

# CARACTÈRES CYTOLOGIQUES DE LA CELLULE SEXUELLE FEMELLE DU CRABE *CARCINUS MAENAS* L. AU COURS DE LA GAMÉTOGÈSE

par

**Marc Laulier**

Laboratoire de Biologie animale, U.E.R. de Sciences, Université de Caen.

## Résumé

Au cours de cette étude qui s'étend du stade ovogonial à celui d'ovocyte à maturité, des mesures du diamètre de la cellule, du noyau et de la structure nucléolaire, ainsi que l'observation des modifications des teneurs de ces structures en acides nucléiques, protéines, glucides et lipides nous ont permis de caractériser les diverses phases évolutives.

La vitellogenèse, entre autres, est marquée par le dépôt des réserves qui consistent en de petits granules glycoprotéiques, des globules vitellins faits de protides, de lipides et de glucides et des petits globules lipidiques. Nous avons précisé, à la fois dans le temps et dans l'espace, les modalités de ce dépôt.

De nombreux travaux permettent aujourd'hui de connaître les variations morphologiques et biométriques des caractères sexuels en fonction de la croissance chez les Crustacés Décapodes Brachyours et, en particulier, chez le Crabe *Carcinus maenas* Linné. Nous disposons, par contre, d'observations beaucoup moins nombreuses sur l'évolution de leurs glandes génitales et la plupart d'entre elles sont d'ordre macroscopique. Les données d'histologie classique, relatives à une espèce aussi couramment utilisée en expérimentation que le Crabe vert, sont anciennes et dues à L.A. Harvey (1929). Elles sont élémentaires et visent surtout à élucider l'origine des réserves dans les ovocytes en croissance. Chez d'autres Décapodes, les renseignements sont aussi assez fragmentaires. Citons, chez les Macroures, les travaux de J.E. King (1948), M. Féjard (1952), R.G. Kessel et H.W. Beams (1963-1968) selon J. Bruslé (1972), chez les Anomoures, ceux de F. Bloch (1935), M. Krainska (1938) et J. Carayon (1941) et, chez les Brachyours, ceux de H. Hoestlandt (1948), M. Weitzman (1966), M. de Leersnyder (1967) et M. Rouquette (1970).

Une étude topographique et histologique complète et détaillée du tissu génital du Crabe *Carcinus maenas* L. s'avérerait nécessaire si l'on désire, par la suite, approfondir la nature des modifications histologiques entraînées par certaines perturbations endocrines, ces modifica-

tions n'étant connues jusqu'ici qu'à un niveau histologique grossier (N. Demeusy, 1958). C'est pourquoi nous avons entrepris une telle étude du tissu ovarien.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les observations que nous rapportons sont relatives à des ovaires de femelles juste après la mue de puberté et en cours de maturation en vue de leur première ponte.

Leur étude a été réalisée sur coupes transversales de 5 $\mu$  d'épaisseur au niveau de la crosse ovarienne. Des coupes au microtome à congélation ont permis la recherche des lipides. Les fixateurs utilisés sont le Bouin aqueux, le Carnoy, le Baker. Les colorations histologiques sont le trichrome de Prenant Gabe (Gabe 1968), le Rouge Solide, picro-indigocarmin de Mortreuil Langlois (1962). Les techniques histochimiques appropriées sont mises en oeuvre en vue de l'identification des acides nucléiques et de la mise en évidence grossière des protéines, des lipides et des glucides.

#### RÉSULTATS

##### 1) Les grandes étapes d'évolution **des** cellules **sexuelles**.

Tous les auteurs s'accordent à reconnaître dans le tissu ovarien des Décapodes Brachyours deux zones topographiques, d'importance relative d'ailleurs fort variable selon le stade de maturation de la glande : une zone centrale comprenant des cellules germinatives, des cellules en préméiose et des cellules en prévitellogenèse, et une zone de vitellogenèse. C'est le cas chez *Eriocheir sinensis* (H. Hoestlandt, 1948), *Gecarcinus lateralis* F. (M. Weitzmann, 1966) et *Pachygrapsus marmoratus* (M. Rouquette, 1970).

