. *Develop. Biol.*, 25, 233-247.

- SMITH, L.D., ECKER, R.E. & SUBTELNY, S., 1966. - The initiation of protein synthesis in eggs of *Rana pipiens*. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.*, U.S.A., 56, 1724-1728.
- SMITH, L.D., ECKER, R.E. & SUBTELNY, S., 1968. - *In vitro* induction of physiological maturation in *Rana pipiens* oocytes removed from ovarian follicles. *Develop. Biol.*, 17, 627-643.
- STADHOUDERS, A.M., 1965. - Particulate glycogen. *Thèse Univ. Nimègue Thoben offset Nijmegen*.
- STEINERT, G., BALTUS, E., HANOCQ-QUERTIER, J. & BRACHET, J., 1974. - Ultrastructure of *Xenopus laevis* oocytes after injection of an extract from progesterone-treated oocytes. *J. Ultrastruct. Res.*, 49, 188-210.
- STEWART, W.W., 1981 - Lucifer dyes-highly fluorescent dyes for biological tracing. *Nature* 292, 17-21.
- SWIFT, H., 1956. - The fine structure of annulate lamellae. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 415-418.
- TAKEUCHI, T., SASAKI, M., MIYAYAMA, H., OHYUMI, M. & MIYAJIMA, H., 1975. - Intracellular localization and size of glycogen particles in glycogen synthesized under histochemical conditions. *J. Histochem. Cytochem.*, 23, 945-956.
- THIERRY, J.P., 1967. - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscopie*, 6, 987-1018.
- TSO, J., THIBIER, C., MULNER, O. & OZON, R., 1982. - Microinjected progesterone reinitiates meiotic maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*, 79, 5552-5556.
- VAN GANSEN, P., 1966. - Ultrastructure comparée du cytoplasme périphérique des ovocytes mûrs et des oeufs vierges de *Xenopus laevis* (Batracien Anoure). *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 15, 355-364.
- VAN GANSEN, P., 1967. - Etude au microscope électronique des structures ribosomiales du cytoplasme au cours de la segmentation de l'oeuf de *Xenopus laevis*. *Exp. Cell Res.*, 47, 157-166.
- VAN GANSEN, P. & SCHRAM, A., 1968. - Ultrastructure et cytochimie ultrastructurale de la vésicule germinative et du cytoplasme périnucléaire de l'ovocyte mûr de *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 20, 375-389.
- VAN GANSEN, P. & SCHRAM, A., 1969. - Etude des ribosomes et du glycogène des gastrules de *Xenopus laevis* par cytochimie ultrastructurale. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 22, 69-98.

- VILAIN, J.P., 1975. - Maturation *in vitro* des ovocytes de *Pleurodeles waltlii* (Amphibien, Urodèle). *Mém. Soc. Zool. Fr.*, 41, Symp. L. Gallien, 93-102.
- VILAIN, J.P., MOREAU, M. & GUERRIER, P., 1980. - Uncoupling of oocyte-follicle cells triggers reinitiation of meiosis in Amphibian oocytes. *Develop. Growth Differ.*, 22, 687-691.
- VRENSSEN, G.F.J.M. & KUYPER, C.M.A., 1969. - Involvements of rough endoplasmic reticulum and ribosomes in early stages of glycogen repletion in rat liver. *J. Microscopie*, 8, 589-614.
- WALLACE, R.A., JARED, D.W., DUMONT, J.N. & SEGA, M.W., 1973. - Protein incorporation by isolated Amphibian oocytes. II. Optimum incubation conditions. *J. Exp. Zool.*, 184, 321-334.
- WARTENBERG, H., 1962. - Elektronen mikroskopische und histochemische studien über die Oogenese der Amphibieneizelle. *Z. Zellforsch Mikroskop. Anat.*, 58, 427-486.
- WARTENBERG, H. & GUSEK, W., 1960. - Elecktronenoptische Untersuchungen über die feinstruktur des Ovarialeies und des Follikelepithels von Amphibien. *Exp. Cell Res.*, 19, 199-209.
- WARTENBERG, H. & SCHMIDT, W., 1961. - Elektronenmikroskopische Untersuchungen der strukturellen veränderungen im Rindbereich der Amphibieneier im Ovar und nach der Befruchtung. *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.*, 54, 118.
- WASSERMAN, W.J. & MASUI, Y., 1975 a. - Effects of cycloheximide on a cytoplasmic factor initiating meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Exp. Cell Res.*, 91, 381-388.
- WISCHNITZER, S., 1966 - The ultrastructure of the cytoplasm of the developing Amphibian egg. *Advances in Morphogen.*, 5, 131-179.
- YUROWITZKY, Yu. G. & MILMAN, L.S., 1972. Changes in enzyme metabolism during oocyte maturation in a teleost, *Misgurnus fossilis* L. Wilhelm Roux'Arch., 171, 48-54.