En fait, nous pensons qu'il est préférable d'y définir trois régions qui, de l'intérieur vers l'extérieur, sont : une région centrale, une région de prévitellogenèse à aspect de cordons rayonnants et une région de vitellogenèse. Leur configuration plus précise, les variations de leur amplitude respective seront indiquées dans une publication ultérieure relative à la dynamique ovarienne au cours d'une maturation. La région centrale correspond essentiellement aux deux étapes initiales d'évolution des cellules sexuelles : multiplication des cellules germinales et préméiose ; les deux autres régions, aux deux étapes suivantes : prévitellogenèse et vitellogenèse.

Nous nous attacherons ici à décrire l'évolution de la cellule sexuelle depuis son stade initial jusqu'à celui d'ovocyte à maturité. En même temps, nous ferons part des modifications qui atteignent les cellules somatiques. Cette étude purement descriptive sera faite sans tenir aucun compte de la localisation des cellules sexuelles.

2) Caractères de la cellule sexuelle femelle au cours de sa maturation. Caractères des cellules somatiques ovariennes.

Le tableau 1 résume les caractères cytologiques (diamètre et aspect des cellules, de leurs noyau et nucléole) et histochimiques de ces deux catégories cellulaires à chacune des étapes précitées.

TABLEAU 1  
Modifications cytologiques de la cellule sexuelle femelle et des cellules accessoires

CELLULES SEXUELLES		Ovogonies et ovocytes en préméiose	Prévitellogenèse	Vitellogenèse	
Diamètre de la cellule		cellules de 10 $\mu$ environ	10 à 40 $\mu$	40 à 120 $\mu$	120 à 300 $\mu$
Noyau	Diamètre	constant	10 $\nearrow$ à 25 $\mu$	constant	membrane fripée
	Chromatine	ADN décelable	ADN non décelable		
		figures de préméiose	granules basophiles périphériques et intranucléaires	fin réseau	réapparition d'amas basophiles périnucléaires et intranucléaires
	Nucléole	présent dans les ovogonies	plusieurs nucléoles hétérogènes $\nearrow$ de leur volume	plusieurs nucléoles de plus en plus hétérogènes $\nearrow$ de leur volume	un nucléole hétérogène  volume à peu près constant $\searrow$ de l'intensité des réactions histochimiques (ARN-basophilie)
Cytoplasme	fin liseré	$\nearrow$ de la zone basophile périnucléaire	$\searrow$ de la zone basophile périnucléaire		
Réserves	pas de réserves		apparition des réserves — petits granules glucidiques — globules vitellins — petits globules lipidiques	mêmes réserves $\nearrow$ poursuite de de taille des globules vitellins	
CELLULES ACCESSOIRES	sans ordre parmi les ovogonies		sans ordre autour des ovocytes	une rangée de cellules accessoires autour de chaque ovocyte	
	noyau déformé		noyau ovoïde ou sphérique	noyau de plus en plus aplati	

### a) Multiplication des cellules germinales.

#### *Cellules sexuelles*

Nous avons observé des cellules de 11 à 12  $\mu$  sur 9 à 10 $\mu$  dont la chromatine est répartie en mottes à la périphérie du noyau et en son centre (Fig. 1, a). Elles correspondent à la description donnée par Bindford (1913) des cellules primordiales du mâle de *Menippe mercenaria*. Meusy (1963) décrit des cellules identiques dans le testicule et l'ovaire de l'Amphipode *Orchestia gammarella* et les considère comme aberrantes. Il s'agirait pour cet auteur d'éléments germinaux qui échappent à l'inhibition qu'exercerait la zone germinative sur la méiose. Ils parviendraient ainsi au stade de la diacinèse. Des observations supplémentaires sont nécessaires pour résoudre ce problème.

L'ovogonie, de plus petite taille (9 à 10  $\mu$  sur 8 à 9  $\mu$ ) possède un noyau à chromatine ponctuelle plus fine et périnucléaire qui occupe la majeure partie de la cellule avec un petit nucléole toujours associé à un fin filament chromatique (Fig. 1, b). Ce type cellulaire est toujours présent en plus grand nombre que le précédent. Il est capable de se diviser mais il n'est pas aisé de définir cytologiquement des ovogonies I et II.

#### *Cellules somatiques*

Entre les ovogonies, nous observons des cellules qui possèdent un noyau déformé, un nucléole riche en ARN et un fin liseré cytoplasmique positif aux réactions de l'ARN et des protéines et négatif à celles des glucides. Ces cellules, dispersées sans ordre apparent entre les cellules sexuelles, correspondent aux cellules accessoires décrites par J. Carayon (1941), aux cellules nourricières de H. Hoestlandt (1943) et à la trame mésodermique de J.J. Meusy (1968).

L'ensemble des cellules sexuelles et somatiques que nous venons de décrire apparaît parfois comme décollé de la zone suivante et forme alors une entité structurale bien délimitée qui est la zone germinative.

### b) Phase de préméiose.

#### *Cellules sexuelles*

Après cette période de multiplication, les ovogonies perdent leur nucléole et s'engagent dans les phénomènes chromosomiques de la prophase de méiose (Fig. 1, c, d, e, f) dont les principales figures sont aisément reconnues, en particulier la synzinesis typique de nombreux Arthropodes et d'autres Invertébrés (H. Hoestlandt, 1948 ; C. Raven, 1961 ; M. Rouquette, 1970). Elles passent ainsi au stade d'ovocyte I. Le diamètre cellulaire ne varie pas de façon notable au cours de ces différents stades. Nous assistons bientôt à la perte de réactivité de l'ADN au Feulgen et Rossenbeck et au vert de méthyle-pyronine de Pappenheim-Unna. Le nucléoplasme est optiquement vide.

Ces cellules en préméiose sont étroitement accolées. On ne distingue plus de cellules mésodermiques entre elles. Si la plupart du temps



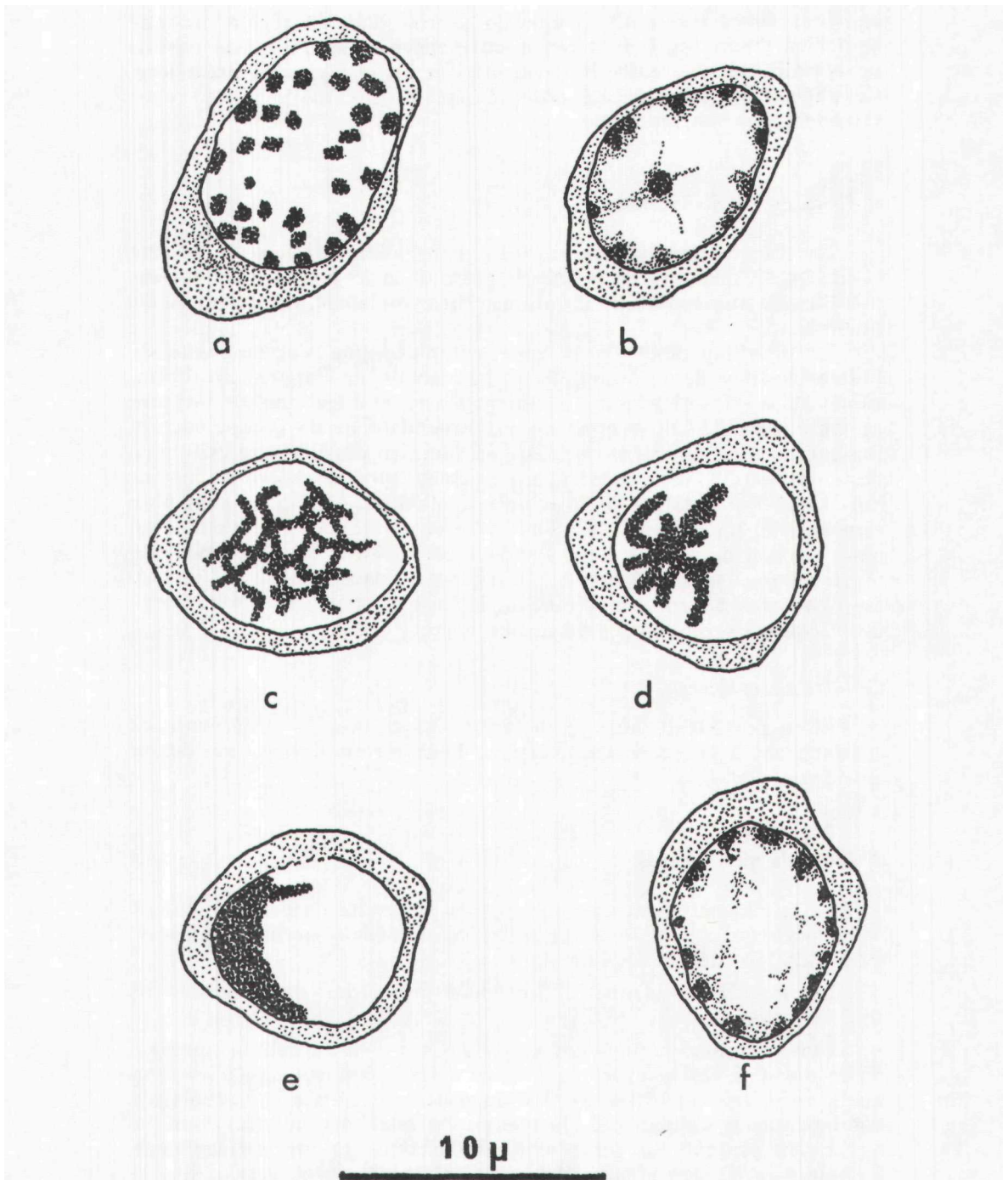


FIG. 1

*Carcinus maenas*

a : cellule à chromatine périphérique et centrale, assimilée aux cellules primordiales de Bindford ou aux cellules aberrantes de J.J. Meusy ; b : oögonie ; c : apparition et individualisation des chromosomes au sein du nucléoplasme ; d : stade du bouquet ; e : stade du synizesis ; f : stade de la diacynèse.

les deux zones que nous venons de décrire dans la région centrale sont bien distinctes, il faut reconnaître cependant qu'il existe parfois un certain mélange entre les ovogonies et les ovocytes en préméiose. Ce phénomène a aussi été observé par M. Rouquette (1970) chez *Pachygrapsus marmoratus*.

### c) Phase de prévitellogenèse.

La prévitellogenèse est marquée par l'augmentation du volume cellulaire, le diamètre de la cellule passant de 10 à 40  $\mu$ . Ceci correspond à une augmentation simultanée du cytoplasme, du noyau et du nucléole.

Le développement de la zone cytoplasmique s'accompagne de l'intensification de sa basophilie et la réaction de Pappenheim-Unna, suivie de l'extraction par la ribonucléase, montre une importante accumulation d'ARN. Aucune réserve cependant ne s'y dépose encore. Des mesures du diamètre nucléaire en fonction du diamètre cellulaire nous ont permis de constater une augmentation régulière du noyau qui atteint un diamètre de 25  $\mu$ , puis se stabilise. L'ADN ne peut plus être détecté. La chromatine est répartie en un réseau granuleux avec amas périnucléaires peu nets. Pendant cette phase, la cellule possède plusieurs nucléoles en général hétérogènes et de diamètres différents. Leur ensemble fournit un volume nucléolaire qui poursuit son augmentation après l'arrêt de celle du noyau.

### *Cellules accessoires*

Elles possèdent leurs caractères histochimiques antérieurs et commencent à entourer les ovocytes. Leur noyau devient ovoïde ou sphérique.

### d) Phase de vitellogenèse.

La vitellogenèse est marquée par la poursuite de l'accroissement de l'ovocyte qui atteint 300  $\mu$  et par l'apparition des réserves cytoplasmiques puis leur dépôt très abondant.

Les modifications nucléolaires nous permettent de la subdiviser en deux périodes.

Une première période au cours de laquelle la cellule sexuelle passe de 40 à 120  $\mu$  avec persistance du développement du volume nucléolaire. Les nucléoles de plus en plus hétérogènes et vacuolaires ont tendance à s'éloigner de la membrane nucléaire. A l'intérieur du noyau, on observe un fin réseau chromatique et un nucléoplasme basophile de plus en plus positif aux réactions des protéines.

Les cellules accessoires se disposent en une assise unistratifiée autour de chaque ovocyte.

Une seconde période qui fait passer la cellule de 120 à 300  $\mu$  est marquée par la déformation en étoile du noyau dont la membrane prend un aspect fripé et par la fin d'augmentation du volume nucléo-

laire. Des éléments basophiles, riches en protéines, réapparaissent de façon très nette sous la membrane nucléaire. Il subsiste généralement un seul nucléole dont la réactivité aux tests de l'ARN diminue de plus en plus. Finalement, il s'estompe dans le nucléoplasme.

Les cellules accessoires conservent leurs caractères histochimiques. Disposées en une seule rangée autour de chaque ovocyte, elles ont un noyau aplati.

Nous sommes parvenus à préciser les modalités du dépôt des réserves à la fois dans le temps et dans l'espace.

Au fur et à mesure que les réserves envahissent le cytoplasme, celui-ci se réduit et, en fin de vitellogenèse, seuls persistent une bande étroite basophile autour de la vésicule germinative fripée et un fin réticule entre les globules de réserves.

Pendant la première période, les premiers granules qui se déposent sont des petits granules cyanophiles de 2  $\mu$  environ, APS<sup>+++</sup> et protéines<sup>+</sup>. Il s'agit de mucopolysaccharides neutres. Puis, les globules vitellins font leur apparition. Leur taille augmente alors régulièrement ; ils sont hétérogènes et deviennent positifs aux réactions des protides, des lipides et des glucides. Enfin, entre les globules vitellins, se disposent de petits globules lipidiques de 2 à 3  $\mu$ . Toutes les catégories de réserves sont présentes.

Au cours de la seconde période, aucun constituant nouveau n'apparaîtra et les réserves ne changeront pas de nature. Les granules de mucopolysaccharides neutres forment maintenant des plages entre les gros globules vitellins qui les compriment. Ces derniers perdent leur forme sphérique et tendent à devenir polyédriques. Les globules lipidiques sont toujours présents.

Dès le début de leur accumulation, ces réserves affectent une disposition préférentielle en trois zones : une zone périnucléaire de granules glucidiques ; une zone intermédiaire large de globules vitellins et lipidiques ; une zone externe étroite de globules lipidiques et glucidiques.

### Conclusions

Après avoir subi la phase de multiplication, les cellules sexuelles s'engagent dans le processus de la méiose. Les figures de préméiose observées chez *Carcinus* sont identiques à celles décrites par les auteurs qui se sont intéressés à d'autres Crustacés.

De même, la disparition de l'affinité de l'ADN pour le vert de méthyle, dès que ces cellules entrent en prévitellogenèse, semble la règle générale chez les Crustacés. La prévitellogenèse est marquée de plus, chez *Carcinus maenas*, par une augmentation brutale de la teneur en ARN cytoplasmique et par l'augmentation régulière du volume nucléolaire. Cette dernière se poursuit au cours de la vitellogenèse bien après que les premières réserves se soient déposées. Lorsque s'instaure la vitellogenèse, le test de recherche de l'ARN par la pyronine devient de plus en plus faiblement positif au niveau du cytoplasme pour être franchement négatif en fin de croissance de l'ovocyte. Il n'est cependant

pas évident qu'une réaction plus ou moins positive ait une signification au point de vue quantitatif.

L.A. Harvey (1929) a décrit, au cours de la vitellogenèse, trois sortes d'éléments de réserve : des petits granules protidiques, des grands globules protéiques et des petits globules lipidiques. Cependant, la nature exacte des deux premiers types n'apparaît pas clairement dans son étude. Nos observations histochimiques nous ont permis de la préciser et d'assimiler en particulier les grands globules protéiques de cet auteur à des globules vitellins dont la nature est beaucoup plus complexe et les petits granules protidiques à des granules de constitution glycoprotéique.

### Summary

Cytological characteristics of the sexual cell during gametogenesis in the female of the Crab *Carcinus maenas* L.

This work is an histological study of germinal cells from ovogonial stage to mature oocyte. Measures of cytoplasm, nucleus and nucleolar structure diameters, combined with a description of nucleic acids, proteins, glucids and lipids modifications, permitted us to characterize several phases in the evolution of the female sexual cell.

Vitellogenesis is marked, besides other traits, by deposition of reserves: small glycoprotein granules, yolk globules made of proteins, of lipids and of glucids and small lipid globules. We brought some indications on the respective localization of these three categories of materials and on the respective timing in their deposition.

### Zusammenfassung

Während der vorliegenden Untersuchung, die sich vom Oogonien-Stadium bis zur reifen Oocyte erstreckt, wurde der Durchmesser der Zelle, des Kerns und der Nucleolarstruktur verfolgt. Diese Messungen und auch die Beobachtung der Veränderungen des Nucleinsäuren-, Protein-, Gluciden- und Lipiden-Gehaltes der erwähnten Strukturen ermöglichten eine Charakterisierung der verschiedenen Entwicklungsphasen.

Die Dotterbildung ist unter anderem gekennzeichnet durch die Einlagerung der Reservestoffe, die Glykoproteinkörnchen, Dotterkügelchen (Eiweiss, Fettstoffe, Kohlenhydrate) und kleine Fettkügelchen umfassen. Der Prozess dieser Einlagerung konnte sowohl zeitlich wie räumlich verfolgt werden.

### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- BINDFORD, R., 1913. — The germ-cells and the process of fertilization in the crab *Menippe mercenaria*. *J. of Morph.*, 24, 2, pp. 147-204.
- BLOCH, F., 1935. — Contribution à l'étude des gamètes et de la fécondation chez les Crustacés Décapodes. *Travaux Stat. Zool. Wimereux*, 12, pp. 181-279.
- BEAMS, H.W. et KESSEL, R.G., 1963. — Electron microscope studies on developing Crayfish ovocytes with special reference to the origin of yolk. *J. Cell Biol.*, 18, pp. 621-649.
- BRUSLÉ, J., 1972. — Les infrastructures germinales femelles précoces (gonocytes, ovogonies et ovocytes I). *Ann. Biol.*, 11, 11-12, pp. 501-571.
- CARAYON, s., 1941. — Morphologie et structure de l'appareil génital femelle chez quelques Pagures. *Bull. Soc. zool. France*, 70, pp. 95-122.
- DE LEERSNYDER, M., 1967. — Influence de la salinité et de l'ablation des pédoncules oculaires sur la mue et sur le développement ovarien d'*Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards. *Cah. Biol. Mar.*, 8, pp. 421-435.



- DEMEUSY, N., 1958. — Recherches sur la mue de puberté du Décapode Brachyoure *Carcinus maenas* Linné. *Arch. Zool. exp. gén.*, 95, 3, pp. 253-491.
- FÉJARD, M., 1952. — Recherches sur l'ovogenèse chez *Crangon crangon* L., Crustacé Décapode Natantia. *D.E.S. Fac. Sc. Univ. Paris*.
- GABE, M., 1968. — Techniques histologiques. Masson & Cie, éd.
- HARVEY, L.A., 1929. — The oogenesis of *Carcinus maenas* Penn. with special reference to yolk formation. *Trans. Roy. Soc. Edinburg*, 56, pp. 157-176.
- HOESTLANDT, H., 1948. — Recherches sur la biologie de l'*Eriocheir sinensis* (Crustacé Brachyoure). *Ann. Inst. Océanog.*, 24, 1, pp. 1-116.
- KESSEL, R.G. et BEAMS, H.W., 1968. — Intranucleolar membranes and nucleolar cytoplasmic exchange in young Crayfish oocytes. *J. Cell. Biol.*, 39, pp. 735-741.
- KING, J.E., 1948. — A study of the reproductive organs of the common marine Shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). *Biol. Bull. Woods Hole*, 94, pp. 244-262.
- KRAINSKA, M., 1938. — Etude sur l'ovogenèse chez *Eupagurus prideauxi* Leach. (Crustacea Decapoda). *Pubb. St. Zool. Napoli*, 17, 1, pp. 92-129.
- MEUSY, J.J., 1963. — La gamétogenèse d'*Orchestia gammarella* Pallas, Crustacé Amphipode. *Bull. Soc. zool. France*, 88, 2-3, pp. 197-220.
- MEUSY, J.J., 1968. — Ultrastructure de la zone germinative et des gonies du testicule et de l'ovaire d'*Orchestia gammarella* P. (Crustacé Amphipode). *Ann. Sc. Nat. Zool.*, 10, 1, pp. 101-116.
- MORTREUIL-LANGLOIS, M., 1962. — Staining section coated with radiographie emulsion: a nuclear fast red, indigo carmin sequence. *Stain Technology*, 37, pp. 175-177.
- RAVEN, CH., 1961. — Oogenesis in the storage of developmental information. Pergamon Press.
- ROUQUETTE, M., 1970. — Etude du tissu ovarien chez le Crabe *Pachygrapsus marmoratus* (Fabricius). Premiers résultats concernant les rôles de la température et des pédoncules oculaires. *Bull. Soc. zool. France*, 95, pp. 233-240.
- WEITZMAN, M.C., 1966. — Oogenesis in the tropical land Crab *Gecarcinus lateralis* (Fréminville). *Zeitschrift für Zellforschung*, 75, pp. 109-119.